

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

Bioaugmentācijas izmantošana farmācijas notekūdeņu
attīršanas efektivitātes uzlabošanai

Maģistra darbs

Autors: Miks Neibergs

Stud. apl. Nr. Mn10026

Darba vadītājs: Dr. biol., vad. pētn., doc. Vizma Nikolajeva

Konsultanti: doktorants Dzintars Rozītis, Mg. chem. Elīna Strade

RĪGA 2015

Saturs

Kopsavilkums	4
Summary	5
Ievads	6
1. Literatūras apskats.....	7
1.1.Farmācijas produktu ražošanas procesu un to veidoto notekūdeņu raksturojums	7
1.2.Notekūdeņu attīrīšanas pamatmetodes	10
1.3.Mikroorganismu aktivitātes palielināšanas paņēmieni	14
1.3.1. Bioaugmentācija.....	14
1.3.2. Biostimulācija	16
1.3.3. Mikroorganismu imobilizācija	17
2. Izmantotās metodes un materiāli.....	18
2.1.Izmantotie mikroorganismi	18
2.2. Mikroorganismu identificēšana ar Biolog sistēmu	18
2.3. Genomiskās DNS izdalīšana mikroorganismu identifikācijai.....	19
2.4. Polimerāzes ķēdes reakcijas un identifikācija	20
2.5. DNS izdalīšana priekš RT-qPCR.....	21
2.6. RT-qPCR.....	22
2.7. Ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšana	25
2.8. Farmācijas vielu degradācijas pārbaude ar mikroorganismu tīrkultūrām	25
2.9. Kultivēšana bioreaktora testa sistēmā	27
2.10. Tīrkultūru sagatavošana bioaugmentācijai.....	28
3. Rezultāti un analīze	29
3.1. Mikroorganismu daudzveidība	29
3.2. Farmācijas vielu biodegradācijas pārbaude.....	30
3.3. Bioaugmentācija testa reaktoros.....	34
3.3.1. <i>Fusarium solani</i>	35
3.3.2. <i>Sphingobacterium thalpophilum</i>	38
3.3.3 <i>Trichosporon domesticum</i>	40

3.3.4 <i>Gibberella indica</i>	42
Secinājumi	46
Pateicības	47
Izmantotā literatūra	48

Kopsavilkums

Šajā darbā tika pētīta no farmācijas attīrīšanas iekārtām izdalītu, dabisku mikroorganismu spēja degradēt specifiskus farmakoloģijas savienojumus tīrkultūru veidā, kā arī bioaugmentācijas procesā simulētos reālos vide apstākļos.

Izmantotās metodes ļauj salīdzinoši novērtēt mikroorganismu koncentrāciju un dinamiku vidē. Tika parādīts, ka mikroorganismu aktivitāte testa sistēmas apstākļos ir būtiski atšķirīga no *in vitro*. Konstatēts, ka bioaugmentācijas celmiem ir augsta izskalošanas pakāpe un ir nepieciešams veikt papildus pasākumus, lai to samazinātu. Ir grūti paredzēt pievienoto mikroorganismu efektu uz eksistējošo mikrofloru. Sēnei *Gibberella indica* ir augsts potenciāls tikt izmantotai farmācijas notekūdeņu bioaugmentācijā.

Atslēgas vārdi : bioaugmentācija, farmācijas produkti, notekūdeņu attīrīšana, qPCR

Summary

Title : “The efficiency of bioaugmentation to enhance pharmaceutical wastewater treatment”

In this work the efficiency of pharmaceutical product biodegradation via microorganism pure strains, isolated from pharmaceutical wastewater treatment plant , was evaluated. The potential of said microorganisms to be used in bioaugmentation in simulated environment was also tested.

Used methods also allowed for precise measurements of microorganism concentration and growth dynamic in test surroundings. It was showed that strains used in bioaugmentation can have drastically adverse effects in simulated real life habitat than when used *in vitro* situation. It was also determined that strains used in bioaugmentation have high risk degree of “washing-out” and additional steps are required to decrease it. It is hard to predict the effect of added microorganism on the existing microflora. Fungus *Gibberella indica* was identified to have tremendous potential to be used as microorganism strain in pharmaceutical wastewater treatment plant bioaugmentation.

Key words: bioaugmentation, pharmaceuticals, wastewater treatment, qPCR

Ievads

Turpinot pieaugt cilvēku skaitam pasaulē ģeometriskā progresijā arī palielinās pieprasījums pēc esošiem un jauniem farmācijas produktiem un preparātiem. Tas stimulē jaunu zāļu sintēzes tehnoloģiju attīstību un produkcijas procesu efektivitātes uzlabošanu. Taču tas arī noved pie būtiski paaugstinātas ražošanas gala un starpproduktu nokļūšanas notekūdenī un apkārtējā vidē. Ievērojama daļa no šīm vielām ir pēc uzbūves bioloģiski aktīvas un toksiskas dzīvīem organismiem. Kā arī nav vēl pilnība izpētīti ilglaicīgie piesārņojamu efekti uz apkārtējo ekosistēmu. Šī iemesla dēļ ir nepieciešams izveidot jaunas un uzlabot esošās notekūdeņu attīrīšanas sistēmas, lai būtu iespējams pilnībā novērst farmācijas produktu radīto piesārņojumu.

Bioloģiskā ūdens attīrīšanas metode ir visizplatītākais paņēmieni, kā tiek neitralizēts veidotais piesārņojums, un procesa efektivitāti ir tieši atkarīga no esošo mikroorganismu daudzuma un aktivitātes. Līdz nesenam laikam zināšanas par šo organismu dzīvotspēju vidē bija neprecīzas vai aptuvenas. Tāpēc procesa kontrole vai darbības paredzēšana bija apgrūtināta. Taču mūsdienu jaunās molekulārās bioloģijas metodes dot iespēju precīzi kvantificēt un sekot līdz mikrofloras mainībai un dinamikai. Tādējādi ir iespējams atrast kritiskos attīrīšanas punktus un uzlabot vispārīgo attīrīšanas kvalitāti

Darba mērķis bija novērtēt bioaugmentācijas metodes iedarbības efektu uz farmācijas notekūdeņu attīrīšanas efektivitāti.

Darba uzdevumi :

1. Identificēt mikroorganismus farmācijas notekūdeņu attīrīšanas iekārtu vidē;
2. Noteikt efektīvākos aktīvo zāļu formu degradēt spējīgos mikroorganismus laboratorijas apstākļos;
3. Simulēt reālo attīrīšanas sistēmu darbību testa reaktora mērogā;
4. Veikt bioaugmentāciju ar izvēles mikroorganismiem pie reāliem vides apstākļiem;
5. Noteikt ĶSP un farmācijas vielu koncentrācijas izmaiņas;
6. Novērtēt bioaugmentācijā izmantotā celma augšanas dinamiku reaktora sistēmā ar RT-qPCR palīdzību.

1. Literatūras apskats

1.1. Farmācijas produktu ražošanas procesu un to veidoto notekūdeņu raksturojums

Farmācijas produktu izveides industrijā ietilpst ķīmisku un bioloģiska rakstura materiālu ražošana, ekstrakcija, attīrīšana un iepakošana cietvielu vai šķidrums formā, kas būtu tālāk pielietojams kā medikaments cilvēkiem vai dzīvniekiem (Perez-Vega et al., 2012). Pieaugot cilvēku vēlmēm pēc jauniem preparātiem un zālēm, farmācijas uzņēmumi palielina savus ražošanas produktu klāstu un apjomus. Tā rezultātā palielinās gan rūpnieciskā notekūdens daudzums, gan unikālo vielu dažādība tajā (Gernaey et al., 2012). Tas rada jaunus izaicinājumus notekūdeņu attīrīšanas iekārtām (NAI), lai neitralizētu radušos piesārņojumu. Šo vielu atdalīšana ir ekoloģiski kritiska, jo tām piemīt augsta bioloģiskā aktivitāte (Van der Ven et al., 2006). Augsta piesārņojuma gadījumā var tikt iznīcinātas veselas dzīvnieku sugas reģionā. Piemēram, nekontrolēts diklofenaka piesārņojums noveda pie grifu izmiršanas Dienvidāzijā (Oaks et al., 2004).

Visizplatītākais aktīvo zāļu formu ražošanas veids ir ar ķīmiskās sintēzes procesa palīdzību. Tajā tiek sajaukti ķīmiska vai bioloģiska rakstura elementi lielos apjomos kontrolētos apstākļos. Šis process parasti tiek veikts tam veidotos reaktoros periodiskās kultivēšanas režīmā (Larsson et al., 2007). Gala kristāliskais savienojums no maisījuma tiek atdalīts ar ekstrakcijas, izskalošanas, kristalizācijas un filtrēšanas palīdzību. Lai nodrošinātu nepārtrauktu procesa darbību, ir nepieciešams liels ūdens daudzums. Šis ir daudzpakāpju process, ar augstu enerģijas patēriņu, kura gaitā veidojas ievērojams skaits starpformu un blakusproduktu, no kuriem daļa vienmēr nonāks izejas notekūdenī (Huerta et al., 2012). Pēc katra zāļu veidošanas posma paliek neizreaģējošas izejvielu vai produktu daļiņas, tās ietvert lielu spektru ar dažādām krasi atšķirīgām ķīmiskām vielām – skābes, bāzes, nitrāti, sulfīti, halogēni, cianīdi u.c. (Fatta-kassinos et al., 2011). Sorbcijā izmantotie smagie metāli arī nonāk notekūdeņos – niķelis, kadmījs, hroms, svins u.c. (Anyakora et al., 2010). Izplūdes ūdens arī var saturēt

organiskos šķīdinātājus - etanolu, acetonu, cikloheksānu, metanolu u.c. (Takahashi et al., 2000). Fenols ir viena no galvenajām sastāvdaļām daudziem pret-izsītumu, pretiekaisuma, pretspēju līdzekļiem (Siripattanakul-Ratpukdi, 2014). Tā augstā koncentrācija notekūdenī sagādā nopietnas problēmas NAI. Arī jāņem vērā, ka tīrīšanas līdzekļi, kuri tiek lietoti reaktoru dezinfekcijā pēc sintēzes beigām, nonāk notekūdenī (Lishmana et al., 2006). Šīs vielas ir ārkārtīgi kaitīgas organismiem. Kopumā ķīmiskās sintēzes procesa notekūdens ir augsti toksisks, satur plašu ksenobiotisku vielu daudzumu, tam ir augsts ķīmiskais skābekļa patēriņš (KSP) un bioloģiskais skābekļa patēriņš (BSP), ūdens pH var svārstīties robežās no 1 līdz 11 (Pino et al., 2015).

Fermentācijas process ir arī izplatīta dažādu medikamentu veidošanas metode. Kā nosaukums jau pasaka priekšā, šajā procedūrā tiek lietoti dzīvi organismi - baktērijas, raugi, micēlijsēnes, lai iegūtu vēlamās vielas. Process norisinās liela izmēra rūpnieciskos bioreaktoros periodiskās kultivēšanas veidā. Rūpnieciskā citronskābes un penicilīna ražošanā, šī metode tika pielietota pirmo reizi (Martinez et al., 2012). Ražošanas procesu var iedalīt trīs etapos – sējmateriāla sagatavošana, fermentācija un produkta attīrīšana (Sanchez, 2012). Mikroorganismu kultivācijas periodā reaktoros tiek pievadīts liels daudzums ar barības vielām, sāļiem un citām vajadzīgām vielām. Lai atdalīto vēlamo savienojumu no gala suspensijas reaktorā ir jāveic filtrācija, šķīdinātāju ekstrakcija vai precipitācija ar metālu sāļiem vai jonapmaiņu, atkarībā no iegūstamās vielas dabas (Terpe, 2006). Piesārņojums no fermentācijas un attīrīšanas posmiem nonāk lielos apjomos notekūdenī. Tā kā paši organismi nespēj izdzīvot palielinoties producējamās vielas koncentrācijai vidē, daļa no mikroorganismu biomasas tiek arī novadīta notekūdeņos (Mompelat et al., 2009). Lai panāktu vēlamā produkta biosintēzi, tiek veikta mikroorganismu ģenētiskā materiāla vai metabolismu ceļu manipulācija. Pirmo reizi rūpniecībā tas tika veikts 1980. gadā, izmantojot rekombinantu *Escherichia coli* celmu, lai ražotu insulīnu (Ferrer-Miralles et al., 2009). Kopš tā laika dažādo izmantoto modificēto organismu skaits ir tikai pieaudzis. Kamēr to ietekme uz dabiski sastopamo mikrofloru NAI ir maz pētīta (Porro et al., 2011). Fermentācijā var tikt arī lietoti patogēni baktēriju celmi, kuri ir spējīgi izraisīt cilvēku saslimšanu, ja tie nonāk ūdens apgādes tīklos.

Kopumā šāds zāļu veidošanas notekūdens var saturēt pāri palikušās barības vielas no fermentācijas procesa – nitrātus, fosfātus, cieti, kurām ir augsts ŪSP un BSP līmenis. Kamēr no produkta attīrīšanas posma notekūdenī nonāk metālu sāļi un liels apjoms organisko šķīdinātāju (Kessler, 2010). Piesārņojumu dot arī lielais daudzums dezinfekcijas līdzekļu kas tiek lietoti, lai nodrošinātu procesa sterilitāti (Deegan et al., 2009).

Farmācijas produktus vēl rūpnieciski iegūst ar ekstrakcijas metodi no bioloģiska materiāla, t.i. augiem un dzīvniekiem. Šī metode ļauj iegūt vēlamos ekstraktus ekonomiski izdevīgāk nekā iepriekš aprakstītie paņēmieni (Bart et al., 2012). Izplatītākajā procesa paņēmienā tiek patērēts liels daudzums ūdens un šķīdinātāja. Parasti tiek lietots heksāns, kas ir nepieciešams, lai aizvāktu lipofīlos savienojumus no maisījuma (Oliveira et al., 2013). Taču ir arī alternatīvi metožu varianti, ko var izmainot, lai iegūtu bioaktīvo savienojumu no augu materiāliem – ultraskaņa (Ghafoor et al., 2011), elektromagnētiskais starojums (Toepfl et al., 2006), enzimatiskās reakcijas (Gaur et al., 2007), mikroviļņi (Kaufmann et al., 2002) u.c. Tā kā kopumā šajā farmācijas vielu izdalīšanas metodē tiek patērēts ievērojami mazāks apjoms reaģentu un papildvielu, radītais gala ūdens piesārņojums ir parasti ar zemu ŪSP, BSP un neitrālu vides pH (Bart et al., 2010).

Neatkarīgi no aktīvo farmaceitisko vielu iegūšanas metodes, ražošanas gala etaps ir zāļu formulācija. Šajā solī vielas tiek pārveidotas gatavā, cilvēkam lietojamā formā – tabletēs, kapsulās, pilienos, ziedēs u.t.t. Produktam tiek pievienoti dažādi antioksidanti, konservanti, saistvielas, aromātiskās vielas (Pingalia un Mendezb et al., 2014). Formulācijas procesā notiek gala reaģentu ķīmiska sajaukšana vai dozēšana, kā arī fizikāli procesi – filtrācija, kapsulācija, žāvēšana, sijāšana un fasēšana. Procesā sterilitāte ir viena no galvenajām prioritātēm šajā etapā, tādēļ tiek lietots liels daudzums ķīmisku (Tim Sandle, 2013) un fizikālu (Parsons, 2012) dezinfekcijas līdzekļu. Arī šajā solī iegūtie notekūdeņi ir spējīgi saturēt augstu piesārņojuma koncentrāciju. Analizējot pētījumā datus par zāļu rūpnīcu NAI ASV no 2004. līdz 2009. gadam, tika konstatēts 1 000 reizu lielāks aktīvo farmaceitisko vielu piesārņojums formulācijas izplūdes ūdeņos nekā parastos komunālos notekūdeņos (Phillips et al., 2010).

Kopumā var redzēt, ka farmācijas ražotnes notekūdeņiem piemīt augsts ŪSP un BSP līmenis, tie satur ievērojamu koncentrāciju ar ksenobiotiskām un potenciāli toksiskām vielām un to nonākšana ūdens apgādes tīklos var būt kaitīga dabai un cilvēkam.

1.2. Notekūdeņu attīrīšanas pamatmetodes

Kā jau iepriekš aprakstīts, veidotais notekūdens no farmācijas produktu ražošanas satur lielu daudzumu dažādu bioloģisku aktīvu un kaitīgu vielu, lai tiktu galā ar šo piesārņojumu ir jāveic specifiski priekšattīrīšanas soļi pirms ir atļauts tos novadīt centrālajos ūdens apgādes tīklos (Eggen un Vogelsang, 2015).

Visizplatītākais attīrīšanas veids ir bioloģiskais process izmantojot aktīvās dūņas (Raj et al., 2005). Tas parasti sastāv no liela izmērā aerobā un/vai anaerobā reaktora, kas pildīts ar mikroorganismu biomasu. ŪSP aizvākšanas efektivitāte bioloģiskajai attīrīšanas sistēmai var būt robežās 60 – 90 % (Aguado et al., 2008). Faktori, kas tieši ietekmē farmaceitisko notekūdeņu attīrīšanas procesa darbību, ir pH, izšķīdušais skābekļa daudzums, temperatūra, hidrauliskais aiztures laiks, ieplūdes oglekļa slodze, toksicitātes līmenis (Chen et al., 2008). Aktīvo dūņu izmantošana ir viena no ekonomiski lētākajām videi draudzīgākajām un tehniski vieglāk izveidojamām un uzturamām notekūdeņu attīrīšanas metodēm (Sreekanth et al., 2009). Taču tai ir arī vairāki trūkumi – augsts biomasas produkcijas apjoms, liels attīrīšanas iekārtu izmērs, nepatīkamu aromātu izdalīšana, pastāvīga procesa kontrole un aprūpe. Aktīvo dūņu reaktoriem ir grūtības attīrīt piesārņojumu sistēmās, kur ŪSP slodze ieplūdes ūdeņos pārsniedz 4 000 mg/l (Suman Raj un Anjaneyulu, 2005). Mikroorganismiem ir arī ļoti liela efektivitātes svārstību dažādu savienojuma degradācijas spējā (Deegan et al., 2011).

Pēdējo gadu laikā ir popularizējusies jauna notekūdeņu attīrīšanas tehnoloģija, kas apvieno aktīvo dūņu un ultrafiltrācijas pamatprincipus – membrānu bioreaktori (MBR; Chang et al., 2008; Calabrò, 2013). Tā darbības princips ir analogs aktīvo dūņu, bet kā būtiskākā atšķirība ir iegremdēta membrāna tvertnē, kas veic papildus ūdens filtrāciju izplūde no reaktora (Calabrò et al., 2013). Šī

metode sniedz vairākas priekšrocības pār klasisko. Pirmkārt tiek samazināti kopējie iekārtas izmēri, tiek arī ierobežots mikroorganismu aizskalošanās daudzums no sistēmas tādējādi palielinot kopējo biomasas daudzumu, kas ir spējīgs veikt degradāciju. Filtrācijas izmantošana arī spēj ierobežot lielu daudzumu farmācijas vielu aizplūšanu (Urase et al., 2005). Pētījumos ir pierādīta KSP aizvākšanas efektivitāte no farmācijas notekūdeņiem līdz 95% un BSP līdz 99% (Chang et al., 2008). Taču absolūta aktīvo farmācijas vielu degradācija ir ārkārtīgi reta (Helmig et al., 2007). Lai šo situāciju labotu, būtu nepieciešams lietot membrānas ar mazākiem poru izmēriem, kas būtu spējīgas aizturēt pat sīkākos savienojumus, taču šāda metode pašlaik ir ekonomiski neizdevīga (Clara et al., 2005). Kaut gan šī metode ir uzlabojums salīdzinājumā ar aktīvo dūņu sistēmu, tai tāpat piemīt vairāki trūkumi. Pirmkārt augsts enerģijas patēriņš, lai nodrošinātu reaktoru aerāciju (Judd un Judd 2011). Paaugstinātais skābekļa daudzums vidē (vairāk par 4 mg L^{-1}) arī nelabvēlīgi ietekmē anaerobos mikroorganismus, kas ir primārie slāpekļa aizvācēji no vides (Chu un Li 2005). Galvenā MBR problēma ir membrānu apaugšana, kad makromolekulas, biomasas vai metālu joni aizsedz vai pilnībā bloķē filtru poras (Le-Clech et al., 2006). Filtru tīrīšanā tiek lietoti fizikāli paņēmieni – reversa plūsma, ultraskaņa, mehāniska tīrīšana (van den Brink et al., 2013), ķīmiski – lietojot dažādas skābes, bāzes vai oksidantus (hipohlorīds un ūdeņraža peroksīds) (Liu et al., 2001), bioķīmiski – lietojot bioloģiski aktīvas vielas/enzīmus vai pat plēsīgus mikroorganismus (Kim et al., 2013).

Farmaceutisko vielu aizvākšanu no notekūdens var veikt izmantojot tikai membrānu tehnoloģijas bez aktīvo dūņu izmantošanas. Šāds risinājums tiek izmantots galvenokārt pie zema kopējā plūsmas daudzuma vai limitēta telpas daudzuma (Shivajirao 2012). Īpašs uzsvars ir likts uz nanofiltrāciju (NF) un reverso ozmozi (RO), kā augsti efektīvas metodes, lai aizturētu ūdenī izšķīdušās vielu daļiņas (Košutic et al., 2007). Pētījumos ir pierādīta šo metožu augstā spēja aizvākt farmācijas produktus no notekūdens pat augstās to koncentrācijās (Snyder et al., 2007; Watkinson et al., 2007). Membrānu tehnoloģiju lielākā ekoloģiskā problēma ir tā, ka praktiski nenotiek aizvāktu vielu degradācija, bet gan tiek iegūts tikai to koncentrāts, kuram vajag veikt vēl tālāku attīrīšanu. NF un RO viena no

galvenajām ekonomiskajām problēmām ir augstais ūdens un enerģijas patēriņš, kas nepieciešams procesa darbībā (Ravikumar et al., 2014).

Aktīvās ogles (AC) izmantošana tiek uzskatīta par universālu, bet ekonomiski dārgu metodi, kā tikt galā ar piesārņojumu avotiem dažādās vidēs gan šķidrums, gan gāzes (Zhang et al., 2014). AC ir efektīvs adsorbents sakarā ar tās attīstīto porainību, lielu virsmas laukumu (līdz pat $3000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), virsmas ķīmiskajām un reaktīvajām īpašībām (Rodríguez-Reinoso 1997). AC tiek pievienota reaktora sistēmai pulvera vai granulu formā. Notekūdeņu attīrīšanas iekārtās tā kalpo kā papildus adsorbcijas un filtrācijas slānis (Snyder et al., 2007). AC spēj vienlīdz efektīvi adsorbēt gan aktīvās farmācijas vielas, gan smagos metālus līdz pat 99%. Taču ūdenī izšķīdušās organiskās daļiņas, humīnskābes un surfaktanti konkurē ar saistīšanās vietām un spēj pilnībā nobloķēt ogles poras (Zhang un Zhou, 2005). Šie iemesla dēļ ir ieteicams izmantot AC sistēma tikai pēc ūdens priekšattīrīšanas (Hartig et al., 2001).

Galvenās metodes problēma ir limitētais AC adsorbcijas daudzums un to izdalīšanās no reaktora. Tiek veikta vai nu sedimentācija vai filtrācija, lai izņemtu AC no attīrīšanas iekārtas, kas ir enerģijas prasīgs process (Westerhoff et al., 2005). Kad piesārņojama daudzums sasniedz maksimālo piesātinātību, aktīvās ogles daudzums tiek parasti sadedzināts vai deponēts, kas var radīt sekundārus piesārņojuma avotus (Dias et al., 2007). Tāpēc ekonomiski un ekoloģisku iemeslu dēļ ir stimulēti attīstīt AC reģenerācijas metodes.

Reģenerācija var tiek veikta fizikāli ar žāvēšanu, pirolīzi un gazifikāciju (Maroto-Valer et al., 2006). Šis process prasa lielu daudzumu elektroenerģijas un siltuma, kā arī tam ir augsts materiāla zudums (5-15%) un pazemināta tālāka efektivitāte. Izmantojot mikroviļņu starojumu ir iespējams samazināt metodes izmaksas un un saglabāt kvalitāti (Liu un Yu 2006). Ir iespējams veikt arī AC reģenerāciju izmantojot mikroorganismus, ja ir zināms, ka visi adsorbētie savienojumi ir biodegradējami (Yaghmaeian et al., 2014). Visizplatītākais AC reģenerācijas veids izmantojot ķīmiskos reaģentus, ļauj ātri un ar maziem zudumiem veikt šo procesu (Lu et al., 2011). Parasti tiek izmantoti skābi vai bāziski savienojumi, lai izšķīdinātu adsorbētās vielas (Karanfil un Dastgheib 2004).

Jauna notekūdeņu attīrīšanas metode, kas ir popularizējusies pēdējo gadu laikā ir uzlabotie oksidācijas procesi (AOP - *Advanced oxidation processes*). AOP var tikt vispārīgi aprakstīti, kā šķidrās ūdens fāzes oksidācija izmantojot enerģiski aktīvus radikāļus (-OH), lai degradētu piesārņojuma avotu (Klavariotia et al., 2009). Šī metode tiek galvenokārt lietota apvienojumā ar citu attīrīšanas paņēmieni, AOP palīdz veikt augsti toksisku, savādāk grūti degradējumu savienojumu aizvākšanu pirms bioloģiskās procesa vai pēc filtrācijas (Balcioglu un Otker, 2003). Reakcijas galā veidojas vienkārši savienojumi – ūdens, oglekļa dioksīds un mineralizēti sāļi (Rosal et al., 2009). AOP ir vairāki paveidi kuru darbībai ir nepieciešami dažādi ķīmiskie reaģenti - ūdeņraža peroksīds, ozons, metālu oksīdi; kā arī enerģijas avoti – ultraskaņa, ultravioletais starojums, elektriskais lādiņš, gamma starojums (Ikehata et al., 2008). Izplatītākie paņēmieni ir Fentona oksidācija un heterogēnā katalīze. Fentona process norisinās izmantojot dzelzs jonus kā katalizatoru un ūdeņraža peroksīdu (Saritha et al., 2007). Reakcijas optimālais pH līmenis ir 2 – 4 , papildus izmantojot UV starojumu ir iespējams paaugstināt oksidācijas efektivitāti (Shemer et al., 2006). Fentona oksidācija ir spējīga mineralizēt lielu daudzumu no piesārņojuma, kas sastopams farmācijas notekūdeņos, atvieglot tālāku biodegradāciju (Kulik et al., 2008). Heterogēnajā katalīzē tiek izmantots titāna dioksīds (TiO₂) kā fotokatalizators, lai veiktu savienojumu oksidāciju. Līdzīgi kā citās metodēs, procesa efektivitāti nosaka katalizatora koncentrācija un izmantotās gaismas viļņa garums (Doll un Frimmel 2004). Šī metode salīdzinot ar citām AOP ir gan ekonomiski, gan ekoloģiski izdevīgāka (Munoz et al., 2004).

Pagaidām eksperimentāla farmācijas un citu toksisku notekūdeņu attīrīšanas tehnoloģija ir izmantot specifiskās ūdens īpašības, kad tas atrodas subkritiskā/kritiskā punktā ($T_c = 647.1 \text{ K}$, $P_c = 22.1 \text{ MPa}$, $\rho_c = 0.322 \text{ g/cm}^3$) (Weingärtner un Franck 2005). Šādā stāvoklī palielinās ūdens pašasociācijas spējas un tas var kalpot kā skābes vai bāzes prekursors sakarā ar augsto H₃O⁺ un OH⁻ jonu daudzumu (Kruse un Dinjus 2007). Papildus samazinās ūdens dielektriskā konstante, kas palielina hidrofobisku organisko savienojumu šķīdību ūdenī un ļauj veikt to oksidāciju (Brunner 2009). Izmantojot šo metodi ir iespējams degradēt līdz pat 98% farmācijas notekūdenī esošos atkritumproduktus 20 minūšu laikā (Falamarziana et al., 2014). Kopvērtējumā šī metode ir ekoloģiski

pozitīva, jo tā nerada nekādus sekundārus piesārņojama avotus. Bet tā kā procesa veikšanai ir nepieciešams ārkārtīgi liels daudzums enerģijas un specifiskas tehnoloģijas, liela apjoma notekūdens attīrīšana, izmantojot superkritisko ūdens stāvokli, pagaidām nav vēl praktiski vai ekonomiski pielietojama (Marulanda un Bolānos 2010).

1.3. Mikroorganismu aktivitātes palielināšanas paņēmieni

1.3.1. Bioaugmentācija

2009. – 2010. gadā valdīja panika pasaulē par potenciālu putnu gripas pandēmiju, kā rezultātā pieaugama pretgripas līdzekļa Oseltamivir (Tamiflu®) lietojums ikdienā. Lai tiktu galā ar pieprasījumu, farmācijas uzņēmumi palielināja līdzekļa ražošanas apjomus, kas veicināja lielāku tā koncentrāciju notekūdenī, kas beigās noveda pie pasliktinātas vai pilnībā izjauktas NAI reaktoru darbības (Slater et al., 2011). Lai novērstu šādu problēmu nākotnē būtu potenciāli izmantojot bioaugmentācijas paņēmieni.

Bioaugmentācija ir process, kurā tiek pievienotas specifiskas mikroorganismu kultūra/s bioloģiskajām notekūdeņu attīrīšanas iekārtām, lai stimulētu konkrēta savienojuma biodegradāciju vai uzlabotu vispārējo ĶSP aizvākšanas efektivitāti. Šī ir potenciāla metode, lai atrisinātu dažādas problēmas, kas var rasties ūdens attīrīšanas procesa darbībā (Herreroa un Stuckeya, 2014). Bioaugmentāciju ir arī iespējams pielietot, lai samazinātu atveseļošanās laiku bioloģiskajos reaktoros pēc akūta toksiska šoka vai īslaicīga pārsloga perioda (Tale et al., 2011).

Pareto 80/20 sadalījuma princips ekonomikā postulē, ka 20 % no visiem dalībniekiem saņem 80 % no visas kopējās patērētās enerģijas. Balstoties uz šo principu Mertens et al. (2005) parādīja, ka tikai ļoti neliels daudzums amonija oksidētāju baktēriju veica lielāko daļu nitrifikācijas procesa augsnē. Wittebolle et al. (2005) pētījums, analizējot amonija oksidētāj baktēriju darbību farmācijas notekūdeņu attīrīšanā, konstatēja, ka dažām skaitliski nelielām baktēriju sugām bija būtiski paaugstināta rRNS/enzimātiskā aktivitāte. Šie pētījumi parāda bioaugmentācijas centrālo domu, ka neliels vienas vai vairāku kultūru pievienošanas efekts attīrīšanas

sistēmai ir spējīgs krasi mainīt notiekošo procesu. Galvenais iemesls kāpēc *in situ* apstākļos bioaugmentācija neuzrāda tādus pašus rezultātus kā *in vivo*, ir zemā mikroorganismu dzīvotspēja vai aktivitāte reālajā vidē (El Fantroussi un Agathos, 2005).

Izvēloties mikroorganismu kultūru ar kuru veikt bioaugmentāciju ir jāņem vērā trīs pamatkritēriji: 1) Tai ir jāspēj kataboliski degradēt mērķa savienojumus reālajā vidē un potenciālu inhibitoru klātbūtnē ; 2) Tai ir jāspēj iedzīvoties un būt konkurēt spējīgai konkrētajā vidē; 3) Tai ir jābūt saderīgai ar esošo mikrofloru, lai novērstu antagonisma reakcijas (Yu un Mohn, 2002). Bioaugmentācija laboratorijas apstākļos parasti tiek panākta pievienojot sistēmai iepriekš adaptētu mikroorganismu tūrkultūru, piemēram, hloraromātiskie degradētāji (Dybas et al., 2002); ir arī iespējams pievienot veselas mikroorganismu konsorcijas (Da Silva et al., 2004); ģenētiski modificētu hibrīdorganismu pievienošana arī ir spējīga degradēt toksiskos savienojumus vidē (Reineke, 2008); vai ir arī iespējams pievienot tikai plazmīdas, kas satur gēnus ar biodegradēšanai svarīgo informāciju, un tādā veidā transformēt jau eksistējošo kultūru (Dejonghe et al., 2001). Kaut gan gala rezultāti ar katru metodi nav konstanti visos gadījumos, pētījumi ar tiem ir parādījuši vairākus kritiskus bioaugmentācijas punktus. Svarīgs ir ne tikai augmentētās biokultūras sastāvs un koncentrācija, bet arī jau eksistējošas mikrofloras sadalījums esošajā bioloģiskajā sistēmā (Tale et al., 2011). Piesārņojumu veidojošā viela var sastādīt tikai nelielu daļu no kopējā organiskā oglekļa daudzuma vidē, taču tās augstā toksicitāte var krasi ietekmēt visu mikrofloru (Wang et al., 2009). Kā viena no lielākajām bioaugmentācijas problēmām ir kultūras izskalošanās no testa sistēmas. Tādējādi iegūtais efekts ir tikai īslaicīgs un nesaglabājas pastāvīgi (Boon et al., 2000). Šo problēmu ir iespējams novērst veicot papildus regulāru dozēšanu ar izvēlēto kultūru, tādējādi palīdzot tai sasniegt pietiekami augstu un stabilu biomasas koncentrāciju vidē (Saravanane et al., 2001). Vai arī alternatīvi ir iespējams veikt šūnu imobilizāciju uz virsmas/nesējiem attīrīšanas reaktorā, imobilizētās kultūras izskalošanās risks būs zemāks un bioaugmentācijas efektivitāte varēs saglabāties (Boon et al., 2002).

Lai uzlabotu potenciālo bioaugmentācijas efektivitāti ir ieteicams veikt kultūru priekšsagatavošanu (*priming*). Metodes doma ir kultivēt izvēles mikroorganismus pavājinātā mērķa vidē, tādā veidā uzlabojot to adaptācijas spējas. Tas, piemēram, tiek darīts ar *Lactococcus* vai *Bifidobacterium* baktēriju sugām, kad tās audzē paskābinātā

jogurta vidē, lai sagatavotu tos cilvēka kuņģa zemajam pH (O'Sullivan 2001). Priekš sagatavošanas metodes efekts uz kompleksu un toksisku vielu degradāciju ir arī pierādīts eksperimentos ar augsnes baktērijām. Periodiski pievienojot nelielu daudzumu hlorobenzola tīrai augsnei, tika uzlabotas esošo baktēriju konsorcijs spējas degradēt savienojumu un izdzīvot vidē ar paaugstinātu piesārņojuma avotu pretstatā tīrkultūrai (Gentry et al., 2004). Papildus paaugstinātai dzīvotspējai un adaptācijai, kā vēl viens ieguvums pētījumā tika minēts potenciāls pievienot nekultivējamus mikroorganismus videi, kuri spētu būt efektīvi piesārņojuma aizvācēji.

Ir svarīgi sekot līdzi bioaugmentētās kultūras aktivitātei un dzīvotspējai izvēles vidē. Zinot šos parametrus ir iespējams noteikt kultūras dinamiku, kritiskos punktus un iegūt pilnvērtīgāku priekšstatu par metodes darbību. To var panākt izmantojot molekulārās bioloģijas metodes, temperatūras gēla gradienta elektroforēzi (TGGE) (Fouratt et al., 2003) vai denaturējoša gēla gradienta elektroforēzi (DGGE) (Watanabe et al., 2002), dažādas kvantitatīvā PCR metodes kā RT-qPCR (Morris et al., 2014). Izmantojot fluorescējošas marķieru zondes, kā fluorescentā *in situ* hibridizācija (FISH) (Patureau et al., 2001) vai iezīmētus marķiera gēnus (gpf) (Yu et al., 2010). Ir iespējams arī veikt plūsmas citometriju, lai kvantificētu baktēriju skaitu vidē (Bressan et al., 2015). Zinot bioaugmentētās mikroorganismu kultūras gēnu aktivitāti vai dzīvotspēju, ir iespējams fiksēt un labot eksperimenta parametrus un uzlabot metodes efektivitāti (Dueholma et al., 2015).

1.3.2. Biostimulācija

Biostimulācija ir papildus elementu pievienošana bioloģiskajai sistēmai, lai uzlabotu mikroorganismu augšanu un piesārņojuma aizvākšanu. Parasti tiek pievienots papildus viegli degradējams oglekļa, slāpekļa, fosfora avots vai arī mikroelementi, var tikt arī padots papildus skābeklis. Rūpnieciskos ražošanas notekūdeņos bieži vien var novērot būtisku barības vielu trūkumu, kas nelabvēlīgi ietekmē mikroorganismu aktivitāti (Di Toro et al., 2006). Paaugstinātais biomasas daudzums ir spējīgs veikt tiešu piesārņojuma biodegradāciju, izmantojot to par oglekļa un enerģijas avotu, vai netieši ar kometabolisma starpniecību, kad

mikroorganismu sintezētie enzīmi primārā substrāta degradācijā spēj reaģēt ar sekundārajiem/piesārņojuma substrātiem (Semranya et al., 2012).

Dažādu surfaktantu pievienošana ievērojami samazina virsmas spraigumu šķidrumā un padara piesārņojuma veidotājus vieglāk izmantojamus mikroorganismiem (Ju et al., 2011). Tween 80 pievienošana paaugstināja insekticīda DDT degradāciju par 90% no piesārņotas augsnes salīdzinot ar kontroli (Betancur-Corredor et al., 2015). Biosurfaktanti tiek plaši pielietoti, lai stimulētu naftas piesārņojuma degradāciju augsnē (Mulligan 2005).

1.3.3. Mikroorganismu imobilizācija

Lai uzlabotu bioloģisku notekūdeņu attīrīšanas efektivitāti, ir iespējams veikt mikroorganismu imobilizāciju uz dažāda veida substrātiem. Šīs metodes pielietojums sniedz vairākus pozitīvus uzlabojumus - lielāka biomasas aizture/lēnāka izskalošanās, paaugstināta procesa stabilitāte un izturība pret strauju ieplūdes slodzes šoku, mazāks suspendētu dūņu daudzums, paaugstināta rezistence pret toksiskiem savienojumiem, palielināts efektīvais virsmas laukums mikroorganismiem, atvieglota lēni augošu mikroorganismu kultivācija (Chen et al., 2005).

Ir divu veidu imobilizācijas paņēmieni – adhēzija un iekapsulācija. Adhēzijas gadījumā notiek biomasas saskarsme un augšana uz porainas atbalsta struktūras. Imobilizācija var notikt uz poliuretāna putām (Quezada et al., 2009), polipropilēna nesējiem (Chang et al., 2001), māla bumbiņām (Bajaj et al., 2008), var tikt pat izmantotas no sēņu micēlija veidotas lodītes, kā biomasas nesējs (Chen et al., 2014). Iekapsulācijas tehnikā tiek izmantoti poraini polimēru savienojumi, kā algināts, agars, poliakrilamīds, karagināts, celulozes acetāts un poli-vinilalkohols, lai pārklātu mikroorganismu biomasu un ierobežotu to kustību (Kim et al., 2000). Porainā vielu struktūru ļauj notikt savienojumu difūzijai caur to un ieslēgtie mikroorganismi spēj veikt biodegradāciju. Adhēzijas metode ir tehnoloģiski un ekonomiski izdevīgāka, kamēr iekapsulācija uzrāda augstākus efektivitātes uzlabojuma rezultātus (Rostron et al., 2001).

2. Metodes un materiāli

2.1. Izmantotie mikroorganismi

Eksperimentos izmantotie mikroorganismi tika izolēti no A/S Grindex aktīvo dūņu notekūdeņu attīrīšanas iekārtām. Iepriekšējos pētījumos ar tiem (Rozītis un Strade 2015) tika noteikti un atlasīti efektīvākie farmācijas notekūdens ŪSP samazinātāji, kuri tika tālāk izmantoti šā darba ietvaros. Kultūras tika regulāri pārsētas uz agarizētām barotnēm un turētas 8 °C grādu temperatūrā; baktērijas uz R2A (proteāzes peptons 0.5 g/l, ciete 0.5 g/l, glikoze 0.5 g/l, raugu ekstrakts 0.5 g/l, kazeīna hidrolizāts 0.5 g/l, dikālija fosfāts 0.3 g/l, nātrijs piruvāts 0.3 g/l, magnija sulfāts 0.024 g/l, agars 15.0 g/l; Condo, Spānija), micēlijsēnēm/raugiem uz Sabourand glikozes agara ar hloramfenikolu (kazeīna peptons 5 g/l, peptons 5 g/l, dekstroze 40 g/l, hlorfenikols 0.05 g/l, agars 15.0 g/l, pH 5.6 ± 0.2; Fluka, Indija).

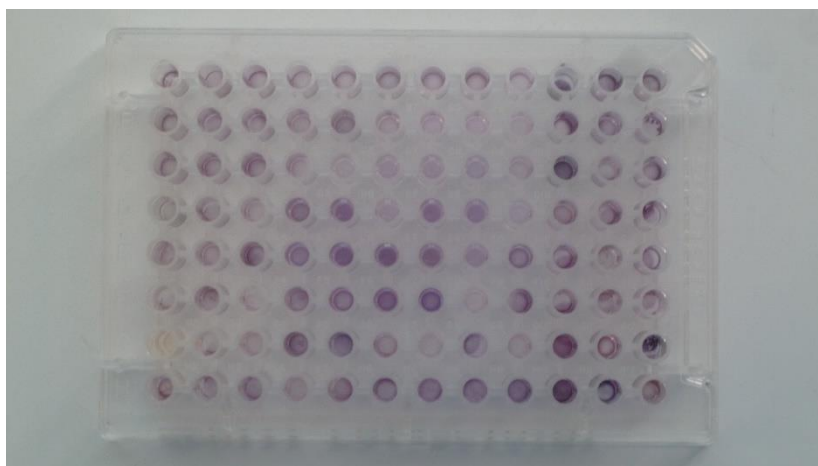
2.2. Mikroorganismu identificēšana ar Biolog sistēmu

Biolog sistēmas MicroPlate™ (Biolog, ASV) testa panelis ļauj veikt standartizētu mikroorganismu noteikšanu izmantojot 94 bioķīmisku testus, kas ir spējīgi analizēt un identificēt plašu apjomu ar gramnegatīvam un grampozitīvām baktērijām, micēlijsēnēm un raugiem.

Sistēmas pamatā ir mikroorganismu kultivēšana uz mikroplates ar 94 fenotipiskiem testiem; 71 oglekļa avota izmantošanas pārbaudes un 23 ķīmisko vielu jutības testi. Platēs ir papildus šūnas ar negatīvo kontroli (bez oglekļa avota), kā arī pozitīvā kontrole, kas kalpo kā kvalitātes rādītāji. Katra mikroorganisma kultivēšana veido unikālu fenotipisko pirkstu nospiedumu, ar kuru ir iespējams identificēt tos līdz sugas līmenim. Papildus testa vielām iedobēs atrodas arī redoks krāsviela tetrazolijs, kas kalpo kā galvenais indikators par procesa efektivitāti.

Gatavo tīrkultūras suspensiju speciālā gēla inokulācijas šķīdumā (IF) (Biolog, ASV). Suspensijas blīvums ir atkarīgs no izvēlēta protokola, un šūnu koncentrācija

tiek noteikta ar turbidimetru (C 3531- 110, Biolog, ASV). Katrā plates iedobē tiek inokulēti 100 μ l suspensijas un atstāts kultivēties 28°C grādu temperatūrā. Iedobēs, kurās organisms ir spējīgs izmantot oglekļa avotu vai izdzīvot, ir paaugstināta elpošana, kas rada tetrazolija krāsvielas redukciju un iekrāsojas violetā krāsā. Pēc 24 – 192 stundām tiek nolasītas visas iekrāsotās šūnas (1. attēls) un salīdzinātas ar datu bāzes datiem un sniegti rezultāti ar ticamības pakāpi.



1. attēls MicroPlate™ gala rezultāts

Figure 1 MicroPlate™ final result

2.3. Genomiskās DNS izdalīšana mikroorganismu identifikācijai

Genomiskās DNS izdalīšana veikta no svaigi uz barības vielu agara (baktēriju gadījumā) vai iesala ekstrakta agara (mikroskopiskās micēlijsēnes un raugi) pārsētām mikroorganismu tīrkultūrām. DNS izdalīta no aptuveni 0,25 g micēlija vai baktēriju biomasas, izmantojot Cenis (1992) metodi. Nelielam daudzumam baktēriju vai sēņu biomasas 2 ml Ependorfa mēģenē pievieno 300 μ l ekstrakcijas buferšķīduma, kas satur 200 mM Tris HCl pH 8,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,05 M SDS. Paraugiem pievieno sterilas kvarca lodītes un homogenizē horizontālajās dzirnavās Mixer Mill MM 301 (Retsch, Vācija) 10 min pie maksimālās frekvences 30 Hz 3 minūtes baktērijām vai 10 minūtes sēnēm; Inkubē 30 min 65 °C; Pievieno 1 tilpumu hloroforma proteīnu izgulsnēšanai; Mēģenes 10 min centrifugē pie 14 000 apgr.; Pievieno identisku daudzumu izopropanola, DNS izgulsnē centrifugējot 12 min pie 14 000 apgr.; DNS nogulsnes 1 reizi mazgā ar 300 μ l 70 % etanolu, centrifugē 5 min.; Nogulsnes izžāvē vakuumā vai 37 °C termostatā.

Iegūtie DNS šķīdumi satur arī RNS. Tādēļ nepieciešams veikt to apstrādi ar RNāziA, kam seko attīrīšana ar hloroformu un izopropanolu.

Iegūtajiem genomiskās DNS šķīdumiem noteikta koncentrācija un tīrība ar spektrofotometru Ultrospec 3100 Pro (Amersham Biosciences, Lielbritānija) pie viļņu garumiem 230 un 280 nm, kā arī tie tika vizualizēti 1 % agarozes gēla elektroforēzē. Pēc elektroforēzes gēli krāsoti EtBr šķīdumā apmēram 15 min, tad fotografēti un apstrādāti ar datorprogrammu *VisionWorksLS Image Acquisition and Analysis Software*.

2.4. Polimerāzes ķēdes reakcijas un identifikācija

Genomiskās DNS paraugi tika amplificēti polimerāzes ķēdes reakcijās (PCR) ar praimeriem ITS4 (White et al. 1990) un ITS1F (Gardes and Bruns 1993) mikroskopiskajām micēlijsēnēm un raugiem vai FORB un REVB baktēriju izolātiem (Yeates et al. 1998; Edwards et al. 1989). Sēnēm tika amplificēts ITS1-5.8S-ITS2, daļēji ietverot arī SSU 18S rRNS gēnu. Baktērijām tika amplificēts fragments no 16S rRNS. Izmantoto praimeru saraksts dots 1. tabulā.

1.tabula Izmantoto praimeru saraksts

Table 1 List of used primers

Praimera nosaukums	Sekvence
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
ITS1F	5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTAA 3'
FORB	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'
REVB	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'

PCR veiktas, izmantojot Mastercycler Personal (Eppendorf, Vācija) 25 µl reakcijas tilpumā. Reakcijas maisījums sastāvēja no 0,2 µl Hot Start *Taq* DNS polimerāzes, 2,5 µl 10X Hot Start PCR buferšķīduma, 2,5 µl dNTP maisījuma, 2 mM katrs, 2 µl 25 mM MgCl₂, 0,375 µl Bovine Serum Albumin 20 mg ml⁻¹ (visi reaģenti no Thermo Scientific Fermentas Molecular Biology Solutions, Lietuva), 0,5 µl katra 25 µM praimera (OPERON Biotechnologies, Vācija), 15,425 µl sterila destilēta ūdens un 1 µl of DNS parauga. PCR apstākļi bija sekojoši: sākotnējā denaturācija 4 min pie

95 °C, 40 s denaturācija pie 95 °C, 40 s praimeru piesaistīšanās 52 °C (sēnēm) and 56 °C (baktērijām), 1 min sintēze 72 °C (pēdējie trīs soļi atkārtoti 30 ciklos) un beigu elongācija 10 min pie 72 °C. PCR produkti vizualizēti 1 % agarozes gēla elektroforēzē.

Iegūtie DNS fragmenti apstrādāti ar FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase un Exonuclease I (Thermo Scientific Fermentas Molecular Biology Solutions, Lietuva) atbilstoši reaģentu ražotāja rekomendācijām. Pēc tam sagatavoti sekvenēšanai, pievienojot attiecīgos praimerus un nosūtīti sekvenēšanai uz Macrogen Europe (Amsterdama, Nīderlande) ar Sangera sekvenēšanas metodi. Iegūtās sekvenču hromatogrammas tika apstrādātas ar Staden Package 1.6.0., lai no divām sekvencēm iegūtu vienu sekvenci. Ar šo sekvenci tika veikti homologijas meklējumi pret National Centre for Biotechnology Information (NCBI) GenBank nukleotīdu datu bāzi, izmantojot meklēšanas rīku Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Ar iegūtajām paraugu sekvencēm, tiem homologajām sekvencēm un radniecīgām sekvencēm no attiecīgās mikroorganismu ģints tika veikts daudzkārtējs sekvenču salīdzinājums, izmantojot brīvpieejas programmu TCOFFEE (<http://tcoffee.crg.ca>).

2.5. DNS izdalīšana priekš RT-qPCR

Lai noteiktu mikroorganismu koncentrāciju vidē, biomasas paraugi tika nogādāti Rīgas Tehniskās universitātes Ūdens inženierijas un tehnoloģijas laboratorijā, kur tika veikta DNS izdalīšana. Imobilizētas biomasas paraugi pirms DNS izdalīšanas tiek apstrādāti ar ultraskaņu, lai noņemtu materiālam piesaistītos mikroorganismus. Materiāls tiek ievietots vienreizlietojamajā 20 ml plastmasas traukā un suspendēts 10 ml sterila destilēta ūdens. Sonificē 3 min pie 40% amplitūdas (Cole-Parmer, ASV). Šķidrajiem paraugiem priekšapstrādi neveic. DNS izdalīšanai izmanto GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Lietuva), kas sastāv no gataviem buferiem, šķīdumiem (mazgāšanas, atgūšanas, RNāzes, šķelšanas), un proteīnāzes K. Izdalīšanu 1 ml parauga suspensijai veic atbilstoši ražotāja norādījumiem (<http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-purification/genejet-genomic-dna-purification-kit/#ProductStrip-5>). Izdalīšanas laikā tiek veikta parauga lizēšana ar proteīnāzi K, RNS un inhibitoru atdalīšana, mazgāšana un DNS atgūšana.

Lai novērtētu DNS izdalīšanas kvalitāti, atsevišķiem paraugiem tika veikta DNS izdalīšana ar Qiagen QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, ASV) un fenola metodi. Izdalītās DNS kvalitāte tika novērtēta ar nanoDROP 2000c (Thermo Scientific) mikrospektrofotometru, kur, izdarot mērījumus pie 260, 280 un 230 nm, iespējams noteikt DNS daudzumu un tīrību. Parauga mērījuma attiecības pie 260/280 nm un pie 260/230 nm ļauj novērtēt izdalītā DNS tīrību. Tīra DNS parauga 260/280 attiecība ir ≥ 1.7 . Ja šī attiecība mazāka par 1.7, tas liecina par proteīnu vai fenola piemaisījumiem izdalītajā DNS paraugā. Attiecība 260/230 jābūt robežās no 2 līdz 2.2, bet, ja tā ir mazāka, tas liecina par fenola vai citu vielu piesārņojumu, kas absorbē pie 230 nm (Sambrook un Russell 2001).

2.6. RT-qPCR

Rīgas Tehniskās universitātes Ūdens inženierijas un tehnoloģijas laboratorijā tika arī nogādāts izdalītais paraugu DNS, kur tam tika pagatavots qPCR metodei nepieciešamais PCR maisījums. Pagatavoto PCR maisījumu sapilda 96 bedrīšu PCR platē un pievieno 5 μ L izdalīto DNS. Plati ievieto reālā laika PCR iekārtā (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems, ASV) un ievada atbilstošos programmas parametrus (2. tabula).

2.tabula Izmantotie praimeru pāri

Table 2 Used primer pairs

Nosaukums	Mērķorganisms	Sekvence	qPCR cikli	Ražotājs
Fusorev Fusofor	<i>F. solani</i> (565 bp) (Jaeger et al., 2000)	5`- CCAATGCCC TCCGGGGCT AAC -3` 5`- GCATAGGCC TGCCTGGCG -3`	50°C 2 min 90°C 10 min 95°C 15 sek } 40 cikli 64°C 30 sek } 72°C 30 sek }	Intedrated DNS Technologies, USA

Nosaukums	Mērķorganisms	Sekvence	qPCR cikli	Ražotājs
ITS-Fu-f ITS-Fu-r	<i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium udum</i> (Abd-Elsalam et al., 2003)	5`-CAACTC CCAAACCCC TGTGA-3` 5`- GCGACGATT ACCAAGTAAC GA-3`	50°C 2 min 90°C 10 min 95°C 15 sek 55°C 30 sek 72°C 30 sek } 40 cikli	Metabion International AG, Vācija
Forw1 Rew1	<i>Sphingobacterium thalpophilum</i> (Fabig 2011)	5`- ATCTCGATGC CGAGTCGTT G-3` 5`- GCGTGAGCA ACCTACCCAT A-3`		Metabion International AG, Vācija
TRF (forward) TRR (reverse)	<i>Trichosporon domesticum</i> (Sugita et al., 1998)	5`- AGAGGCCTA CCATGGTATC A -3` 5`- TAAGACCCA ATAGAGCCC TA -3`		Sigma-Aldrich, ASV
Univ343F Univ534R	Bacteria (Lui et al., 2007)	5`- TACGGRAGG CAGCAG – 3` 5`- ATTA CCGCGGCTG CTGGC – 3`	50°C 2 min 90°C 10 min 95°C 15 sek X°C 30 sek 72°C 30 sek } 40 cikli <i>X- temp atkarīga no salīdzināmā praimeru pāra</i>	Metabion International AG, Vācija

Nosaukums	Mērķorganisms	Sekvence	qPCR cikli	Ražotājs
TEF-Fu3r TEF-Fu3f	<i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium udum</i> (420bp) (Arif et al., 2012)	5'- TAGTAGCGG GGAGTCTCG AA-3' 5'- GGTATCGAC AAGCGAACC AT-3'	50°C 2 min 90°C 10 min 95°C 15 sek } 40 58°C 30 sek } cikli 72°C 30 sek }	Intedrated DNS Technologies, USA
HFUSR1 HFUSF	<i>F. udum</i> grupa (200 bp) (Mesapogu et al., 2011)	5'- CGCCACATC AACCACAGC TCAACACT - 3' 5'- ATCATCACTA ACTTCATCAC CAAT -3'	50°C 2 min 90°C 10 min } 40 cikli 95°C 15 sek } 54°C 30 sek }	Intedrated DNS Technologies, USA
ITS4 ITS1-F	<i>Fungi</i> (no 420 bp līdz 825 bp) (Manter et al., 2007 ; Renker et al., 2003)	5'- TCCTCCGCTT ATTGATATG C -3' 5'- CTTGGTCAT TTAGAGGAA GTAA -3'	72°C 30 sek	Intedrated DNS Technologies, USA

2.7. Ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšana

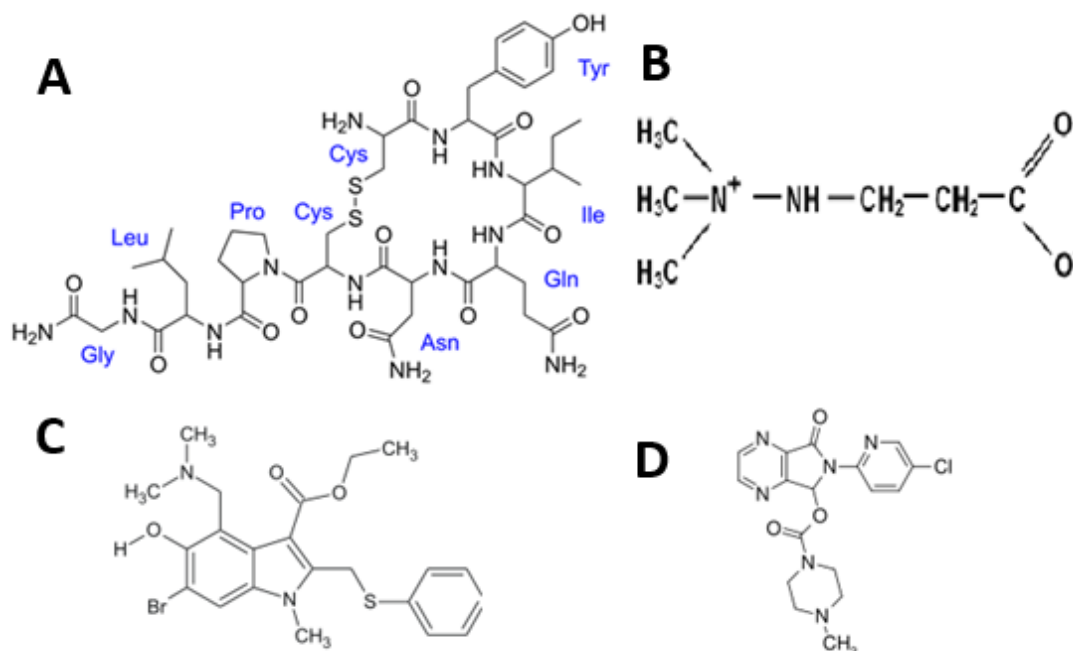
Priekš ĶSP noteikšanas tiek ņemts 2.0 ml suspensijas un filtrēts caur 0.45 µm PVDF membrānu filtru. Filtrāts tad tiek pievienots ĶSP testa mēģenēm (Lange, Vācija), kas satur HgSO₄, K₂Cr₂O₇, H₂SO₄. Saturs tiek samaisīts un ievietots termostatā (HT-2005, Lange, Vācija) 150 °C temperatūrā 15 min. Tad tam ļauj atdzist līdz istabas temperatūrai. Mēģene tiek ievietota spektrofotometrā (HACH PR 5000, Lange, Vācija), kas analizē paraugu pēc krāsas izmaiņām un parāda oglekļa savienojumu koncentrāciju, kā mg/l.

2.8. Farmācijas vielu degradācijas pārbaude ar mikroorganismu tīrkultūrām

Lai pārbaudītu katra mikroorganismu spēju biodegradēt farmācijas savienojumus tika pagatavotas barotnes pēc Quintana (2005) aprakstītās metodes. Zopiklons, mildronāts, oksitocīns un arbidols (2. attēls) tika izvēlēti kā pārbaudāmie farmācijas produkti.

250 ml Erlenmeijera kolbās tika pagatavotas mikroorganismu barotnes, kas saturēja 20 mg/L katras pārbaudāmās vielas, 20 ml 0.1 M NaH₂PO₄ buferšķīduma ar pH=7 baktēriju gadījumā un pH=5.6 sēņu variantā. Šķīdumam tika pievienots sterils ūdens, līdz kopējais tilpums bija 100 ml.

Tika pagatavota arī otrā barotņu sērija, lai izpētītu farmaceitisko vielu kometaboliskās biodegradācijas īpašības. Barotnes tika veidotas analogiski pirmajam variantam, vienīgās atšķirības bija zemāka pārbaudāmo vielu koncentrācija – 5 mg/L un papildus tika pievienots oglekļa avots piena pulvera (Merck, Vācija) veidā ar koncentrāciju 50 mg/L.



2. attēls. Izmantotie farmācijas produkti – (A) Oksitocīns , (B) Mildronāts , (C) Arbidols , (D) Zopiklons.

Figure 2 Used pharmaceutical products (A) Oksitocin , (B) Mildronate , (C) Arbidol , (D) Zopiclone.

Katrai barotnei pievienoja izvēlēto mikroorganismu suspensiju 2 ml; OD = ~0.4 (950 nm) un kolbas ievietoja kratītājā (3. attēls) inkubatorā (28°C, 160 rpm; ES-20, Biosan, Latvija). Paraugi analīzēm tika ievākti pēc 24, 48, 72, 96 un 168 stundām. Parauga tilpums - 1.5 ml, pirms testēšanas visi paraugi filtrēti caur 0.2 μm PES šļirču filtru. Papildus tika pievienots arī 1 ml acetonitrila uz 100 ml barotnes, lai palielinātu vielu šķīdību un novērstu to izgulsnēšanos. Pārbaudāmo farmaceitisko vielu koncentrācija paraugos tika noteikta ar masas spektrometrijas palīdzību.

Tika ņemts 1.5 ml parauga un filtrēts caur 0.2 μm PES šļirču filtru, kuru pievienoja šķidruma hromatogrāfam (HPLC



3. attēls Pārbaudes barotnes kratītājā

Figure 3 Batch cultures in shaker

system Waters 2695, ASV) ar Waters XTerra MS C18 3.0 X 150 mm kolonnu, darba temperatūra 30 °C. Parauga injicēšanas tilpums bija 20 µl. Mobilās fāzes maisījums bija (A) Amonija acetāta šķīdums, skudrskābe pievienota līdz pH 4.0; (B) Acetonitrils. Sastāva koncentrācija noteikta ar (Micromass Quattro API, ASV) masas spektrometru.

2.9. Kultivēšana bioreaktora testa sistēmā

Lai simulētu reālo notekūdeņu attīrīšanas stāvokli, tika izveidots testa reaktors (EDF-5.4, Biotehniskais centrs, Latvija; 4. attēls). Galvenais enerģijas avots fermentācijā tika lietots reāls AS „Grindeks” rūpnieciskās farmācijas notekūdens. Tam eksperimentu gaitā tika papildus pievienots fosfora avots (H_3PO_4 – 0,2 ml uz 5 l farmācijas notekūdens), un aktīvās farmācijas vielas - mildronāts un zopiklons 20 mg/l.



4. attēls. Testa bioreaktors

Figure 4. Test bioreactor

Kopējais bioreaktora efektīvais tilpums bija 4 l, pusi no tilpuma sastādīja augsta blīvuma polietilēna bioplēves nesēji K1 (Anoxkaldnes, Zviedrija) (5. attēls). Pirms katra eksperimenta uzsākšanas nesēji tika nomainīti un tika ļauts tiem apaugt ar biomasu no reālajām attīrīšanas iekārtām (trauki ar nesējiem bija iegremdēti AS „Grindeks” notekūdeņu attīrīšanas iekārtu 1. reaktorā apmēram 4 nedēļas). Vides parametri eksperimenta bioreaktoros bija uzstādīti, lai pēc iespējas precīzāk simulētu faktisko attīrīšanas iekārtu stāvokli, un tie bija: temperatūra 28°C; pH 7.0 ±0.2 baktērijām un 5.6 ±0.2 sēnēm; gaisa padeve 2 l/min; plūsmas ātrums no 60 līdz 180 ml/h. Eksperimenta gaitā tika pārbaudīta sistēmas darbība pie dažādām ieplūdes slodzēm. Šī mērķa sasniegšanai tika kontrolēts ķīmiskā skābekļa patēriņš ieplūdes ūdeņos. Lai modelētu zemu piesārņojuma slodzi,

ieplūdes ūdeņi tika atšķaidīti ar ūdeni tā, lai ĶSP būtu ~ 3 000 mg/l, bet, modelējot augstu piesārņojuma slodzi, ĶSP tika paaugstināts līdz ~ 8000 mg/l, pievienojot noteiktu daudzumu izopropilspirta.



5. attēls bioplēves nesēji

Figure 5 biofilm carriers

2.10. Tīrkultūru sagatavošana bioaugmentācijai

Izvēlētos bioaugmentācijas mikroorganismus sākotnēji kultivēja 500 ml šķidrā baktēriju (R2A) vai sēņu (Sabourand dekstrose liquid medium) barotnē istabas temperatūrā uz magnētiskā maisītāja aptuveni 2-3 nedēļas ar 200 ml autoklāvētiem, steriliem un mehāniski iezīmētiem bioplēves nesējiem (6. attēls). Papildus tika periodiski pievienotas pārbaudāmās aktīvās farmācijas vielas 2 mg/l dienā, līdz kopējā koncentrācija barotnē saniedza 20 mg/l, un pēdējās 4 dienās tika arī pievienots 125 ml caur 0.45 μm PVDF membrānu filtru filtrēts ieplūdes notekūdens. Tas tika veikts ar mērķi, lai aklimatizētu mikroorganismus reaktora videi, lai tie spētu darboties nekavējoši, bez nobīdes perioda. Iezīmētie nesēji ar pārējo barotnes šķidrumu tad tika pievienoti bioreaktoram (vienlīdz liels nesēju daudzums tika izņemts no reaktora), kur tos atstāja bez caurplūdes (*batch* režīmā) uz 5-7 dienām, tādā veidā nodrošinot maksimālo iespējamo izvēlētās mikroorganismu kultūras koncentrāciju reaktora vidē. Pēc tam tika palaists reaktors caurplūdes režīmā ar hidraulisko aiztures laiku 1.5 – 2 dienas



6. attēls bioaugmentējamā organisma kultivācija

Figure 6 cultivation of bioaugmentation strain

3. Rezultāti un analīze

3.1. Mikroorganismu daudzveidība

Izmantoto mikroorganismu tīrkultūras tika izolētas no A/S Grindex aktīvo dūņu notekūdeņu attīrīšanas iekārtām. Precīzāk, no pirmā attīrīšanas reaktora, kas veic vislielāko ieplūdes ūdens ŪSP šoka samazinājumu līdz pat 75 %, šajā sistēmā esošie mikroorganismi ir efektīvāk adaptējušies specifiskajai notekūdeņu videi un vajadzētu uzrādīt vislabākos rādījumus. Tā kā galvenokārt oglekļa piesārņojums tiek likvidēts ar oksidatīvo reakciju starpniecību, visi izvēles mikroorganismi tika kultivēti aerobā vidē un atbilstošās agara barotnēs.

Sākotnēji visas kultūras tika identificētas ar Biolog™ sistēmas palīdzību, taču tika arī izlemts veikt precīzāku mikroorganismu klasificēšanu, lai uzlabotu rezultātu ticamību. Tas tika darīts Sangera sekvenēšanas metodi. Iegūtie identificēšanas rezultāti (1. tabula) uzrādīja lielu mikrofloras daudzveidību notekūdeņu attīrīšanas iekārtu vidē. Lielā baktēriju, raugu un micēlijsēņu dažādība varētu palielināt iespēju atlasīt efektīvākos un bioaugmentācijai spējīgākos mikroorganismu celmus.

1. tabula. No notekūdeņu attīrīšanas iekārtām izdalītie un identificētie mikroorganismi. Tikai ar Biolog sistēmas metodi identificētie organismi atzīmēti - B

Table 1 Identification of used microorganisms isolated from watertreatment plant. Strains identified only with Biolog system are marked by - B

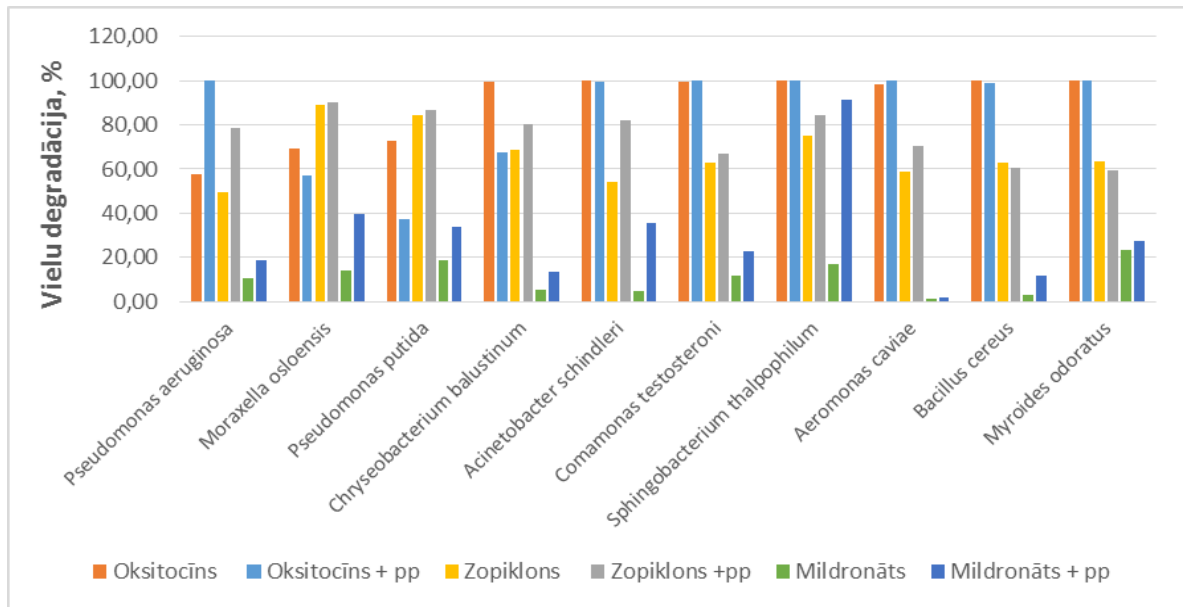
Baktērijas	Raugi	Micēlij sēnes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -B	<i>Geotrichum gigas</i>	<i>Talaromyces radicus</i>
<i>Moraxella osloensis</i> -B	<i>Trichosporon domesticum</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Trichosporon montevideense</i>	<i>Gibberella indica</i>
<i>Chryseobacterium balustinum</i>	<i>Candida inconspicua</i>	<i>Pseudallescheria boydii</i>
<i>Acinetobacter schindleri</i> -B	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	
<i>Comamonas testosteroni</i> -B	<i>Trichosporon asahii</i>	
<i>Sphingobacterium thalophilum</i>	<i>Cryptococcus arboriformis</i> -B	
<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Rhodotorula acheniorum</i> -B	
<i>Bacillus cereus</i> -B	<i>Trichosporon cutaneum</i>	
<i>Myroides odoratus</i> -B		

3.2. Farmācijas vielu biodegradācijas pārbaude

Kā iepriekš bija aprakstīts, šajā darbā tika veikta aktīvo zāļu vielu biodegradācijas pārbaude laboratorijas apstākļos. Tas tika pārbaudīts izmantojot mikroorganismu tīrkultūru kultivēšanu periodiskās barotnēs, farmakoloģijas vielām kalpojot kā oglekļa substrātam. Kā arī tika izveidota otra barotņu sērija ar papildus pievienotu viegli degradējamu enerģijas avotu piena pulvera veidā. Tas bija veikts ar mērķi pārbaudīt vielu kometabolisma degradācijas efektivitāti. Kometabolisms ir nespecifiska sekundāra substrāta enzimatiska noārdīšana primārā substrāta klātbūtnē, piemēram, trihloretilēna degradācija metāna klātbūtnē (Shukla et al., 2009). Kā arī vieglāk izmantojams enerģijas avots var arī stimulēt grūtāk šķeļamu savienojumu izmantošanu. Kā pārbaudāmās vielas tika izvēlēti mildronāts, zopiklons, oksitocīns un arbidols, balstoties uz to biežo sastopamību attīrīšanas iekārtu ieplūdes notekūdeņos un to ražošanas apjomiem. To koncentrācijas izmaiņas barotnēs tika mērītas un analizētas ar šķidrums hromatogrāfijas un masas spektrometrijas palīdzību.

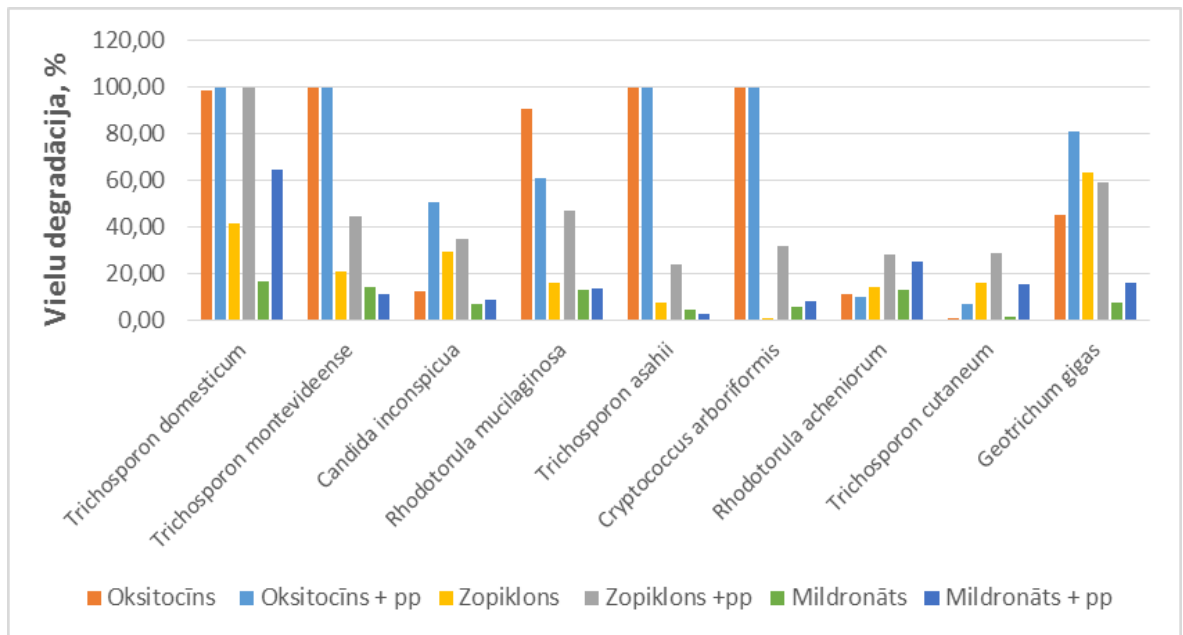
Mildronāts un oksitocīns bija ūdenī šķīstoši savienojumi, kamēr zopiklonam bija nepieciešamas pievienot 1 ml acetonitrila uz 100 ml barotnes tilpuma katru dienu, lai nodrošinātu tā šķīdību barotnē. Pēc pirmajiem analīžu rezultātiem pēc 24 h kultivēšanas tika novērots gandrīz pilnīgs arbidola zudums kontroles paraugos, bez mikroorganismu pievienošanas līdz pat 95%. Tas tika skaidrots ar savienojuma izgulsnēšanos un kristalizāciju uz kolbas virsmām, tādā veidā tas netika fiksēts masspektrometrijas mērījumos. Tika secināts, lai nodrošinātu vielas pilnīgu šķīdību barotnes vidē būtu nepieciešams izmantot ievērojamu daudzuma šķīdinātāja, acetona, ~ 40 ml. Šādas savienojuma koncentrācijas pievienošana varētu nelabvēlīgi ietekmēt mikroorganismu augšanu un attiecīgi arī rezultātu ticamību, tādēļ arbidols tālākajos eksperimentos vairs netika izmantots kā mērķa farmācijas savienojums.

Eksperimenta mērķis bija atlasīt efektīvākos farmācijas vielu biodegradētājus, kurus vēlāk būtu iespējams izmantot bioaugmentācijas veikšanai simulētos testa reaktoros. Kopumā tika pārbaudīti 23 identificētie mikroorganismi (7.-9. attēls) – 10 baktērijas, 9 raugi un 4 micēlijsēnes.



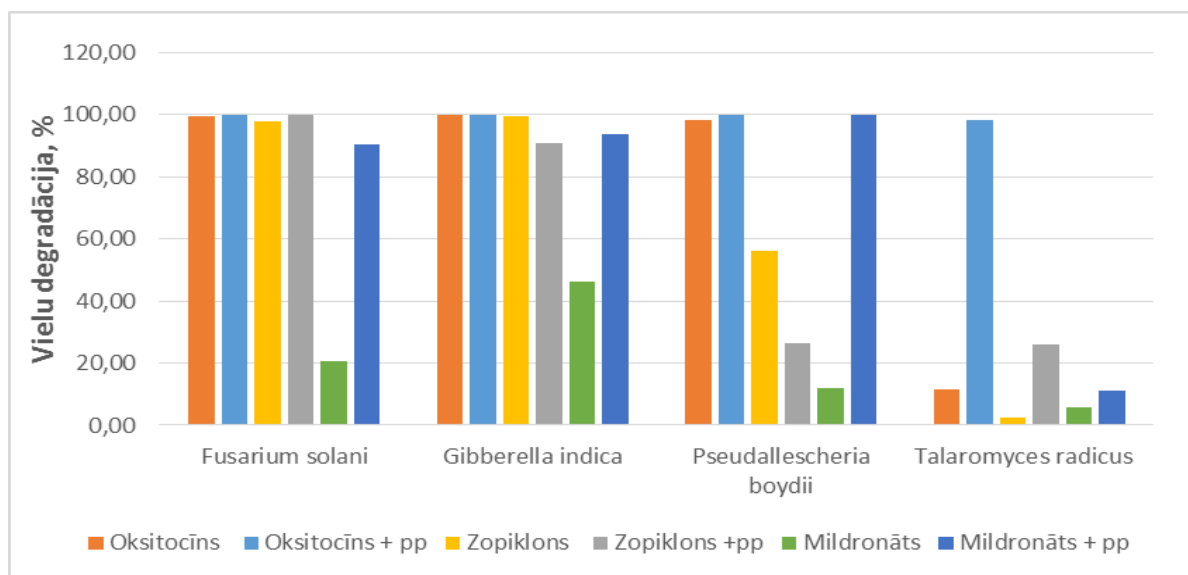
7. attēls. Pārbaudīto baktēriju spēja degradēt mērķa savienojumus vidē ar un bez piena pulvera (pp) pēc 168 h kultivācijas

Figure 7 tested bacteria biodegradation efficiency of target pharmaceuticals with and w/o skim milk powder (pp) after 168 h cultivation



8.attēls. Pārbaudīto raugu spēja degradēt mērķa savienojumus vidē ar un bez piena pulvera (pp) pēc 168 h kultivācijas

Figure 8 tested yeast biodegradation efficiency of target pharmaceuticals with and w/o skim milk powder (pp) after 168 h cultivation



9.attēls. Pārbaudīto micēlijsēņu spēja degradēt mērķa savienojumus vidē ar un bez piena pulvera (pp) pēc 168 h kultivācijas

Figure 9 tested mycelium fungi biodegradation efficiency of target pharmaceuticals with and w/o skim milk powder (pp) after 168 h cultivation

Oksitocīns ir ķīmisks hormons, kas sastāv no deviņām aminoskābēm (2. attēls; Malenka et al., 2009), tādēļ bija jau sākotnēji paredzams, ka mikroorganismiem vajadzētu spēt efektīvi metabolizēt šo savienojumi. Gala rezultāti to apstiprināja, vidēji oksitocīna koncentrācija samazinājās par 77% barotnēs tikai ar aktīvajām zāļu formām, bet piena pulvera klātbūtnē samazinājums bija vidēji 81%. Liels daudzums mikroorganismu, - *Fusarium solani*, *Gibberella indica*, *Acinetobacter schindleri*, *Aeromonas caviae*, *Bacillus cereus*, *Myroides odoratus*, *Trichosporon domesticum*, *Trichosporon asahii* - spēja pilnībā izmantot visu oksitocīna daudzumu barotnē 48 stundu laikā. Tikai neliels daudzums mikroorganismu nebija spējīgi efektīvi biodegradēt šo hormonu, un tie arī uzrādīja zemas aktivitātes mērījumus pārējo farmācijas vielu noārdīšanā. Kopumā tika pārliecinoši secināts, ka oksitocīna piesārņojums var tikt efektīvi neitralizēts ar mikroorganismu tīrkultūru starpniecību laboratorijas apstākļos pat bez papildus apstrādes.

Zopiklons ir policiklisks aromātiskais ogļūdeņradis, kas satur vairākus benzola gredzenus (2. attēls), tādēļ tas ir arī papildus strukturāli noturīgāks savienojums (Gaillot et al., 1983). Šāda veida savienojumi var noturēties apkārtējā vidē paaugstināti ilgāku laiku un izraisīt negatīvas sekas. Šajos eksperimentos zopiklona degradācija starp dažādām organismu grupām bija ar mainīgiem rezultātiem. Vidējie noārdīšanas rādītāji savienojumam bija 49 % ar farmācijas vielām kā vienīgo oglekļa avotu un 61 % ar piena pulvera klātbūtni. Raugiem bija uzskatāmi redzams

degradācijas efektivitātes uzlabojums pēc papildus viegli izmantojamu oglekļa avotu pievienošanas. Zopiklona zudums barotnēs ar piena pulveri bija vidēji divas reizes lielāks visiem raugiem. Taču uz kopējā fona raugi tik un tā uzrādīja vissliktākos rezultātus ~ 44%, un tikai viens celms *Trichosporon domesticum* bija spējīgs biodegradēt visu vielas daudzumu kultivācijas laikā. Tajā pašā laikā visi baktēriju celmi uzrādīja zopiklona degradācijas efektivitāti virs 60 % barotnēs ar piena pulveri. No baktērijām *Pseudomonas putida* un *Sphingobacterium thalpophilum* veica savienojuma noārdīšanu vislabāk, līdz pat 85%.

Sēnes *Fusarium solani* un *Gibberella indica* uzrādīja vislabākos rezultātus un bija spējīgas pilnībā izmantot visu zopiklona substrātu pat barotnēs bez papildus piena pulvera pievienošanas.

Kopumā tika novērots, ka zopiklons ir grūtāk biodegradējams savienojums nekā oksitocīns un mikroorganismiem ir nepieciešams papildus vieglāk iegūstams enerģijas avots, lai uzlabotu tā uzņemšanas efektivitāti. Papildus tika arī atlasīti vairāki raugu un baktēriju celmi, kuri nespēja izmantot šo policiklisko aromātisko ogļūdeņradi un kuru izmantošana par potenciālu bioaugmentācijas organismu bija attiecīgi zema.

Mildronāts sastāv no vienkāršas ķēdes struktūras ar četrreizvietoto amonija sāls katjonu grupu (2. attēls; Leung et al., 2010). Kaut gan tā ķīmiskā struktūra ir vienkāršākā no pārējām pārbaudes vielām, mikroorganismi uzrādīja vislielākās grūtības biodegradēt šo savienojumu.

Noārdīšanas efektivitāte bija vidēji 31 % variantos ar piena pulveri un tikai 11 % barotnēs bez tā. Vienīgi *Sphingobacterium thalpophilum* no visām baktērijām uzrādīja augstu degradēšanas pakāpi pēc 192 stundu inkubācijas perioda – 91.4 %. Nākamais labākais rezultāts bija *Moraxella osloensis* tikai ar 39.6%, bet *Aeromonas caviae* varēja izmantot tikai 1.5% savienojuma.

No raugiem vienīgi *Trichosporon domesticum* uzrādīja augstus rezultātus mildronāta degradācijā – 65%, kamēr pārējiem celmiem šie rezultāti bija zem 20%. Sākotnēji micēlijsēnes *F. solani* un *Gibberella indica* barotnēs tikai ar aktīvo zāļu formām spēja degradēt 20% un 45% mildronāta attiecīgi. Taču piena pulvera substrāta klātbūtne ievērojami paaugstināja šo celmu spēju biodegradēt mildronātu, līdz pat 90%.

Šie dati liecina, ka daudziem no pārbaudāmajiem mikroorganismiem vistīcāmāk nav atbilstošu enzimatisku ceļu kompleksu, lai šķeltu šo savienojumu. Bet tiem organismiem, kuriem šie hidrolīzes ceļi ir pieejami, tie acīmredzami ir enerģētiski maz efektīvi un organismam ir nepieciešams papildus enerģijas avotas lai nodrošinātu savienojuma degradāciju. Par to liecina piena pulvera kometabolisma efekts *Fusarium* ģints sēņu variantā.

Izpētot sīkāk pieejamo informāciju par *Fusarium* sēnēm (*Gibberella indica* ir *F. udum* teleomorfā stadijā). Par efektīvo biodegradācijas aktivitāti varētu būt atbildīgs *Fusarium* ģints sintezētais lakāzes enzīms. Tas ir oksidoreduktāzes grupas enzīms, kas ir spējīgs katalizēt tādu aromātisko un ksenobiotisko savienojumu kā fenoli, anilīni, benzēntioli u.c. biodegradāciju (Suresh et al., 2008). Vielas enzimatiskā efektivitāte celulozes (Wong et al., 2000), tekstila (Novotný et al., 2000) rūpniecības notekūdeņu attīrīšanā ir pierādīta, kamēr tā mijiedarbība ar farmācijas produktiem ir mazāk izpētīta (de Cazes et al., 2015). Lai noskaidrotu enzīma darbību šajā pētījumā izmantoto mērķa savienojumu degradācijai, būtu nepieciešams veikt papildus pārbaudes ar molekulārās bioloģijas metodēm.

Tālākajiem bioaugmentācijas eksperimentiem tika izvēlēti mikroorganismi, kas uzrādīja augstus rezultātus zopiklona un mildronāta degradācijā. Tie bija baktērija *Sphingobacterium thalophilum*, raugs *Trichosporon domesticum* un micēlijsēnes *Fusarium solani*, *Gibberella indica*.

3.3. Bioaugmentācija testa reaktoros

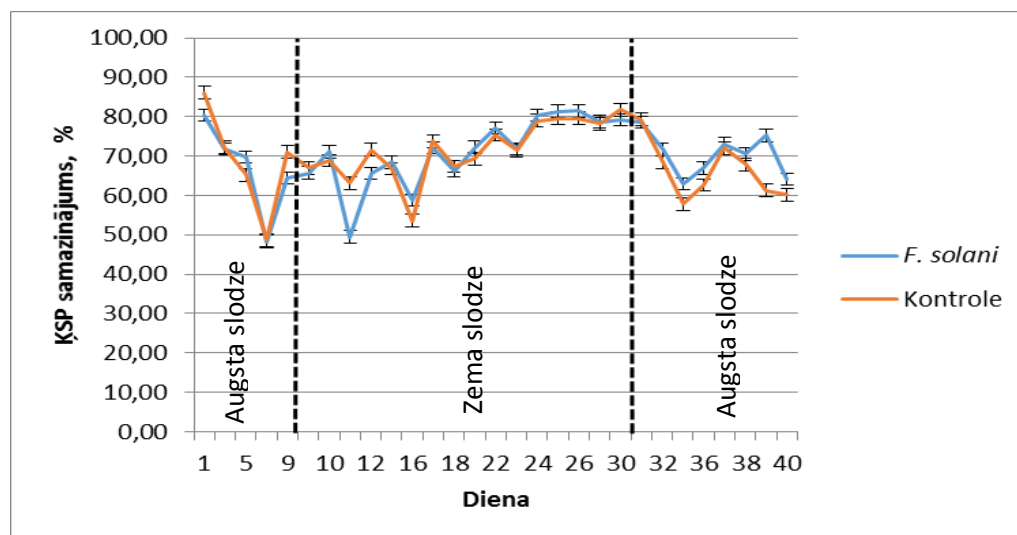
Lai gūtu priekšstatu par atlasīto mikroorganismu aktivitāti *in situ* apstākļos, tika veikta reālās vides simulētu testa bioreaktoru izveide pēc iepriekš aprakstītiem parametriem. Sākotnēji tie tika pildīti ar šķidrumu un bioplēves nesējiem no AS „Grindeks” notekūdeņu attīrīšanas iekārtu 1. reaktora. Tiem tika dots laiks 1 – 2 nedēļas, lai pielāgotos videi un iestātos līdzsvara stāvoklis. Kad tika fiksēta tā sasniegšana, vienam no reaktoriem tika pievienota tīrkultūras suspensija papildus ar nesējiem, uz kuriem bija veikta biomasas imobilizācija. Sākotnējais inokulācijas tilpums sastādīja aptuveni 10% no kopējā reaktora efektīvā tilpuma.

Kā vienīgais barības vielu substrāts tika lietots faktiskais AS „Grindeks” farmācijas rūpniecības notekūdens. Papildus tam tika pievienots mildronāts un zopiklons 20 mg/l, lai pārbaudītu šo vielu biodegradācijas dinamiku reaktoru vidē. Tika arī pārbaudīta reaktoru darbības izmaiņas pie mainīga ĶSP ieplūdes slodzes šoka koncentrācijām. Zema ieplūdes ĶSP slodze ~ 3 000 mg/l; augsta ~ 8 000 mg/l.

Paralēli tika arī izveidots analogs kontroles bioreaktors ar identiskiem vides un piebarošanas apstākļiem bez izvēlēto organismu pievienošanas. Hidrauliskais aiztures laiks (HRT) bija 48 h abām testa sistēmām.

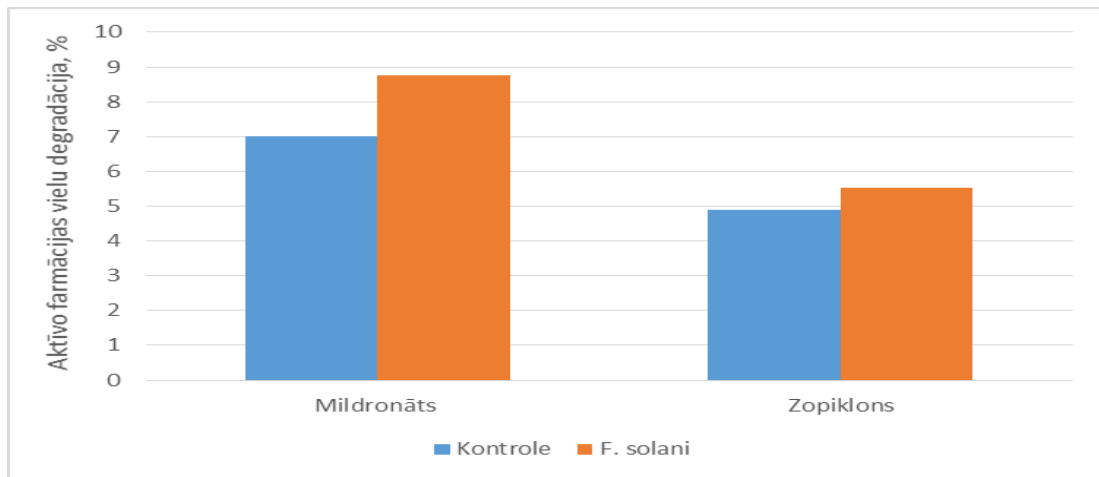
3.3.1. *Fusarium solani*

Pirmais organisms, ar kuru tika veikta bioaugmentācija, bija micēlijsēne *F. solani*. Ilgstoši kultivācijas rezultāti (10. attēls) gan pie zemas, gan augstas slodzes bija pielīdzināmi kontrolei. Līdzīgus rezultātus uzrādīja arī aktīvo farmācijas līdzekļu degradācijas mērījumi (11. attēls). *F. solani* pievienošana paaugstināja vielu biodegradāciju tikai par 1%, kas ir neliels un statistiski nebūtisks daudzums. Šie dati liecina, ka bioaugmentācijas efektivitāte bija zema vai pat neesoša.



10. attēls. ĶSP samazinājums starp ieplūdi un izplūdi testa reaktoros pie dažādām slodzēm ar *F. solani* bioaugmentāciju un kontrolē 40 kultivācijas dienu periodā.

Figure 10 COD removal efficiency during 40 day cultivation period between influent and effluent wastewater in test bioreactor system with *F. solani* bioaugmentation and w/o during variable loading stress.

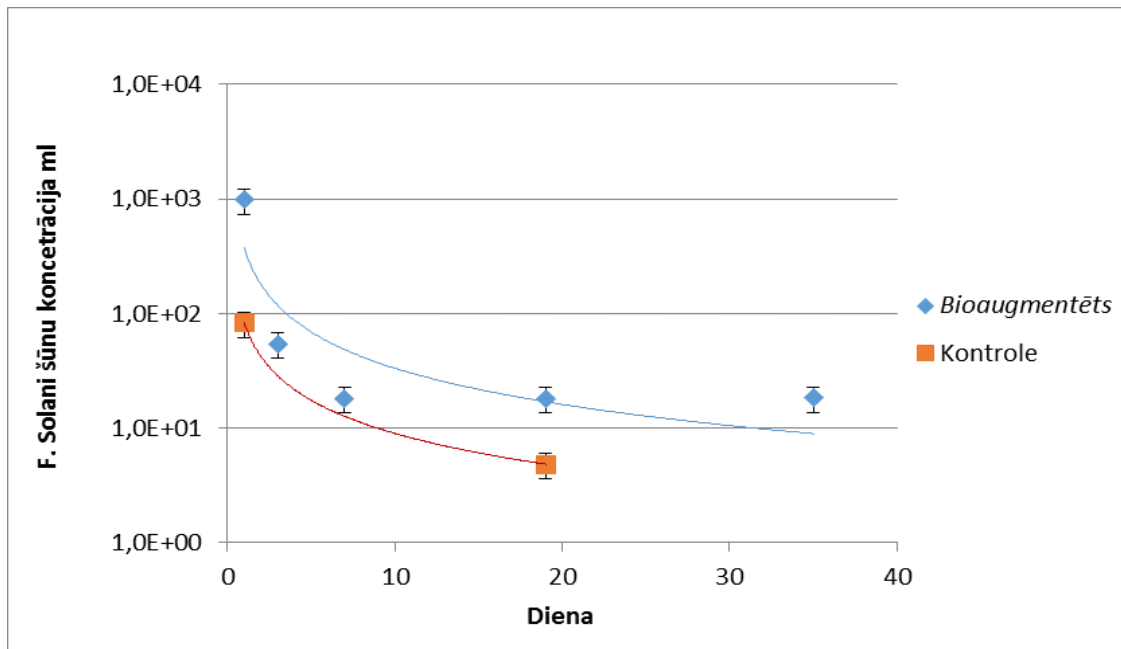


11. attēls Mildronāta un zopiklona vidējais degradācijas daudzums testa reaktoros ar *F. solani* bioaugmentāciju un kontrolē.

Figure 11 Average degradation efficiency of mildronate and zopiclone during fermentation in test reactors with *F. solani* bioaugmentation and w/o.

Kā viens no galvenajiem bioaugmentācijas neizdošanās iemesliem reālos vides apstākļos ir bioaugmentētā celma biomasas izskalošanās no testa sistēmas (El Fantroussi un Agathos, 2005). Veicot *F. solani* kvantificēšanu reaktora suspensijā ar RT-qPCR (12. attēls), tika apstiprināts šis novērojums. Jau pēc pirmajām 10 dienām no bioaugmentācijas sākuma sēnes daudzums reaktorā kritās par vairāk nekā 90%. Tas nozīmē, ka šai kultūrai ir ļoti liels izskalošanās risks un tā nebija spējīga iedzīvoties dotajā vidē. Par iemeslu tam varēja būt pārāk lēns augšanas ātrums, vidē esošo savienojumu toksiskā iedarbība vai nesekmīga konkurence ar pārējiem mikroorganismiem, kas liedza iegūt vajadzīgo enerģijas un biomasas daudzumu. Līdz ar to sēne *F. solani* nespēja atkārtot augstos rezultātus, kādus tā uzrādīja laboratorijas eksperimentos. *F. solani* bija novērojams arī kontroles paraugā, kas bija pilnībā sagaidāmi, jo visas eksperimentos izmantotās mikroorganismu sugas tika sākotnēji izolētas no šo notekūdeņu vides.

Kaut gan šajā eksperimentā tika veikta iepriekšēja kultūras imobilizācija uz bioplēves nesējiem, tas izrādījās nepietiekams solis, lai novērstu šo ātro izskalošanās parādību.



12. attēls RT-qPCR rezultāti par *F. solani* šūnu koncentrāciju testa un kontroles reaktora suspensijā kultivācijas periodā

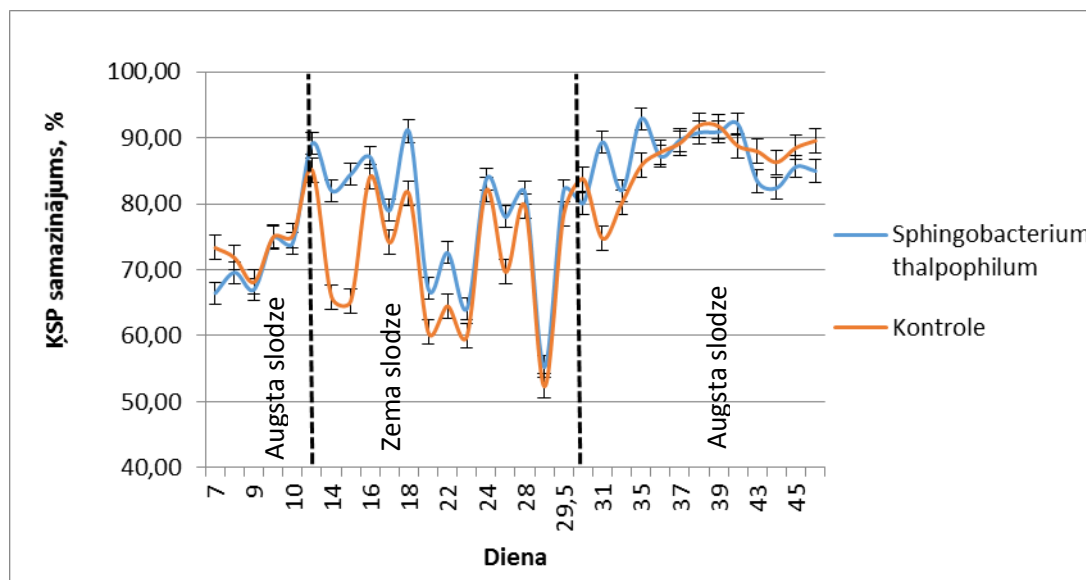
Figure 12 RT-qPCR results about *F. solani* concentration in test and control reactor suspension during cultivation

Sākotnējie eksperimenta ar *F. solani* rezultāti deva ieskatu bioaugmentācijas metodes principā un nepilnībās. Ilglaicīgai un pastāvīgai bioaugmentācija efekta darbības ir nepieciešama regulāra metodes atkārtošana. Jo jauniem, attīrīšanas sistēmai pievienotiem mikroorganismu celmiem būs pagaidu nobīdes, nestabilitātes periods, kurā tie būs pakļauti lielākam izskalošanas riskam (Boon et al., 2000). Lai uzlabotu nākamā eksperimentu rezultātus un nodrošinātu pastāvīgu augmentētā organisma koncentrāciju vidē, tika veikta papildus mikroorganisma pievienošana kultivēšanas laikā (Saravanane et al., 2001).

Tādēļ, lai nodrošinātu biomasas koncentrāciju nākamajos eksperimentos tika veikta papildus kultūras pievienošana fermentācijas laikā. Attiecīgā izvēles mikroorganisma tūrkultūra tika audzēta šķidrā sēnī vai baktēriju barotnē optimālos vides un substrātu apstākļos, kā arī zopiklona un mildronāta (20 mg/l) klātbūtnē. Visu kultivācijas laiku tika veikta periodiska dozēšana no bagātinātās barotnes testa reaktorā. Nedēļas laikā tika pievienots aptuveni 1 L barotnes ar mikroorganismu ar regulāru plūsmas ātrumu.

3.3.2. *Sphingobacterium thalophilum*

Pēc sākotnējās kultūras inokulācijas reaktors tika atstāts bez caurplūdes, *batch* režīmā, 7 dienas. Tādā veidā tika dots laiks mikroorganismam palielināt savu biomasu un labāk aklimatizēties jaunajai videi.



13. attēls ĶSP samazinājums starp ieplūdi un izplūdi testa reaktoros pie dažādām slodzēm ar *S. thalophilum* bioaugmentāciju un kontrolē 45 kultivācijas dienu periodā.

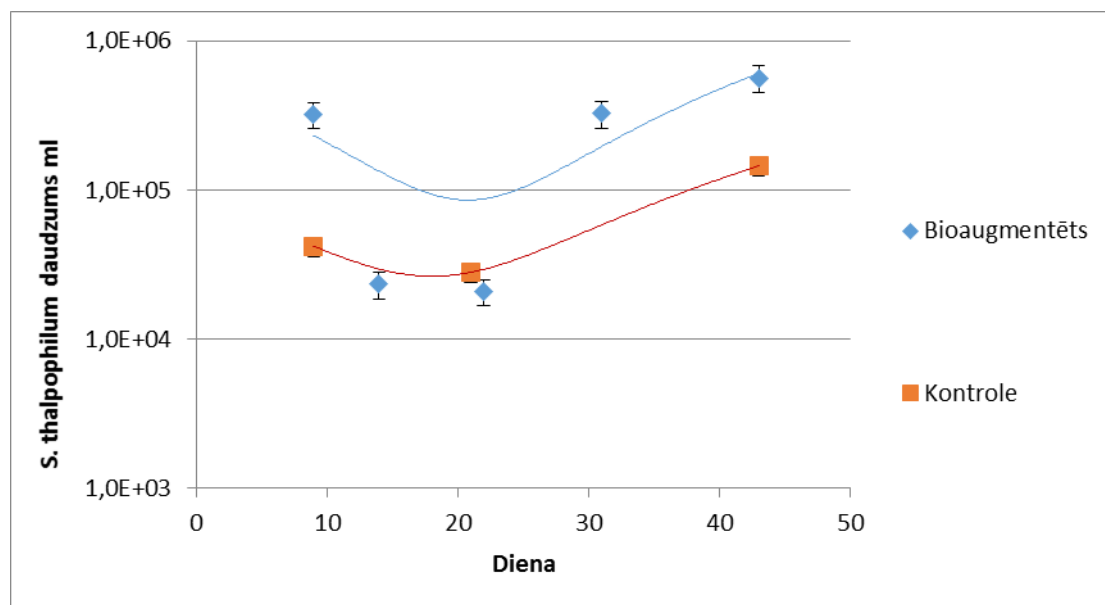
Figure 13 COD removal efficiency during 45 day cultivation period between influent and effluent wastewater in test bioreactor system with *S. thalophilum* bioaugmentation and w/o during variable loading stress.

Baktērijas *Sphingobacterium thalophilum* pievienošanas efekta (13. attēls) uzlabojums pēc visu šo papildus soļu veikšanas bija izteiktāks nekā iepriekšējajos *F. solani* eksperimentos. Novērtējot ĶSP izmaiņu datus varēja novērot nelielu efektivitātes uzlabojumu bioaugmentētajā sistēmā.

Kopumā augmentētā sistēma spēja degradēt vidēji par 4% vairāk ĶSP no vides nekā kontrole. Pie mazas ieplūdes slodzes (ĶSP ~ 3 000 mg/l) ar *S. thalophilum* augmentētais reaktors uzrādīja vidēji par 8% labāku aizvākšanas efektivitāti nekā kontroles sistēma. Pie augstas ieplūdes slodzes uzlabojums bija zemāks, tikai 2%. Kopumā bioreaktors spēja samazināt ieplūdes ĶSP vidēji par 80%. Bioaugmentētā sistēma arī uzrādīja labāku izturību pret strauju ieplūdes slodzes šoku ar mazāku attīrīšanas efektivitātes svārstību un stabilāku vispārīgo darbību.

RT-qPCR dati uzrādīja (14. attēls), ka sākotnēji, pēc *batch* stadijas noslēguma un caurplūdes režīma palaišanas, *S. thalophilum* daudzums bioreaktorā strauji

samazinājās pirmajās piecās dienās par gandrīz 90 %. Taču vēlāk izskalošanās apstājās un baktērijas koncentrācija sāka stabili pieaugt. Fermentācijas beigās *S. thalpophilum* daudzums bija pieaudzis reaktorā par 70% no sākotnējā daudzuma.



14. attēls RT-qPCR rezultāti par *S. thalpophilum* šūnu koncentrāciju testa un kontroles reaktora suspensijā kultivācijas periodā

Figure 14 RT-qPCR results about *S. thalpophilum* concentration in test and control reactor suspension during cultivation

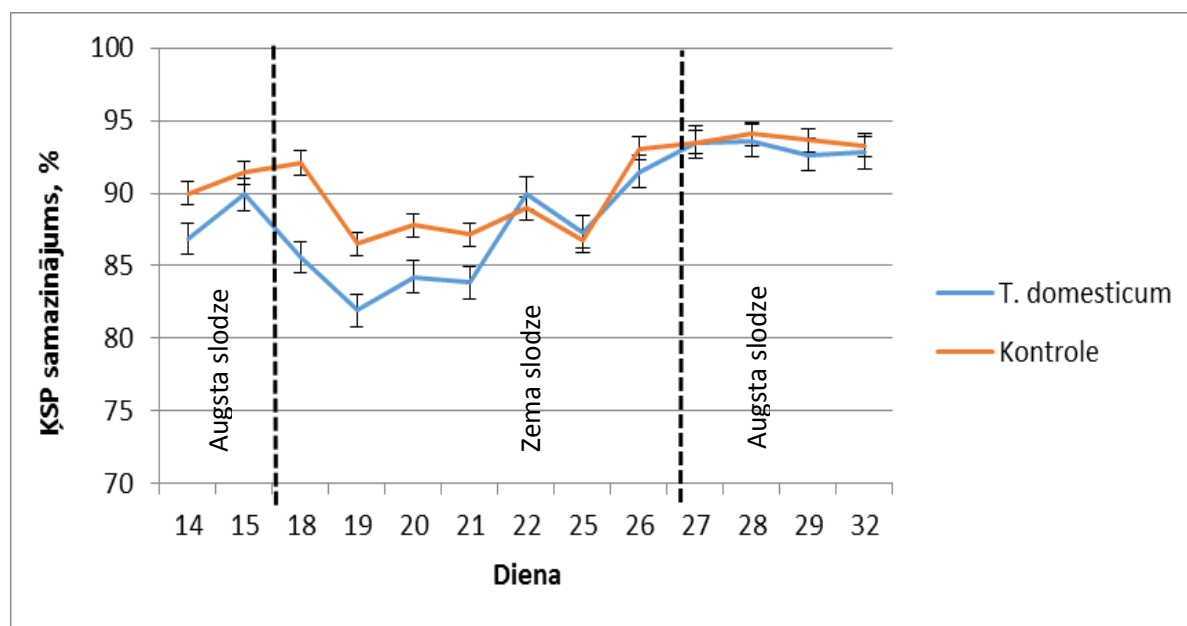
Papildus biomasas regulāra dozēšana ir visticamāk atbildīga par šo augšanas dinamiku. Tas parāda, ka mikroorganismiem ir grūtības nekavējoši pēc inokulācijas veikšanas pielāgoties šai farmācijas notekūdeņu videi un novērst savu izskalošanos. Ir nepieciešams laiks, lai tie spētu izveidot savu biofilmu vai imobilizētos uz nesējiem (Boon et al., 2002).

Neskatoties uz bioaugmentētās kultūras pieaugumu vidē un kopējā KSP samazināšanas efektivitātes uzlabojumu, mērķa farmācijas vielu biodegradācija saglabājās zema. Zopiklona un mildronāta degradācijas pieaugums augmentētajā sistēmā bija tikai par 3% un 5% attiecīgi lielāks nekā kontrolei. Laboratorijas eksperimentos ar tīrkultūru baktērijas spēja metabolizēt šos savienojumus bija samērā lēna, tai bija nepieciešamas vismaz 72 h, lai sāktu degradēt šos savienojumus. Reaktora hidrauliskais aiztures laiks 48 h visticamāk ir par īsu, lai tā spētu uzrādīt

tādu pašu efektivitāti. Tik grūti izmantojumu substrāta uzņemšana ir enerģētiski neizdevīga konkurences apstākļos un tie paliek notekūdeņu izplūdes vidē.

3.3.3 *Trichosporon domesticum*

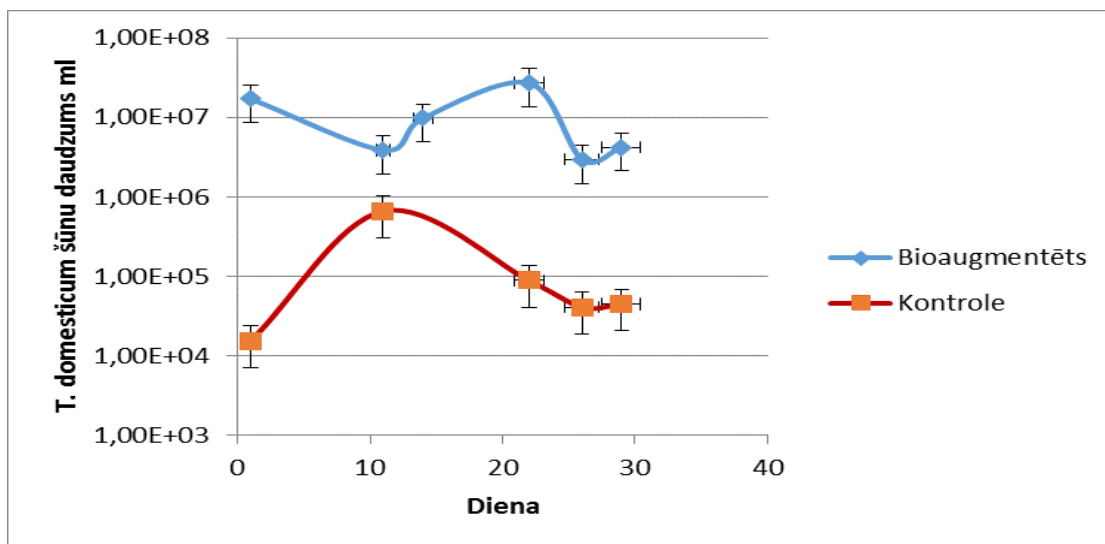
Bioaugmentācija, izmantojot *T. domesticum*, neuzrādīja būtiskus uzlabojumus ĶSP atdalīšanā no notekūdens (15. attēls). Dati liecināja, ka vēlmais ĶSP aizvākšanas uzlabojums netika sasniegts. Gan pie augstas, gan zemas ieplūdes slodzes noteiktie mērījumi bija vai nu pielīdzināmi vai pat, atsevišķos gadījumos, sliktāki nekā kontroles variantā. Šajā eksperimentā bioaugmentācijas veikšana radīja sistēmai negatīvu kopējo efektu.



15. attēls ĶSP samazinājums starp ieplūdi un izplūdi testa reaktoros pie dažādām slodzēm ar *T. domesticum* bioaugmentāciju un kontrolē 32 kultivācijas dienu periodā.

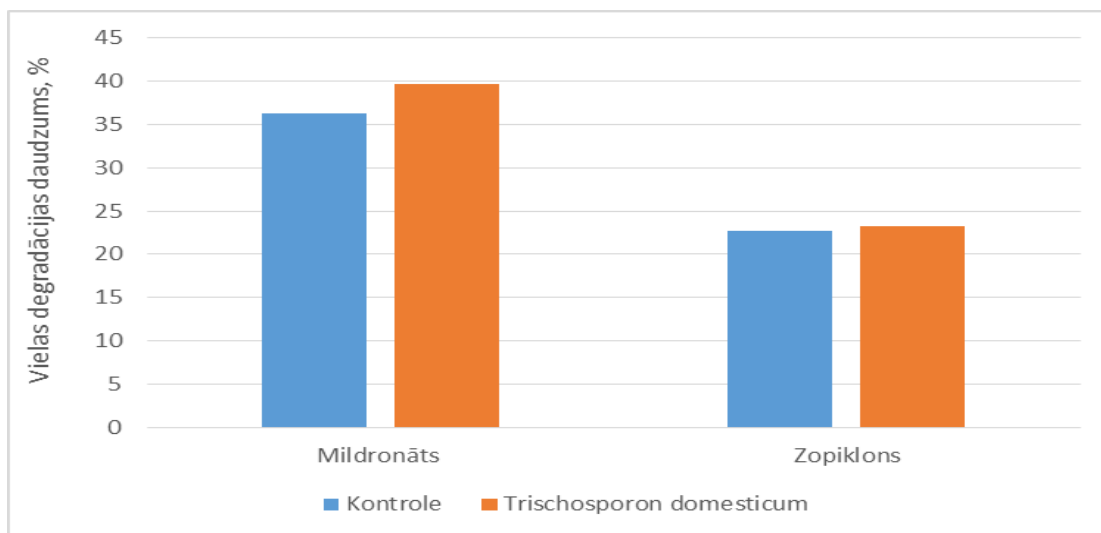
Figure 15 COD removal efficiency during 32 day cultivation period between influent and effluent wastewater in test bioreactor system with *T. domesticum* bioaugmentation and w/o during variable loading stress.

Pārsteidzošā kārtā biomasas koncentrācijas analīzes uzrādīja augstus dzīvotspējas rezultātus raugam (16. attēls). Kultūra ātri atguvās no sākotnējās izskalošanās stadijas un progresīvi palielināja savu daudzumu vidē. Taču *T. domesticum* daudzums neietekmēja mērķa farmācijas vielu degradāciju (17. attēls).



16. attēls RT-qPCR rezultāti par *T. domesticum* šūnu koncentrāciju testa un kontroles reaktora suspensijā kultivācijas periodā

Figure 16 RT-qPCR results about *T. domesticum* concentration in test and control reactor suspension during cultivation



17. attēls Mildronāta un zopiklona vidējais degradācijas daudzums testa reaktoros ar *T. domesticum* bioaugmentāciju un kontrolē.

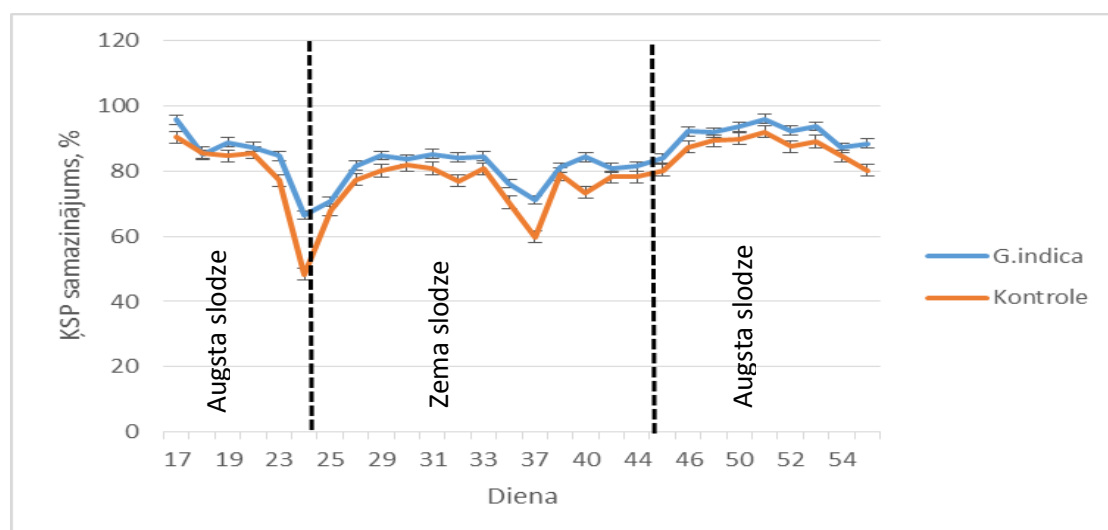
Figure 17 Average degradation efficiency of mildronate and zopiclone during fermentation in test reactors with *T. domesticum* bioaugmentation and w/o.

Tā bija vidēji fermentācijas laikā 1 – 2 % robežās ar kontroles variantu. Šie rezultāti uzskatāmi parāda, ka raugam *T. domesticum* piemīt augsta dzīvotspēja šādu notekūdeņu vidē, taču nebija novērojama saistība starp šūnu koncentrāciju reaktorā un ŪSP vai farmācijas vielu degradēšanas efektivitāti. To var skaidrot ar vieglāk degradējamu barības vielu klātbūtni reaktorā, kuru dēļ raugam nav vajadzības izmantot grūtāk šķeļamās farmācijas vielas. Papildus arī iepriekšējie eksperimenti uzrādīja, ka raugs sāk veikt būtisku vielu degradāciju tikai pēc 48h, tādējādi caurplūdes sistēma varētu būt nepiemērota šim organismam.

Pievienotā organisma mijiedarbība ar vides bioloģiskajiem un abiotiskajiem elementiem ir svarīgs tās efektivitātes faktors. Jauna celma pievienošana var dramatiski ietekmēt esošo mikrofloru ar inhibīcijas vai konkurences apstākļiem (El Fantroussi un Agathos, 2005). Iespējams tas notika bioaugmentācijā ar *T. domesticum*. Lielais rauga daudzums izveidoja nelabvēlīgu vidi citiem mikroorganismiem, kuri varētu piedalīties farmācijas vielu metabolismā un attīrīšanas efektivitātes uzlabošanā. Tas apstiprina apgalvojumu, ka bioaugmentācijas celmu aktivitāte un darbība *in situ* apstākļos var būt pretēja *in vitro* (Boon et al., 2000).

3.3.4 *Gibberella indica*

Sēnes *G.indica* bioaugmentācija pozitīvi ietekmēja ŪSP samazināšanas (18. attēls)

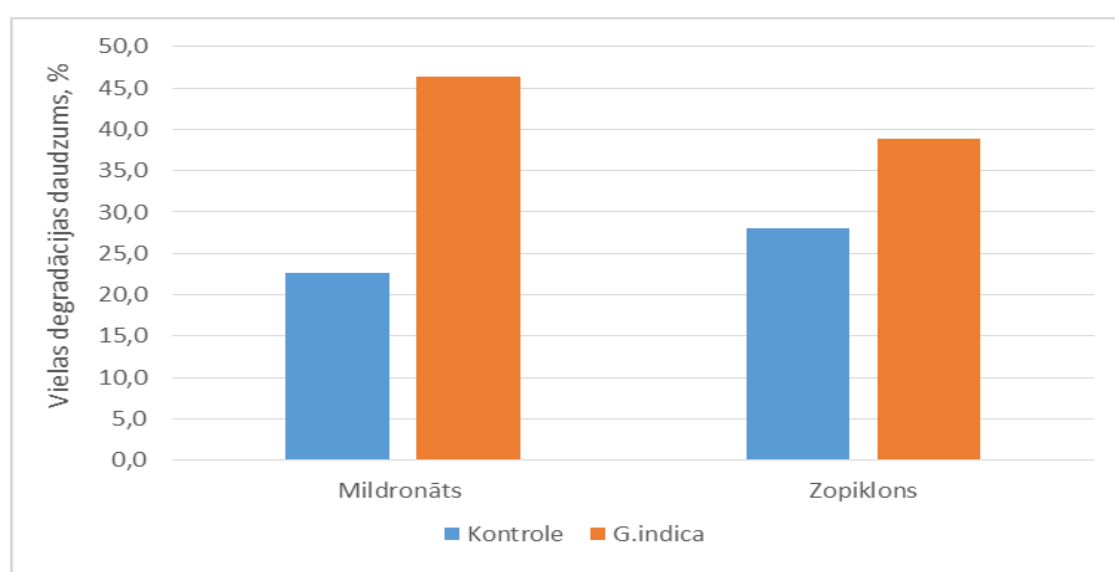


18. attēls ŪSP samazinājums starp ieplūdi un izplūdi testa reaktoros pie dažādām slodzēm ar *G.indica* bioaugmentāciju un kontroles, 54 kultivācijas dienu periodā.

Figure 18 COD removal efficiency during 54 day cultivation period between influent and effluent wastewater in test bioreactor system with *G.indica* bioaugmentation and w/o during variable loading stress.

efektivitāti simulētajā testa reaktorā. Šīs sēnes pievienošana vidēji palielināja ĶSP samazināšanos par 6% līdz kopējai efektivitātei 85% pretstatā kontroles 79%. Pieaugums bija pastāvīgs, novērojams gan pie zemas, gan augstas ieplūdes slodzes.

Papildus tika arī fiksēts palielināts vidējais zopiklona un mildronāta koncentrācijas samazinājums testa reaktorā (19. attēls). Augmentētais reaktors spēja noārdīt par 20 % vairāk mildronāta un par 10% vairāk zopiklona nekā kontrole. Tas ir ievērojams uzlabojums pār iepriekšējiem eksperimentiem, kur atšķirība starp aktīvo farmācijas vielu degradācijā bija tikai pāris procenti.

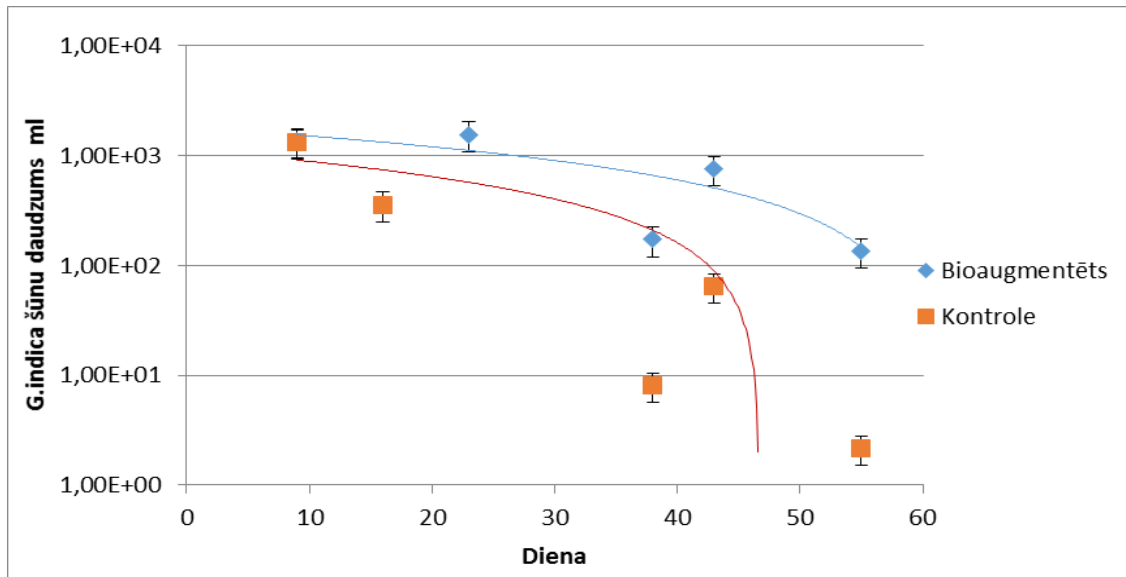


19. attēls Mildronāta un zopiklona vidējais degradācijas daudzums testa reaktoros ar *G.indica* bioaugmentāciju un kontroles.

Figure 19 Average degradation efficiency of mildronate and zopiclone during fermentation in test reactors with *G.indica* bioaugmentation and w/o.

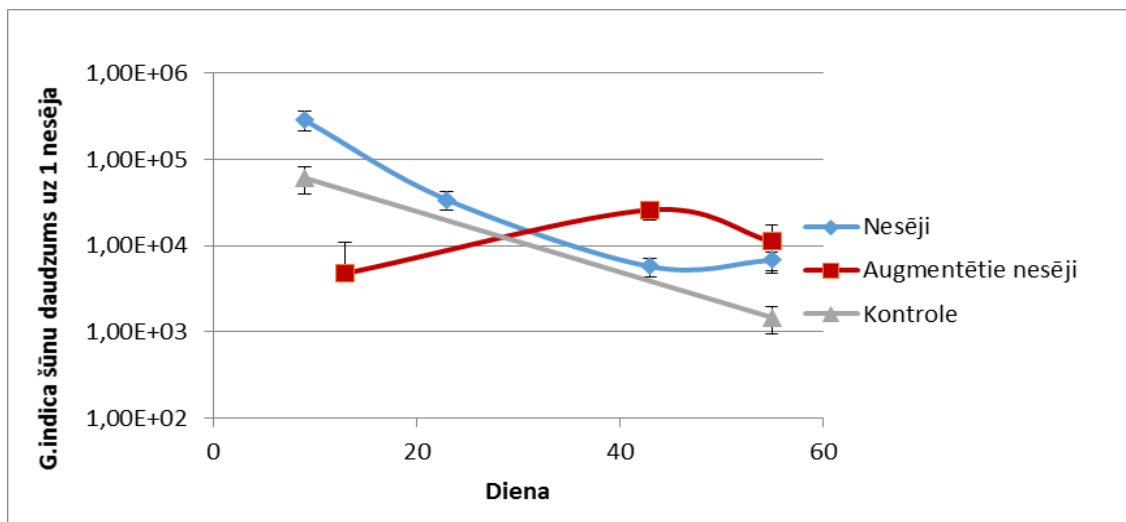
Diemžēl qPCR dati parādīja, ka notiek kultūras izskalošanās no reaktora (20., 21. attēls). Eksperimenta beigās *G.indica* daudzums bija krities suspensijā par 90% no sākotnējā. Augmentētajā reaktorā izskalošanās ātrums bija lēnāks pateicoties papildus dozēšanai, bet tāpat salīdzinoši ļoti augsts.

Sēnes koncentrācijas daudzums, pēc sākuma kultūras inokulācijas un kultivēšanas bez caurplūdes, bija testa reaktorā zems un pat pielīdzināms kontroles paraugam. Tas liecina, ka esošā vide vai mikrofloras stāvoklis nebija optimāls šīs sēnes ilgspejīgai augšanai un tai ir nepieciešami papildus faktoru uzlabojums, lai stimulētu tās dzīvotspēju.



20. attēls RT-qPCR rezultāti par *G.indica* šūnu koncentrāciju testa un kontroles reaktora suspensijā kultivācijas periodā

Figure 20 RT-qPCR results about *G.indica* concentration in test and control reactor suspension during cultivation



21. attēls RT-qPCR rezultāti par *G.indica* šūnu koncentrāciju uz sākotnēji augmentētajiem, esošajiem un kontroles reaktora nesējiem

Figure 21 RT-qPCR results about *G.indica* concentration on initially bioaugmented, native and control biofilm carrier

Kaut gan šūnu daudzums uz augmentētajiem nesējiem eksperimenta beigās uz nesējiem bija palielinājies, *G.indica* nebija spējīgs imobilizēties uz pārējiem reaktorā esošajiem nesējiem. Uz tiem sēnes daudzums samazinājās par 95% no sākotnējā. Neskatoties uz to, ka šī notekūdeņu vide nebija ideāli piemērota *G.indica*, tika iegūts paaugstināts K_{SP} un aktīvo farmācijas vielu degradācijas līmenis testa sistēmā. Tas nozīmē, ka pat neliels, izdzīvojošais sēnes daudzums bija spējīgs pozitīvi ietekmēt visu sistēmu un veiksmīgi realizēt bioaugmentāciju.

Tika arī veikta pārbaude, lai pārliecinātos, ka par iegūtu uzlabojumu, nav atbildīga barības vielu biostimulācija, kas iegūta no šķidrās barotnes, kurā tika audzēti mikroorganismu regulārajai papildus dozēšanai. Tas bija noteikts jaunai, bez papildus bioaugmentācijas, reaktoru sistēmai dozējot klāt tikai bagātinošo šķidro barotni (sabouraud dextrose liquid medium) ar identisku eksperimentā izmantoto plūsmas ātrumu. Reaktors tika darbināts trīs nedēļas, papildus ar kontroli. Kultivācijas periodā netika novērota ne ĶSP aizvākšanas, ne aktīvo farmācijas vielu uzlabojums testa sistēmai ar kontroli. Vienīgā atšķirība bija pieaugums testa reaktorā suspendēto dūņu biomasas par 10% (dati nav parādīti). Tas ļauj droši secināt, ka eksperimentā iegūtie uzlabojumi ir pateicoties *G.indica* bioaugmentācijai.

Kopvērtējumā skatoties, šajā pētījumā tika noteikts, ka augsta farmācijas vielu biodegradācija, līdzīgi kā tīrkultūru *in vitro* apstākļos, ir grūti panākama simulētos reālos apstākļos. Labākos rezultātus uzrādošie mikroorganismi ne vienmēr ir paši produktīvākie, nonākot *in situ* apstākļos. Bioaugmentācijas celmu efektivitāti būtiski ietekmē lielais izskalošanās ātrums. Tā novēršanai ir iespējams veikt regulāru kultūras pievienošanu un/vai imobilizāciju uz bioplēves nesējiem. Taču tas arī negarantē ilgtspējīgu mikroorganismu spēju izdzīvot un augt vidē. Molekulārās bioloģijas metodes qPCR pielietojums ļāva precīzi noteikt un analizēt vēlamā celma augšanas dinamiku vidē. Ir sarežģīti paredzēt pievienoto mikroorganismu mijiedarbību ar esošo mikrofloru pirms bioaugmentācijas veikšanas.

Secinājumi

1. No farmācijas notekūdeņu attīrīšanas iekārtas izdalītas un identificētas 10 baktēriju, 9 raugu un 4 micēlijsēņu tīrkultūras.
2. Izdalīto mikroorganismu tīrkultūras (*Sphingobacterium thalpophilum*, *Trichosporon domesticum*, *Fusarium solani*, *Gibberella indica*) spēj efektīvi noārdīt farmācijas vielas (zopiklonu, mildronātu un oksitocīnu) *in vitro* apstākļos.
3. Sēnēm *Fusarium solani* un *Gibberella indica* piemīt augsts bioaugmentācijas potenciāls. *G. indica* izmantošana uzlabo notekūdens ŪSP samazināšanos un farmācijas vielu degradāciju.
4. Papildus viegli izmantojama oglekļa avota (piena pulvera) pievienošana būtiski uzlabo farmācijas produktu degradāciju.
5. Raugam *Trichosporon domesticum* ir negatīva ietekme uz bioreaktora ŪSP samazināšanas efektivitāti.
6. Izmantojot RT-qPCR, konstatēts, ka bioaugmentācijā izmantotajiem baktēriju un sēņu celmiem ir augsts izskalošanās risks no testa reaktoriem, sevišķi īsa hidrauliskās aiztures laika (līdz 48 h) režīmā.

Pateicības

Vēlētos izteikt pateicības darba vadītājam Vizmai Nikolajevai par visu sniegto palīdzību šā darba tapšanā. Kā arī Dzintaram Rozītim , Elīnai Stradei, Reinim Kazulim un Zanei Dzenei par palīdzību darba izpildē. Pateicības jāizsaka arī recenzentam Dr. habil.biol. Aleksandram Rapoportam.

Pētījums veikts ar A/S Grindex starpniecību

Pētījums finansēts projekta „Vides, bioenerģētikas un biotehnoloģiju kompetences centrs” ietvaros, LIAA līguma numurs: L-KC-11-0005.

Izmantotā literatūra

- 1) Abd-Elsalam, K. A., Aly, I. N., Abdel-Satar, M. A., Khalil, M. S., & Verreet, J. A. (2004). PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *African Journal of Biotechnology*, 2(4), 82-85.
- 2) Aguado, D., Montoya, T., Borrás, L., Seco, A., & Ferrer, J. (2008). Using SOM and PCA for analysing and interpreting data from a P-removal SBR. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, 21(6), 919-930.
- 3) Anyakora, C., Nwaeze, K., Awodele, O., Nwadike, C., Arbabi, M., & Coker, H. (2011). Concentrations of heavy metals in some pharmaceutical effluents in Lagos, Nigeria. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3(2), 25-31.
- 4) Arif, M., Chawla, S., Zaidi, M. W., Rayar, J. K., Variar, M., & Singh, U. S. (2014). Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1 α) gene. *African Journal of Biotechnology*, 11(2), 444-447.
- 5) Bajaj, M., Gallert, C., & Winter, J. (2008). Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor. *Bioresource Technology*, 99(17), 8376-8381.
- 6) Balcioglu, I. A., & Ötker, M. (2003). Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ processes. *Chemosphere*, 50(1), 85-95.
- 7) Bart, H. J., & Pilz, S. (2011). Industrial scale natural products extraction. Weinheim: John Wiley & Sons, 3-57.
- 8) Bart, H. J., Hagels, H. J., Kaßing, M., Jenelten, U., Johannsbauer, W., Jordan, V., & Strube, J. (2012). Positionspapier der Fachgruppe Phytoextrakte-Produkte und Prozesse.
- 9) Betancur-Corredor, B., Pino, N. J., Cardona, S., & Peñuela, G. A. (2014). Evaluation of biostimulation and Tween 80 addition for the bioremediation of long-term DDT-contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, 28, 101–109.

- 10) Boon, N., De Gelder, L., Lievens, H., Siciliano, S. D., Top, E. M., & Verstraete, W. (2002). Bioaugmenting bioreactors for the continuous removal of 3-chloroaniline by a slow release approach. *Environmental Science & Technology*, 36(21), 4698-4704.
- 11) Boon, N., Goris, J., De Vos, P., Verstraete, W., & Top, E. M. (2000). Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, *I2gfp*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2906-2913.
- 12) Bressan, M., Gattin, I. T., Desaire, S., Castel, L., Gangneux, C., & Laval, K. (2015). A rapid flow cytometry method to assess bacterial abundance in agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 88, 60-68.
- 13) Brunner, G. (2009). Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 373-381.
- 14) Calabrò, V. (2013). Handbook of Membrane Reactors: Reactor Types and Industrial Applications Reactor Types and Industrial Applications. Volume 2. India: Woodhead Publishing Series in Energy, 3–53.
- 15) Chang, C. Y., Chang, J. S., Vigneswaran, S., & Kandasamy, J. (2008). Pharmaceutical wastewater treatment by membrane bioreactor process—a case study in southern Taiwan. *Desalination*, 234(1), 393-401.
- 16) Chang, J. S., Chou, C., & Chen, S. Y. (2001). Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*. *Process Biochemistry*, 36(8), 757-763.
- 17) Chen, B. Y., Chen, S. Y., & Chang, J. S. (2005). Immobilized cell fixed-bed bioreactor for wastewater decolorization. *Process Biochemistry*, 40(11), 3434-3440.
- 18) Chen, Z., Ren, N., Wang, A., Zhang, Z. P., & Shi, Y. (2008). A novel application of TPAD–MBR system to the pilot treatment of chemical synthesis-based pharmaceutical wastewater. *Water Research*, 42(13), 3385-3392.
- 19) Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., & Kroiss, H. (2005). Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine

disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research*, 39(19), 4797-4807.

20) Collins P.J., Dobson A.D.W., 1997. Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3444-3450.

21) Da Silva, M. L., & Alvarez, P. J. (2004). Enhanced anaerobic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzene-xylene-ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4720-4726.

22) de Cazes, M., Belleville, M. P., Mougel, M., Kellner, H., & Sanchez-Marcano, J. (2015). Characterization of laccase-grafted ceramic membranes for pharmaceuticals degradation. *Journal of Membrane Science*, 476, 384-393.

23) Deegan, A. M., Shaik, B., Nolan, K., Urell, K., Oelgemöller, M., Tobin, J., & Morrissey, A. (2011). Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 8(3), 649-666.

24) Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E. M., & Verstraete, W. (2001). Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environmental Microbiology*, 3(10), 649-657.

25) Di Toro, S., Zanaroli, G., & Fava, F. (2006). Intensification of the aerobic bioremediation of an actual site soil historically contaminated by polychlorinated biphenyls (PCBs) through bioaugmentation with a non acclimated, complex source of microorganisms. *Microbial Cell Factories*, 5(1), 11.

26) Dias, J. M., Alvim-Ferraz, M. C., Almeida, M. F., Rivera-Utrilla, J., & Sánchez-Polo, M. (2007). Waste materials for activated carbon preparation and its use in aqueous-phase treatment: a review. *Journal of Environmental Management*, 85(4), 833-846.

27) Doll, T. E., & Frimmel, F. H. (2004). Kinetic study of photocatalytic degradation of carbamazepine, clofibric acid, iomeprol and iopromide assisted by

different TiO₂ materials—determination of intermediates and reaction pathways. *Water Research*, 38(4), 955-964.

28) Dueholm, M. S., Marques, I. G., Karst, S. M., D'Imperio, S., Tale, V. P., Lewis, D., & Nielsen, J. L. (2015). Survival and activity of individual bioaugmentation strains. *Bioresource Technology*, 186, 192-199.,

29) Dybas, M. J., Hyndman, D. W., Heine, R., Tiedje, J., Linning, K., Wiggert, D., ... & Criddle, C. S. (2002). Development, operation, and long-term performance of a full-scale biocurtain utilizing bioaugmentation. *Environmental Science & Technology*, 36(16), 3635-3644.

30) Eggen, T., & Vogelsang, C. (2015). *Comprehensive Analytical Chemistry*. India: Elsevier, 245-294.

31) El Fantroussi, S., & Agathos, S. N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Current Opinion in Microbiology*, 8(3), 268-275.

32) Fabig W. (2011). The microbial community associated with the ambrosia beetle *Xyleborinus saxeseni* and its influence on the growth of the mutualistic fungus. *Master Thesis*, Universität Hohenheim, 1-82.

33) Falamarzian, S., Tavakoli, O., Zarghami, R., & Faramarzi, M. A. (2014). Catalytic hydrothermal treatment of pharmaceutical wastewater using sub-and supercritical water reactions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 265-272.

34) Fatta-Kassinos, D., Meric, S., & Nikolaou, A. (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(1), 251-275.

35) Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J. L., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 17.

36) Fouratt, M. A., Rhodes, J. S., Smithers, C. M., Love, N. G., & Stevens, A. M. (2003). Application of temperature gradient gel electrophoresis to the characterization of a nitrifying bioaugmentation product. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(2), 277-286.

- 37) Gaillot, J., Heusse, D., Houghton, G. W., Marc Aurele, J., & Dreyfus, J. F. (1983). Pharmacokinetics and metabolism of zopiclone. *Pharmacology*, 27(2), 76-91.
- 38) Gaur, R., Sharma, A., Khare, S. K., & Gupta, M. N. (2007). A novel process for extraction of edible oils: Enzyme assisted three phase partitioning (EATPP). *Bioresource Technology*, 98(3), 696-699.
- 39) Gentry, T. J., Josephson, K. L., & Pepper, I. L. (2004). Functional establishment of introduced chlorobenzoate degraders following bioaugmentation with newly activated soil. *Biodegradation*, 15(1), 67-75.
- 40) Gernaey, K. V., Cervera-Padrell, A. E., & Woodley, J. M. (2012). A perspective on PSE in pharmaceutical process development and innovation. *Computers & Chemical Engineering*, 42, 15-29.
- 41) Ghafoor, K., Hui, T., & Choi, Y. H. (2011). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total anthocyanins from grape peel using response surface methodology. *Journal of Food Biochemistry*, 35(3), 735-746.
- 42) Hartig, C., Ernst, M., & Jekel, M. (2001). Membrane filtration of two sulphonamides in tertiary effluents and subsequent adsorption on activated carbon. *Water Research*, 35(16), 3998-4003.
- 43) Helmig, E., Fettig, J., & Cordone, L. (2007). API Removal from Pharmaceutical Manufacturing Wastewater—Results of Process Development. *Pilot-Testing, and Scale-Up WEF Session, Rhode Island*.
- 44) Herrero, M., & Stuckey, D. C. (2014). Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere, in press*.
- 45) Hoerger, C. C., Dörr, B., Schlienger, C., & Straub, J. O. (2009). Environmental risk assessment for the galenical formulation of solid medicinal products at Roche Basle, Switzerland. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 5(2), 331-337.
- 46) Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2012). Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and

environmental implications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(9), 2611-2624.

47) Huiying, C. H. E. N., Mingxia, W. A. N. G., Yubin, S. H. E. N., & Shanjing, Y. A. O. (2014). Optimization of Two-species Whole-cell Immobilization System Constructed with Marine-derived Fungi and Its Biological Degradation Ability. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 22(2), 187-192.

48) Ikehata, K., Gamal El-Din, M., & Snyder, S. A. (2008). Ozonation and advanced oxidation treatment of emerging organic pollutants in water and wastewater. *Ozone: Science and Engineering*, 30(1), 21-26.

49) Jaeger, E. E., Carroll, N. M., Choudhury, S., Dunlop, A. A., Towler, H. M., Matheson, M. M., ... & Lightman, S. (2000). Rapid Detection and Identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* Species in Ocular Samples Using Nested PCR. *Journal of clinical microbiology*, 38(8), 2902-2908.

50) Jaeger, E.E.M., Carrol N.M., Choudhury S., Dunlop A.A.S., Towler H.M.A., Matheson M.M., Adamson P., Okhravi N., Lightman S. (2000). Rapid Detection and Identification of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium* Species in Ocular Samples Using Nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2902.

51) Judd, S., Judd C. (2010). The MBR book: principles and applications of membrane bioreactors for water and wastewater treatment. India: Elsevier, 277-299.

52) Karanfil, T., & Dastgheib, S. A. (2004). Trichloroethylene adsorption by fibrous and granular activated carbons: aqueous phase, gas phase, and water vapor adsorption studies. *Environmental Science & Technology*, 38(22), 5834-5841.

53) Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical analysis*, 13(2), 105-113.

54) Kessler, R. (2010). Pharmaceutical factories as a source of drugs in water. *Environmental Health Perspectives*, 118(9), 383.

- 55) Kim, E. H., Dwidar, M., Mitchell, R. J., & Kwon, Y. N. (2013). Assessing the effects of bacterial predation on membrane biofouling. *Water Research*, 47(16), 6024-6032.
- 56) Kim, S. K., Kong, I., Lee, B. H., Kang, L., Lee, M. G., & Suh, K. H. (2000). Removal of ammonium-N from a recirculation aquacultural system using an immobilized nitrifier. *Aquacultural Engineering*, 21(3), 139-150.
- 57) Klavarioti, M., Mantzavinos, D., & Kassinos, D. (2009). Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International*, 35(2), 402-417.
- 58) Košutić, K., Dolar, D., Ašperger, D., & Kunst, B. (2007). Removal of antibiotics from a model wastewater by RO/NF membranes. *Separation and Purification Technology*, 53(3), 244-249.
- 59) Kruse, A., & Dinjus, E. (2007). Hot compressed water as reaction medium and reactant: properties and synthesis reactions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 39(3), 362-380.
- 60) Kulik, N., Trapido, M., Goi, A., Veressinina, Y., & Munter, R. (2008). Combined chemical treatment of pharmaceutical effluents from medical ointment production. *Chemosphere*, 70(8), 1525-1531.
- 61) Le-Clech, P., Chen, V., & Fane, T. A. (2006). Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, 284(1), 17-53.
- 62) Leenen, E. J., Dos Santos, V. A., Grolle, K. C., Tramper, J., & Wijffels, R. (1996). Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Water Research*, 30(12), 2985-2996.
- 63) Leung, I. K., Krojer, T. J., Kochan, G. T., Henry, L., von Delft, F., Claridge, T. D., ... & Schofield, C. J. (2010). Structural and mechanistic studies on γ -butyrobetaine hydroxylase. *Chemistry & Biology*, 17(12), 1316-1324.
- 64) Lishman, L., Smyth, S. A., Sarafin, K., Kleywegt, S., Toito, J., Peart, T., ... & Seto, P. (2006). Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal

care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Science of the Total Environment*, 367(2), 544-558.

65) Liu, C., Caothien, S., Hayes, J., Caothuy, T., Otoyoy, T., & Ogawa, T. (2001). Membrane chemical cleaning: from art to science. *Pall Corporation, Port Washington, NY*.

66) Liu, X., & Yu, G. (2006). Combined effect of microwave and activated carbon on the remediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil. *Chemosphere*, 63(2), 228-235.

67) Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D., & Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, 35(18), 120.

68) Lu, P. J., Lin, H. C., Yu, W. T., & Chern, J. M. (2011). Chemical regeneration of activated carbon used for dye adsorption. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(2), 305-311.

69) Lui Z., Lozupone C., Hamady M., Bushman F. D., Knight R., (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, 35, 1-10.

70) Malenka, R. C., Nestler, E. J., Hyman, S. E., Sydor, A., & Brown, R. Y. (2009). *Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience*. ASV: McGraw-Hill Medical.

71) Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2007). Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 71(1), 7-14.

72) Maroto-Valer, M. M., Dranca, I., Clifford, D., Lupascu, T., Nastas, R., & y Leon, C. A. L. (2006). Thermal regeneration of activated carbons saturated with ortho-and meta-chlorophenols. *Thermochimica Acta*, 444(2), 148-156.

73) Martínez, J. L., Liu, L., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2012). Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood

proteins by microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(6), 965-971.

74) Marulanda, V., & Bolaños, G. (2010). Supercritical water oxidation of a heavily PCB-contaminated mineral transformer oil: Laboratory-scale data and economic assessment. *The Journal of Supercritical Fluids*, 54(2), 258-265.

75) Mertens, B., Boon, N., & Verstraete, W. (2005). Stereospecific effect of hexachlorocyclohexane on activity and structure of soil methanotrophic communities. *Environmental Microbiology*, 7(5), 660-669.

76) Mesapogu S., Babu B.K., Bakshi A., Reddy S.S., Saxena S., Srivastava A.K., Aron D.K., (2011). Rapid detection and quantification of *Fusarium udum* in soil and plant samples using real-time PCR. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 2, 107 – 111.

77) Mesapogu, S. (2011). Rapid detection and quantification of *Fusarium udum* in soil and plant samples using real-time PCR. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*. 2, 1-7.

78) Mompelat, S., Le Bot, B., & Thomas, O. (2009). Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment International*, 35(5), 803-814.

79) Morris, R., Schauer-Gimenez, A., Bhattad, U., Kearney, C., Struble, C. A., Zitomer, D., & Maki, J. S. (2014). Methyl coenzyme M reductase (*mcrA*) gene abundance correlates with activity measurements of methanogenic H₂/CO₂-enriched anaerobic biomass. *Microbial Biotechnology*, 7(1), 77-84.

80) Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2), 183-198.

81) Munoz, I., Peral, J., Ayllon, J. A., Malato, S., Passarinho, P., & Domènech, X. (2006). Life cycle assessment of a coupled solar photocatalytic–biological process for wastewater treatment. *Water Research*, 40(19), 3533-3540.

82) Novotný, Č., Erbanova, P., Cajthaml, T., Rothschild, N., Dosoretz, C., & Šašek, V. (2000). *Irpex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6), 850-853.

- 83) Oaks, J. L., Gilbert, M., Virani, M. Z., Watson, R. T., Meteyer, C. U., Rideout, B. A., & Khan, A. A. (2002). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 427(1), 630–633.
- 84) Oliveira, A. L., Pozza, L. N. L., Santos, D. N., Kamimura, E. S., Vicente, E., & Cabral, F. A. (2013). Supercritical extraction of coumarin from guaco (*Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*) for pharmaceutical applications. *The Journal of Supercritical Fluids*, 83, 65-71.
- 85) O'Sullivan, D. J. (2001). Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1751-1760.
- 86) Parsons, B. (2012). Sterilisation of healthcare products by ionising radiation: sterilisation of drug-device products and tissue allografts. *Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices*, India: Elsevier, 212 – 245.
- 87) Patureau, D., Helloin, E., Rustrian, E., Bouchez, T., Delgenes, J. P., & Moletta, R. (2001). Combined phosphate and nitrogen removal in a sequencing batch reactor using the aerobic denitrifier, *Microvirgula aerodenitrificans*. *Water Research*, 35(1), 189-197.
- 88) Perez-Vega, S., Ortega-Rivas, E., Salmeron-Ochoa, I., & Sharratt, P. N. (2013). A system view of solvent selection in the pharmaceutical industry: towards a sustainable choice. *Environment, Development and Sustainability*, 15(1), 1-21.
- 89) Phillips, P. J., Smith, S. G., Kolpin, D. W., Zaugg, S. D., Buxton, H. T., Furlong, E. T., ... & Stinson, B. (2010). Pharmaceutical formulation facilities as sources of opioids and other pharmaceuticals to wastewater treatment plant effluents. *Environmental Science & Technology*, 44(13), 4910-4916.
- 90) Ping Chu, H., & Li, X. Y. (2005). Membrane fouling in a membrane bioreactor (MBR): sludge cake formation and fouling characteristics. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(3), 323-331.
- 91) Pingali, K. C., & Mendez, R. (2014). Assessing distribution of nanosmears due to mutual interaction of additives in high shear mixing of

pharmaceutical blends. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 85, 248-255.

92) Pino, M. R., Val, J., Mainar, A. M., Zuriaga, E., Español, C., & Langa, E. (2015). Acute toxicological effects on the earthworm *Eisenia fetida* of 18 common pharmaceuticals in artificial soil. *Science of The Total Environment*, 518, 225-237.

93) Porro, D., Gasser, B., Fossati, T., Maurer, M., Branduardi, P., Sauer, M., & Mattanovich, D. (2011). Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 939-948.

94) Quezada, M. A., Carballeira, J. D., & Sinisterra, J. V. (2009). *Monascus kaoliang* CBS 302.78 immobilized in polyurethane foam using isopropanol as co-substrate: Optimized immobilization conditions of a fungus as biocatalyst for the reduction of ketones. *Bioresource Technology*, 100(6), 2018-2025.

95) Quintana, J. B., Weiss, S., & Reemtsma, T. (2005). Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research*, 39(12), 2654-2664.

96) Raj, D. S. S., & Anjaneyulu, Y. (2005). Evaluation of biokinetic parameters for pharmaceutical wastewaters using aerobic oxidation integrated with chemical treatment. *Process Biochemistry*, 40(1), 165-175.

97) Ravikumar, Y. V. L., Kalyani, S., Satyanarayana, S. V., & Sridhar, S. (2014). Processing of pharmaceutical effluent condensate by nanofiltration and reverse osmosis membrane techniques. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(1), 50-56.

98) Reineke, W. (1998). Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly. *Annual Reviews in Microbiology*, 52(1), 287-331.

99) Renker, C., Heinrichs J., Kaldorf M., Buscot F., (2003). Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. *Mycorrhiza*, 13, 191-198.

- 100) Rosal, R., Gonzalo, M. S., Boltes, K., Letón, P., Vaquero, J. J., & García-Calvo, E. (2009). Identification of intermediates and assessment of ecotoxicity in the oxidation products generated during the ozonation of clofibric acid. *Journal of Hazardous Materials*, 172(2), 1061-1068.
- 101) Rostron, W. M., Stuckey, D. C., & Young, A. A. (2001). Nitrification of high strength ammonia wastewaters: comparative study of immobilisation media. *Water Research*, 35(5), 1169-1178.
- 102) Rozitis, D., & Strade, E. (2015). COD reduction ability of microorganisms isolated from highly loaded pharmaceutical wastewater pre-treatment process. *Journal of Materials and Environmental Science*, 6(2), 507-512.
- 103) Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001. ASV : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 12 – 44.
- 104) Sanchez, S. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology*. ASV: Academic Press, 778-784.
- 105) Sandle, T. (2013). *Sterility, sterilisation and sterility assurance for pharmaceuticals: Technology, validation and current regulations*. India: Elsevier, 1-20.
- 106) Saravanane, R., Murthy, D. V. S., & Krishnaiah, K. (2001). Bioaugmentation and treatment of cephalexin drug-based pharmaceutical effluent in an upflow anaerobic fluidized bed system. *Bioresource Technology*, 76(3), 279-281.
- 107) Saritha, P., Aparna, C., Himabindu, V., & Anjaneyulu, Y. (2007). Comparison of various advanced oxidation processes for the degradation of 4-chloro-2 nitrophenol. *Journal of Hazardous Materials*, 149(3), 609-614.
- 108) Semrany, S., Favier, L., Djelal, H., Taha, S., & Amrane, A. (2012). Bioaugmentation: possible solution in the treatment of bio-refractory organic compounds (Bio-ROCs). *Biochemical Engineering Journal*, 69, 75-86.b
- 109) Shemer, H., Kunukcu, Y. K., & Linden, K. G. (2006). Degradation of the pharmaceutical metronidazole via UV, Fenton and photo-Fenton processes. *Chemosphere*, 63(2), 269-276.

- 110) Shivajirao, P. A. (2012). Treatment of distillery wastewater using membrane technologies. *International Journal of Advanced Engineering Research and Studies*, 1, 275-283.
- 111) Siripattanakul-Ratpukdi, S. (2014). Phenolic based pharmaceutical contaminated wastewater treatment kinetics by activated sludge process. *Journal of Clean Energy Technologies*, 2(2).
- 112) Slater, F. R., Singer, A. C., Turner, S., Barr, J. J., & Bond, P. L. (2011). Pandemic pharmaceutical dosing effects on wastewater treatment: no adaptation of activated sludge bacteria to degrade the antiviral drug Oseltamivir (Tamiflu®) and loss of nutrient removal performance. *FEMS Microbiology Letters*, 315(1), 17-22.
- 113) Snyder, S. A., Adham, S., Redding, A. M., Cannon, F. S., DeCarolis, J., Oppenheimer, J., ... & Yoon, Y. (2007). Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination*, 202(1), 156-181.
- 114) Sreekanth, D., Sivaramakrishna, D., Himabindu, V., & Anjaneyulu, Y. (2009). Thermophilic treatment of bulk drug pharmaceutical industrial wastewaters by using hybrid up flow anaerobic sludge blanket reactor. *Bioresource Technology*, 100(9), 2534-2539.
- 115) Sugita T., Nishikawa A., Shinoda T., (1998). Rapid Detection of Species of the Opportunistic Yeast *Trichosporon* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1458-1460.
- 116) Suresh, P. S., Kumar, A., Kumar, R., & Singh, V. P. (2008). An Insilco approach to bioremediation: Laccase as a case study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 26(5), 845-849.
- 117) Takahashi, H., Li, B., Sasaki, T., Miyazaki, C., Kajino, T., & Inagaki, S. (2000). Catalytic activity in organic solvents and stability of immobilized enzymes depend on the pore size and surface characteristics of mesoporous silica. *Chemistry of Materials*, 12(11), 3301-3305.

- 118) Tale, V. P., Maki, J. S., Struble, C. A., & Zitomer, D. H. (2011). Methanogen community structure-activity relationship and bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters. *Water Research*, 45(16), 5249-5256.
- 119) Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), 211-222.
- 120) Toepfl, S., Mathys, A., Heinz, V., & Knorr, D. (2006). Review: potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing. *Food Reviews International*, 22(4), 405-423.
- 121) Urase, T., Kagawa, C., & Kikuta, T. (2005). Factors affecting removal of pharmaceutical substances and estrogens in membrane separation bioreactors. *Desalination*, 178(1), 107-113..
- 122) van den Brink, P., Vergeldt, F., Van As, H., Zwijnenburg, A., Temmink, H., & van Loosdrecht, M. C. (2013). Potential of mechanical cleaning of membranes from a membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*, 429, 259-267.
- 123) van der Ven, K., Keil, D., Moens, L. N., Van Hummelen, P., van Remortel, P., Maras, M., & De Coen, W. (2008). Effects of the antidepressant mianserin in zebrafish: Molecular markers of endocrine disruption. *Chemosphere*, 65(10), 1836-1845.
- 124) Wang, M., Yang, G., Min, H., Lv, Z., & Jia, X. (2009). Bioaugmentation with the nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. HF-1 in a sequencing batch reactor treating tobacco wastewater: degradation study and analysis of its mechanisms. *Water Research*, 43(17), 4187-4196.
- 125) Watanabe, K., Teramoto, M., & Harayama, S. (2002). Stable augmentation of activated sludge with foreign catabolic genes harboured by an indigenous dominant bacterium. *Environmental Microbiology*, 4(10), 577-583.
- 126) Watkinson, A. J., Murby, E. J., & Costanzo, S. D. (2007). Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for

environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research*, 41(18), 4164-4176.

127) Weingärtner, H., & Franck, E. U. (2005). Supercritical water as a solvent. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(18), 2672-2692.

128) Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S., & Wert, E. (2005). Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environmental Science & Technology*, 39(17), 6649-6663.

129) Wittebolle, L., Boon, N., Vanparys, B., Heylen, K., De Vos, P., & Verstraete, W. (2005). Failure of the ammonia oxidation process in two pharmaceutical wastewater treatment plants is linked to shifts in the bacterial communities. *Journal of Applied Microbiology*, 99(5), 997-1006.

130) Wong, K. K., Richardson, J. D., & Mansfield, S. D. (2000). Enzymatic treatment of mechanical pulp fibers for improving papermaking properties. *Biotechnology Progress*, 16(6), 1025-1029.

131) Yaghmaeian, K., Moussavi, G., & Alahabadi, A. (2014). Removal of amoxicillin from contaminated water using NH₄Cl-activated carbon: continuous flow fixed-bed adsorption and catalytic ozonation regeneration. *Chemical Engineering Journal*, 236, 538-544.

132) Yu, F. B., Ali, S. W., Guan, L. B., Li, S. P., & Zhou, S. (2010). Bioaugmentation of a sequencing batch reactor with *Pseudomonas putida* ONBA-17, and its impact on reactor bacterial communities. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1), 20-26.

133) Yu, Z., & Mohn, W. W. (2002). Bioaugmentation with the resin acid-degrading bacterium *Zoogloea resiniphila* DhA-35 to counteract pH stress in an aerated lagoon treating pulp and paper mill effluent. *Water Research*, 36(11), 2793-2801.

134) Zhang, J., Li, J., Chen, L., & Thring, R. W. (2011). Remediation of refinery oily sludge using isolated strain and biosurfactant. In *Water Resource and*

Environmental Protection (ISWREP), 2011 International Symposium on (Vol. 3, 1649-1653). IEEE.

135) Zhang, Y., & Zhou, J. L. (2005). Removal of estrone and 17 β -estradiol from water by adsorption. *Water Research*, 39(16), 3991-4003.

136) Zhang, Z., Yan, Y., Zhang, L., Chen, Y., & Ju, S. (2014). CFD investigation of CO₂ capture by methyldiethanolamine and 2-(1-piperazinyl)-ethylamine in membranes: Part B. Effect of membrane properties. *Journal of Natural Gas Science and Engineering*, 19, 311-316.

Maģistra darbs „Bioaugmentācijas izmantošana farmācijas notekūdeņu attīrīšanas efektivitātes uzlabošanai” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors : Miks Neibergs

5.06.2015

Rekomendēju darba aizstāvēšanai

5.06.2015

Vadītājs : Dr. biol., vad. pētn., doc. Vizma Nikolajeva

Recenzents : Dr. habil.biol. Aleksandrs Rapoportis

Darbs iesniegts Bioloģijas fakultātē

5.06.2015

Metodiķe :

Darbs aizstāvēts 12.06.2015., prot. Nr.

, vērtējums

Sekretāre: