



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»  
(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2025 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

МАРТИНЕНКО Ярослава Олеговича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання біомаси *Arthrobacter* sp. для розкладання пестицидів

керівник роботи РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович, к.т.н., доц.,  
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 27 березня 2025 року № 188-к

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи Продукт: біомаса. Продукцент: *Arthrobacter* sp.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика цільового продукту біосинтезу. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. Техніко-економічне обґрунтування. Біосинтез препарату *Arthrobacter* sp. Обґрунтування вибору технологічної схеми. Специфікація виробництва для біопрепарату *Arthrobacter* sp. LY-1. Опис технологічної схеми біосинтезу біопрепарату *Arthrobacter* sp. LY-1. Отримання біопрепарату для біологічного очищення ґрунту. Контроль стадій культивування *Arthrobacter* sp. LY-1.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема формату А2 (2 листи). Технологічна схема формату А2 (1 лист).

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 р.

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту біосинтезу	01.03.25 – 09.03.25	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	10.03.25 – 19.03.25	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	21.03.25- 06.04.25	
4.	Біосинтез препарату <i>Arthrobacter</i> sp.	07.04.25- 10.04.25	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	12.04.25 – 15.04.25	
6.	Специфікація виробництва для біопрепарату <i>Arthrobacter</i> sp. LY-1	16.04.25 – 25.04.25	
7.	Опис технологічної схеми біосинтезу біопрепарату <i>Arthrobacter</i> sp. LY-1	26.04.25 – 30.04.25	
8.	Отримання біопрепарату для біологічного очищення ґрунту	01.05.25 – 07.05.25	
9.	Контроль стадій культивування <i>Arthrobacter</i> sp. LY-1	09.05.25 - 11.05.25	
10.	Оформлення графічної частини	12.05.25 - 28.05.25	

**Здобувач** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Керівник роботи** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Ярослав МАРТИНЕНКО** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

**Юрій РЕЗНІЧЕНКО** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

## ABSTRACT

This qualification work is devoted to the development of a technological scheme for the biosynthesis of a biological preparation using a new strain of atrazine-degrading bacteria *Arthrobacter* sp. LY-1. Based on an extensive analysis and comparison of foreign highly effective *Arthrobacter* strains, the composition of nutrient media for their cultivation, the activity of the atrazine-degrading complex, and the results of field studies, the *Arthrobacter* sp. LY-1 strain was selected, which is characterized by the cheapness of the nutrient medium for cultivation and the high efficiency of atrazine degradation on a wide range of soil types.

The technological scheme for the biosynthesis of a biological preparation includes preparatory work (preparation of a hydrochloric acid solution for acidifying the medium during sterilization, preparation of a NaOH solution to control the pH of the medium, sterilization of nutrient medium compositions) and the main technological process (three stages of growing seed material and biosynthesis in a fermenter with a volume of 1.25 m<sup>3</sup> with a filling factor of 0.6). And the hardware scheme, which includes 25 items and includes auxiliary equipment for sterilization and preparation of compositions, as well as preparation of aeration air. The technology of fertilizer production involves the use of a single-stage cultivation scheme by a deep periodic method.

The choice of detergents and disinfectants is justified. The scheme for obtaining a biological preparation includes weighing all components, preparation of a biological preparation, packaging, labeling and packaging.

The qualification work consists of an introduction, nine chapters, 84 sources used, 124 pages, 17 tables, 10 images, 1 hardware scheme (A2) and a technological scheme (A2).

*Keywords:* biological preparation, herbicide atrazine, atrazine-degrading complex, *Arthrobacter* sp. LY-1, cultivation, nutrient medium, spectrophotometry, packaging.

## РЕФЕРАТ

Ця кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічної схеми біосинтезу біопрепарату з використанням нового штаму атразиндеградуючих бактерій *Arthrobacter* sp. LY-1. На основі широкого аналізу та порівняння закордонних високоефективних штамів *Arthrobacter*, складу поживних середовищ для їх культивування, активності атразиндеградуючого комплексу та результатах у польових, дослідженнях було обрано штам *Arthrobacter* sp. LY-1, який відзначається дешевістю поживного середовища для культивування та високою ефективністю деградації атразину на широкому спектрі різновидів ґрунтів.

Технологічна схема біосинтезу біопрепарату включає підготовчі роботи (підготовка розчину соляної кислоти для підкислення середовища під час стерилізації, підготовка розчину NaOH, для контролю рН середовища, стерилізація композицій поживних середовищ) та основний технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтезу у ферментері об'ємом 1.25 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6). Та апаратну схему, що включає 25 найменувань та включає допоміжне обладнання для стерилізації та підготовки композицій, а також підготовку аераційного повітря. Технологія виробництва добрива передбачає використання одностадійної схеми культивування глибинним періодичним способом.

Обґрунтовано вибір миючих та дезінфікуючих засобів. Схема одержання біопрепарату включає зважування всіх компонентів, приготування біопрепарату, фасування, маркування та пакування.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів, 84 використаних джерел, 124 сторінки, 17 таблиць, 10 зображень, 1 апаратної схеми (A2) та технологічної схеми (A2).

**Ключові слова:** біопрепарат, гербіцид атразин, атразиндеградуючий комплекс, *Arthrobacter* sp. LY-1, культивування, поживне середовище, спектрофотометрія, фасування.

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ .....	10
1.1. Хімічний склад цільового продукту .....	10
1.2. Механізм біологічної дії.....	11
1.3. Сфери застосування .....	12
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	14
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента для розкладання атразину .....	14
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для культивування <i>Arthrobacter sp. LY-1</i> .....	19
2.3. Морфолого-культуральні ознаки <i>Arthrobacter sp.</i> .....	22
2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки <i>Arthrobacter sp.</i> .....	23
2.5. Таксономічний статус <i>Arthrobacter sp.</i> .....	24
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	25
3.1. Розрахунок потреби у біопрепараті для розкладання атразину .....	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва біопрепарату для розкладання атразину.....	26
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.....	27
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	28
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ПРЕПАРАТУ <i>ARTHROBACTER sp.</i> .....	32
4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату у <i>Arthrobacter sp.</i> .....	32
4.2. Біотрансформація крохмалю у екзопротеїни <i>A. sp. AtzA,B,C,D,E,F.</i> .....	34
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	40
5.1. Обґрунтування умов культивування і типу ферментера .....	40
5.2. Обґрунтування системи аерації для ефективного культивування <i>Arthrobacter sp.</i> .....	42
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів .....	43
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів для біотехнологічного виробництва .....	43
5.3.2. Обґрунтування вибору дезінфікуючих засобів.....	52
5.3.3. Розрахунки витрат мийних та дезінфікуючих засобів для біотехнологічного виробництва .....	53

5.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.....	60
5.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	61
5.4.2. Приготування поживного середовища для одержання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 15 літрів.....	63
5.4.3. Приготування поживного середовища для створення посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 150 літрів.....	64
5.4.4. Приготування поживного середовища для виробничої ферментації в ферментері об'ємом 1.25 м <sup>3</sup> .....	65
5.5. Підготовка та стерилізація допоміжних розчинів.....	66
5.5.1. Обґрунтування та приготування 6%-го розчину HCl.....	66
5.5.2. Обґрунтування та підготовка з стерилізацією 6% розчину NaOH.....	68
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА БІОПРЕПАРАТУ <i>ARTHROBACTER</i> SP. LY-170	
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ БІОПРЕПАРАТУ <i>ARTHROBACTER</i> SP. LY-1.....	
	73
РОЗДІЛ 8. ОТРИМАННЯ БІОПРЕПАРАТУ ДЛЯ БІОЛОГІЧНОГО ОЧИЩЕННЯ ҐРУНТУ.....	
	81
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ СТАДІЙ КУЛЬТИВУВАННЯ <i>ARTHROBACTER</i> SP. LY-1.....	
	86
9.1. Визначення концентрації цільового продукту (біопрепарат на основі <i>Arthrobacter</i> sp. LY-1) за допомогою спектрофотометрії.....	86
9.2. Визначення титру цільового продукту <i>Arthrobacter</i> sp. LY-1.....	88
9.3. Контроль азотного живлення.....	90
9.4. Мікробіологічний контроль виробництва.....	91
9.4.1. Контроль стерильності поживних середовищ.....	91
9.4.2. Контроль чистоти культури.....	92
9.5. Контроль вуглецевого живлення.....	94
9.5.1. Методика визначення концентрації крохмалю.....	95
ЛІТЕРАТУРА.....	101

## ВСТУП

Атразин, популярний гербіцид класу s-триазинів, широко застосовується для контролю бур'янів у сільському господарстві, зокрема у вирощуванні кукурудзи, цукрової тростини, сорго та інших культур. Однак, через свою тривалу стійкість у навколишньому середовищі, цей хімікат часто залишається у ґрунтах та водних ресурсах протягом років після застосування. Атразин є серйозною загрозою для довкілля, оскільки він не тільки забруднює ґрунт і водні ресурси, але й є можливим канцерогеном, ендокринним руйнівником та тератогеном, що викликає серйозні занепокоєння щодо його впливу на здоров'я людини та тварин [1-3].

В Україні, зокрема в північних регіонах, таких як Херсонська, Миколаївська та Одеська області, атразин активно використовується на полях кукурудзи, що підвищує ризик його накопичення у ґрунтах і водних ресурсах. Через ці загрози зростає актуальність пошуку ефективних методів очищення забруднених ділянок. Одним з найбільш перспективних підходів є біоремедіація – використання мікроорганізмів для очищення забруднених територій. Біоремедіація є екологічно безпечним рішенням для видалення атрацину, оскільки мікроорганізми здатні розкласти цей гербіцид до нетоксичних продуктів.

На сьогоднішній день із різних бактеріальних родів було ізольовано низку штамів, здатних розкласти атразин. Деякі з них можуть метаболізувати атразин до менш токсичних сполук, таких як діетилазін або гідроксіатразин, тоді як інші здатні розщеплювати триазинове кільце та навіть мінералізувати атразин до нетоксичних речовин.

					НУХТ БТЕК 04.03.25 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Мартиненко Я.О.						
Перевір.		Резніченко Ю.М.					8	2
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Особливий інтерес викликають штами, здатні використовувати атрацин як єдине джерело вуглецю або азоту, що робить їх потенційно ефективними для практичного застосування у біоремедіації. Однак ефективність біодеградації атрацину значною мірою залежить від умов навколишнього середовища, таких як наявність азотних сполук, органічних речовин, рН та температура. Відомо, що більшість штамів, які розкладають атрацин, чутливі до зовнішніх джерел азоту, що може гальмувати їхню ефективність у реальних умовах. Таким чином, пошук мікроорганізмів, які не пригнічуються зовнішніми азотними сполуками та органічними речовинами, є важливим завданням для забезпечення ефективної біоремедіації забруднених ґрунтів.

Зокрема, штами роду *Arthrobacter* привертають значну увагу завдяки їхній здатності ефективно розкласти атрацин у рідкому середовищі. Раніші дослідження показали, що певні штами *Arthrobacter* можуть розкласти до 98% атрацину в ґрунті при оптимальних умовах. Однак, вплив азотних сполук і органічних речовин на цей процес залишається маловивченим, що обмежує можливості практичного застосування цих штамів у біоремедіації [1-3].

У даній курсовій роботі ставиться завдання вивчити можливості використання вискоелективного штаму *Arthrobacter* для біоремедіації атразин-забруднених ґрунтів, з акцентом на культивування цього штаму з метою створення біодобрива.

Актуальність дослідження полягає в тому, що наразі поки що не існує комерційних біодобрив які б мали функціонал біомедіації атрацину, біомедія атрацину розглядається як побічний ефект життєдіяльності різних штамів бактерій, але їх ефективність не була доказана, ця ж курсова робота пропонує технологічну схему культивування біомаси бактерій, головною ціллю яких є біомедіація атрацину.

# РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ

## 1.1. Хімічний склад цільового продукту

Цільовий продукт, що синтезується бактеріями *Arthrobacter* AtzA,B,C,D,E,F – це позаклітинні ферменти, які представляють собою вторинний метаболіт у вигляді комплексу сполук полісахаридної та білкової природи. Найчастіше перебувають у комплексі, окремо не виділяються.

Атразинхлоргідролаза (AtzA): цей фермент каталізує гідролітичне розщеплення хлор-s-триазинового кільця в атразині, що призводить до утворення гідроксіатразину. *Arthrobacter sp.* володіє цим ферментом як частиною шляху розпаду атразину.

Гідроксіатразинетиламіногідролаза (AtzB): після початкового гідролізу AtzB далі перетворює гідроксіатразин на N-ізопропіламілід шляхом дезамінування.

N-ізопропіламіліддеаміназа (AtzC): цей фермент бере участь у дезамінуванні N-ізопропіламіліду, утворюючи ціанурову кислоту.

Амідогідролаза ціанурової кислоти (AtzD): каталізує гідроліз ціанурової кислоти з утворенням біурету та аміаку.

Біуретамідогідролаза (AtzE): діє на біурет, перетворюючи його на алофанат.

Алофанатгідролаза (AtzF): каталізує гідроліз алофанату, що призводить до утворення аміаку та  $\alpha$ -кетоглутарату, які можуть проникати в центральні метаболічні шляхи [4, 7].

					НУХТ БТЕК 04.03.25 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту біосинтезу	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Мартиненко Я.О.					10	4
Перевір.		Резніченко Ю.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						Кафедра БТМ		

Ці ферменти разом складають шлях розпаду атразину в *Arthrobacter* sp.. Важливо відзначити, що на присутність і експресію цих ферментів можуть впливати різні фактори, включаючи конкретний штам *Arthrobacter* sp. і умови навколишнього середовища [4,7] .

## 1.2. Механізм біологічної дії

Біодеградація атразину *Arthrobacter* sp. включає серію ферментативних реакцій, які перетворюють гербіцид на менш токсичні або нетоксичні метаболіти. Для кожного ферменту характерна своя реакція. Розуміння цих механізмів є основоположним для розробки ефективних стратегій біоремедіації для видалення атразину та подібних забруднень із навколишнього середовища [6].

- Атразинхлоргідролаза (AtzA): AtzA каталізує гідролітичне розщеплення хлор-s-триазинового кільця в атразині. Це призводить до утворення гідроксіатразину як основного метаболіту. Гідроліз включає додавання молекули води до кільця хлор-s-триазиноу, що призводить до розриву зв'язку.
- Гідроксіатразинетіламіногідролаза (AtzB): AtzB діє на гідроксіатразин, зокрема на бічний ланцюг етиламіну. Фермент сприяє дезамінуванню гідроксіатразину, перетворюючи його на N-ізопропіламілід. Дезамінування передбачає видалення аміногрупи з гідроксіатразину.
- N-ізопропіламіліддезаміназа (AtzC): AtzC каталізує дезамінування N-ізопропіламіліду, утворюючи ціанурову кислоту. Дезамінування передбачає видалення аміногрупи з N-ізопропіламіліду.
- Амідогідролаза ціанурової кислоти (AtzD): AtzD діє на ціанурову кислоту, каталізуючи її гідроліз. Цей гідроліз призводить до утворення біурету та аміаку. Гідроліз передбачає додавання молекули води для розриву зв'язків у ціануровій кислоті.

- Біурет амідогідролаза (AtzE): AtzE каталізує гідроліз біурету, перетворюючи його в алофанат. Гідроліз призводить до розпаду біурету на алофанат, аміак і додаткові побічні продукти.
- Алофанатгідролаза (AtzF): AtzF діє на алофанат, каталізуючи його гідроліз. Остання стадія гідролізу дає аміак і  $\alpha$ -кетоглутарат. Розпад алофанату завершує шлях розпаду атразину. Під час цих ферментативних реакцій додавання або видалення функціональних груп, таких як гідроліз і дезамінування, відіграє вирішальну роль у розщепленні атразину на простіші, менш токсичні сполуки [4-8].

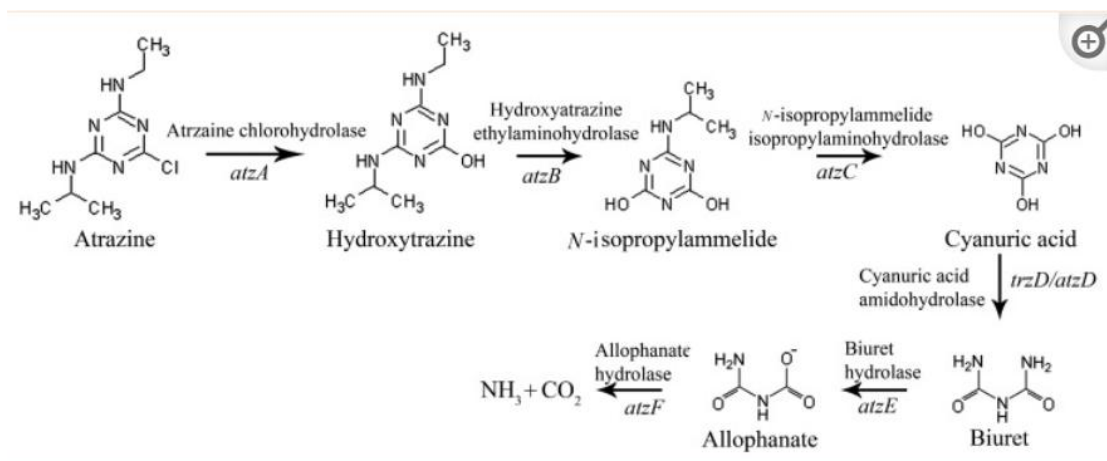


Рис. 1.1. Шлях біодеградації атразину, що ілюструє гени, що каталізують гідролітичні реакції [8]

### 1.3. Сфери застосування

Даний мікроорганізм та продукти його метаболізму знаходять поширення у різних сферах людської діяльності: медицина, ветеринарія, харчові технології, але метою даної роботи є введення в можливість використання *Arthrobacter sp.* у сільському господарстві [9,10].

Щодо готових продуктів та ферментних сумішей матеріалу не було знайдено, дана тема знаходиться на етапі вивчення технологіями з усього світу. З найбільших виробників, яких вдалося знайти, можна виділити Ambio (США), що продають у власному інтернет-магазині ферментний комплекс Хондрітинази АС II, що використовується у глікобіології, науці,

що вивчає структуру, функції та біологію вуглеводів, які також називаються гліканами. Це галузь біології, яка швидко розвивається, і має відношення до біомедицини, біотехнології та фундаментальних досліджень [11-13].

## РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

### 2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента для розкладання атразину

Проблема ефективного біорозкладання атразину є актуальним питанням, тому протягом останніх 3-х десятиліть була розглянута та проаналізована велика кількість різних штамів мікроорганізмів, які здатні ефективно розкласти атразин до синіюрової кислоти з подальшою його мінералізацією до CO<sub>2</sub> та NH<sub>3</sub>. Головними біологічними агентами для розкладання азитразину є *Pseudomonas* YA YA 6 [1], *Sinorhizobium arboris* [12], *Agrobacterium radiobacter* J14a [13], бактерії роду *Bacillus* [14], а також численні представники роду *Arthrobacter* та спорідненого роду *Paenarthrobacter*, які наразі є найефективнішими біологічними агентами для розкладання атразину та будь-яких інших гербіцидів триазинового ряду, досягаючи ефективності розкладання від 10 до 13 мг за год.[15,16,17]

Загалом протягом останніх десятиліть був зроблений чуттєвий крок по селекції високоефективних штамів атразин-біодеградуючих бактерій. Так середня ефективність біодеградації у 1990-х роках була 0.5-2 мг атразину в годину, наразі ефективність зросла у 4-5 разів [15,16].

					НУХТ БТЕК 04.03.25 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Мартиненко Я.О.					14	11
Перевір.		Резніченко Ю.М.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Аналізуючи літературні джерела мною було помічено, що культивування біодеструкторів атразину відбувається в максимально мінімалістичних поживних середовищах, де найчастіше атразин виступає як єдине джерело азотного живлення. Такі середовища симулюють перебування бактерії у ґрунті та забезпечують синтез всього комплексу ферментів біорозкладання атразину з генів *trz N*, *atz B* і *atz C*[15]. А також є надзвичайно економічно вигідними, що робить культивування бактерій роду *Arthrobacter* з економічної точки зору доступними для більшості великих та малих господарств.

Загалом мною було проаналізовано ряд біологічних агентів, результат аналізу представлений у таблицях 2.1, 2.2 та 2.3. Згідно аналізу всі 4 найефективніших представника біодеструкторів атразину культивують на дуже схожих поживних середовищах, що представляють собою розчин мінеральних солей з додаванням невеликої кількості вуглеводного компонента та атразину в концентраціях від 0.1 до 1 граму на літр в якості єдиного джерела азоту.

Згідно таблиці 2.1 найбільш ефективними біодеструкторами атразину виявилися штами *Arthrobacter sp. LY-1* та *Arthrobacter sp. TC1*. З ефективністю розкладання 100% концентрації атразину за 18 год відповідно. Провівши економічний аналіз мною було виявлено, середовище для *Arthrobacter sp. LY-1* коштує на 3.96 грн за літр дешевше ніж середовища конкурентних штамів, а також згідно таблиці 2.3, *Arthrobacter sp. LY-1* економічно найвигіднішим з точки зору швидкості.

Враховуючи всі вище згадані фактори мною був обраний біологічний агент *Arthrobacter sp. LY-1* зважаючи швидкий час культивування, економічну вигідність середовища та ефективність у розкладанні атразину.

Таблиця 2.1

## Особливості культивування біологічних агентів для отримання біодеструктора атразину

Біологічний агент	Поживне середовище		Час культивування год.	Відсоток розпаду атразину в зразку ґрунту год	Швидкість розпаду атразину мг/год	Особливості культивування	Джерела
	Компонент	Концентрація г/л					
1	2		3	5	6	7	8
<i>Arthrobacter</i> sp. C3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> BO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> NaCl Атразин	7.01 2.84 0.81 0.18 1.71 0.025	72	100%	0.0003	30°C, частота перемішуючого пристрою 160 об/хв, pH 7. Культивувати до значення OD = 0.4 при 600 нм	Zhao Y, Li X, Li Y, Bao H, Nan J and Xu G (2023) Rapid biodegradation of atrazine by a novel <i>Paenarthrobacter ureafaciens</i> ZY and its effects on soil native microbial community dynamic. <i>Front. Microbiol.</i> 13:1103168. doi: 10.3389/fmicb.2022.1103168
<i>Arthrobacter</i> sp. LY-1	Крохмаль Атразин KNO <sub>3</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O NaCl FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O EDTA: Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	3 0.1 0.1 0.5 3 0.2 0.5 1 5 0.4 1 2.5 0.25 0.2	48	100%	0.002	30°C, культивування при частоті обертів перемішуючого пристрою 160 об/хв, pH 7.0	Li, Y., Liang, D., Sha, J., Zhang, J., Gao, J., Li, H., Liu, R. (2019). Isolating and Identifying the Atrazine-Degrading Strain <i>Arthrobacter</i> sp. LY-1 and Applying it for the Bioremediation of Atrazine-Contaminated Soil. <i>Polish Journal of Environmental Studies</i> , 28(3), 1267-1275. <a href="https://doi.org/10.15244/pjoes/86219">https://doi.org/10.15244/pjoes/86219</a>

## Закінчення таблиці 2.1

<i>Arthrobacter sp.</i> TC1	Глюкоза:	1.8	72	90%	0.0006	рН 6.8, перемішуючий пристрій 250 об/хв, температура 30°C.	Silva, V. P., Moreira-Santos, M., Mateus, C., Teixeira, T., Ribeiro, R., & Viegas, C. A. (2015). Evaluation of <i>Arthrobacter sp.</i> Strain TC1 as Bioaugmentation Bacterium in Soils Contaminated with the Herbicide Terbutylazine. <i>PLOS ONE</i> , 10(12), e0144978. doi:10.1371/journal.pone.0144 978 10.1371/journal.pone.0144978
	Атразин	0.05					
	Тринатрієвий цитрат:	2					
	Тіамін	0.1					
	Біотин:	0.04					
	Фолієва	0.04					
	кислота:	0.2					
	Ніацинамід:	0.2					
	Піридоксин	9.1					
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05					
	EDTA	0.4					
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.22					
	ZnSO <sub>4</sub> :	0.1					
	FeSO <sub>4</sub> :	0.03					
	MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O:	0.008					
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O:	0.004					
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O							

Таблиця 2.2

**Розрахунок вартості поживних середовищ для культивування  
штамів бактерій, що здатні розкладати атразин**

Продуцент	Компоненти поживного середовища	Концентрація у ПС г/л,	Ціна компонента грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
<i>Arthrobacter</i> sp C3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.01	507	5.07	1
	KH <sub>2</sub> BO <sub>4</sub>	2.84	423	2.1	1
	MgSO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O	0.81			1
	CoCl <sub>2</sub>	0.18	15	0.15	1
	NaCl	1.71			
	Атразин	0.025	16 000	0.4	
Загальна вартість 7.72 грн за літр					
<i>Arthrobacter</i> sp. LY-1	Глюкоза	3	60	0.18	1(пром)
	(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	80	0.12	3
	KNO <sub>3</sub>	0.1	60	0.006	2
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	170	0.08	1
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	160	0.48	1
	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0.2	110	0.002	1
	NaCl	0.5	15	0.0014	1
	FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	1	70	0.07	4(африкан)
	ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	5	127	0.63	1
	CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	0.4	184	0.007	1
	MnSO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O	1	95	0.09	1
	EDTA:	2.5	228	0.7	1
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	0.25	184	0.001	2
	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ×10H <sub>2</sub> O	0.2	115	0.001	
Атразин	0.1		1.6		
Загальна вартість 3.96 грн за літр					
<i>Arthrobacter</i> sp. TC1	Глюкоза:	1.6	60	0.096	1(пром)
	Тринатрієвий цитрат:	0.4	58	0.0232	3
	Тіамін	0.2	1888	0.3776	2
	Біотин:	0.02	800	0.016	1
	Фолієва кислота:	1	1900	1.9	1
	Ніацинамід:	0.1		0.085	1
	Піридоксин	0.1	3.8	3.8	1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5	850	0.16	4(африкан)
	EDTA	1	1520	1.14	1
	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	5	160	0.11	1
	ZnSO <sub>4</sub> :	1	228	0.0508	1
	FeSO <sub>4</sub> :	0.4	110	0.024	1
	MnSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O:	0.2	127	0.0095	2
	CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O:	0.1	120	0.005704	
	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ×10H <sub>2</sub> O:	0.031	95	0.00092	
	Атразин	0.008	184	0.000345	
		0.003	115		
	0.05	16 000	0.8		
Загальна вартість 8.6 грн за літр					

**Примітка.** \* – Ціни наведено станом на травень 2024 р. 1 - <http://prom.ua>, 2 - [ukrhim.com.ua](http://ukrhim.com.ua) 3 – [www.shop-hlr.ua](http://www.shop-hlr.ua); 4 - <https://afrimash.com>

Таблиця 2.3.

**Умовна вартість 1 г утилізованого атразину на суміші ростових субстратів**

Біологічний агент	Швидкість розпаду атразину мг/год	Тривалість культивування, год	Концентрація атразину, мг	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість розкладу 1 мг атразину, грн/мг
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>		<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Arthrobacter sp</i> С3	0.0003	72	25	7.72	0.31
<i>Arthrobacter sp.</i> LY-1	0.002	48	100	3.96	0.04
<i>Arthrobacter sp.</i> TC1	0.0006	72	50	8.6	0.17

\*Була вирахована на основі підрозділ 2.2.

**2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для культивування *Arthrobacter sp.* LY-1**

Тривалість культивування *Arthrobacter sp.* LY-1 складає 12 год, концентрація бактерій в культуральній рідині  $5 \cdot 10^8$ , концентрація біомаси невідома.

***Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення***

**Потреби вуглецю для синтезу біомаси:**

Як джерело вуглецю для синтезу біомаси використовується глюкоза у концентрації 3 г/л. Як відомо у біомасі міститься 50 % Карбону, оскільки з літературних джерел невідома точна біомаса, яка необхідна для створення біодобрива, то варто розрахувати яка максимальна концентрація біомаси може бути синтезована із запропонованого поживного середовища.

Оскільки масова частка карбону в глюкозі дорівнює 42%, то за наступними розрахунками отримуємо  $(3 \cdot 0,42)$  1.26 грам карбону в літрі середовища. Оскільки як відомо 40% джерела карбону виходить на холосте

окиснення ( $1.26 \cdot 0.6 = 0.756$ ), а біомаса складається з карбону на 50%, то потенційно, опираючись тільки на дані джерела карбону ми можемо отримати ( $756 \cdot 2$ ) 1.5 г біомаси в літрі середовища.

#### ***Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення***

У запропонованому поживному середовищі джерелом азоту виступає амоній сірчаноокислий у концентрації 2 г/л  $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ . Амоній сірчаноокислий містить 21.21% азоту, згідно цієї інформації у 2 грамах атразину міститься 0.42 г азоту. Припустимо клітина *Arthrobacter* sp. LY-1 складається з 10% азоту, то тоді максимальний теоретичний рівень біомаси складає 4.2 грами.

#### ***Розрахунок вмісту в середовищі джерела фосфорного живлення***

В поживному середовищі джерелом фосфору є  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (3 грами) та  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.5 грама). Тепер варто визначити відсотковий склад фосфору в солі  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Оскільки відомо, що масова частка фосфору в  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  становить 22.84%, то 3 грами цієї солі містять 0.6852 грама фосфору. Додатково, 0.5 грама  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  містять 0.1142 грама фосфору. Загалом, у середовищі присутні 0.7994 грама фосфору. Відомо, що в середньому бактеріальна клітина складається з фосфору на 3%, тому можна припустити, що максимальний рівень біомаси, який може бути досягнутий при культивуванні за такої концентрації фосфору, становить 26.65 грама на літр.

**Висновок:** Як можна побачити з розрахунку головним обмежуючим фактором росту та розвитку біомаси є глюкоза, яка обмежує максимум синтезованої біомаси до всього 0.756 мг на літр. Підняття концентрації глюкози до 10-15 грам, може підвищити рівень синтезу біомаси до 3-4 грам, що відповідає вже максимум біомаси по джерелу азотного живлення. Зважаючи на низьку собівартість середовища, для виробничої ферментації рекомендовано використовувати середовища з більшим вмістом джерела вуглецевого живлення.

## **Максимально можлива кількість біомаси синтезованої іншими штамми**

Оскільки як показав аналіз штаму *Arthrobacter* sp. LY-1 головним обмежуючим фактором для синтезу біомаси є джерело вуглецевого живлення, тому будемо розраховувати для всіх штамів саме його.

Розрахунок теоретичного синтезу біомаси за джерелом вуглецевого живлення штам: *Paenarthrobacter ureafaciens* ZY.

Оскільки в поживному середовищі для культивування цього штаму не має джерела вуглецевого живлення, вираженого моносахаридами або полісахаридами, то як джерело вуглецевого живлення мною був взятий триптон та дріжджовий екстракт. Як відомо глютамінова кислота є найпоширенішою амінокислотою у білках, в триптоні глютамінова кислота знаходиться в концентрації 18.2 г/100 г, тобто її масова частка приблизно становить 18% від загальної маси триптону. В поживному середовищі використовуюється 10 г пептону на літр середовища, виходячи з цього ми маємо 1.8 грам глютамінової кислоти на літр середовища. Виходячи з формули глютамінової кислоти  $C_5H_9NO_4$ , ми отримуємо, що масова частка вуглецю становить приблизно 41% (Молекулярна маса 147 г/моль, частка карбону 60 г/моль). У дріжджовому екстракті масова частка амінокислот та пептидів становить 60% від сухої маси. В літрі середовища знаходиться 5 грам дріжджового екстракту, 60% якого займають амінокислоти, це виходить 3 грами на літр білків або амінокислот з яких глютамінова кислота займає 16%. Сумуючи кількість глютамінової кислоти з пептону та дріжджового екстракту ( $1.8 + 0.48$ ) отримуємо 2.28 г глютамінової кислоти на літр середовища, масова частка карбону в яких 41% ( $2.28 \cdot 0.4$ ) виходить 0.91 г карбону на літр 40% яких уходить на холосте окиснення ( $0.91 \cdot 0.6 = 0.546$  г). Як відомо біомаса складається з карбону на 50%, виходить, що максимальний рівень біомаси по вуглецевому джерелу живлення становить ( $0.546 \cdot 2$ ) 1.1 г на літр.

Розрахунок теоретичного синтезу біомаси за джерелом вуглецевого живлення штам: *Arthrobacter sp.* TC1.

Як джерело вуглецю для синтезу біомаси використовується глюкоза у концентрації 1.8 г/л. Як відомо у біомасі міститься 50 % Карбону, оскільки з літературних джерел невідома точна біомаса, яка необхідна для створення біодобрива, то варто розрахувати яка максимальна концентрація біомаси може бути синтезована із запропонованого поживного середовища.

Оскільки масова частка карбону в глюкозі дорівнює 42%, то за наступними розрахунками отримуємо  $(1.8 \cdot 0.42)$  756 мг карбону в літрі середовища. Оскільки як відомо 40% джерела карбону виходить на холосте окиснення  $(756 \cdot 0.6 = 0.453)$ , а біомаса складається з карбону на 50%, то потенційно, опираючись тільки на дані джерела карбону ми можемо отримати  $(0.453 \cdot 2)$  0.9 г біомаси в літрі середовища.

### **2.3. Морфолого-культуральні ознаки *Arthrobacter sp.***

*Arthrobacter sp.* (сучасна назва - *Paenarthrobacter sp.*) – облигатна аеробна бактерія, яка візуально виглядає як паличкоядерний кок. Види роду *Arthrobacter* зазвичай зустрічаються в ґрунтах, надземній поверхні рослин і відкладеннях стічних вод; вони не утворюють ендоспори та мають високу протеолітичну дію [18].

Члени роду *Arthrobacter* демонструють життєвий цикл, що характеризується морфологічними змінами клітин, перетворенням паличкоядерної форми на V-подібну та кокоподібну форми та назад на паличкоподібну форму [19, 20].

Клітини не утворюють ендоспор; вони нерухливі або рухливі одним субполярним або декількома бічними джгутиками, каталазопозитивні. Їх метаболізм дихальний, ніколи не бродильний (з цукрів утворюється невелика кількість кислоти або зовсім не утворюється), а харчування невибагливе. Вміст G+C у ДНК знаходиться в діапазоні 59–66 моль%

(гілка актиноміцетів), а пептидоглікан клітинної стінки містить лізин як діамінокислоту [24].

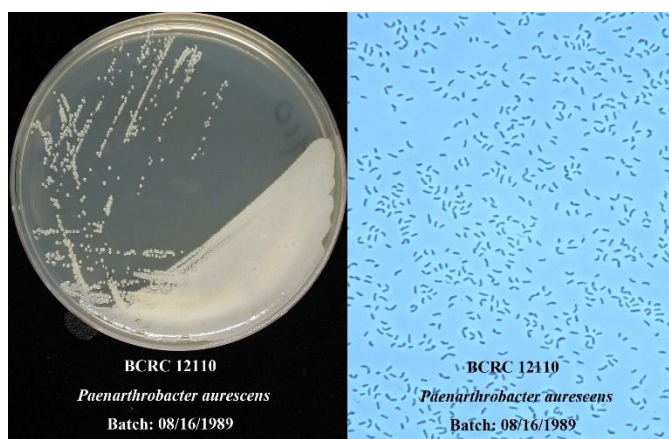


Рис. 2.1. Зовнішній вигляд *Paenarthrobacter sp.* [21].

Дана бактерія дає блідо-коричнєве забарвлення колоній на дріжджовому екстрактно-пептонному агарі при інкубації в темряві. При забезпеченні біотином ріст відбувається у відповідному середовищі мінеральних солей із сіллю амонію або нітратом як джерелом азоту та глюкозою як джерелом вуглецю та енергії. Може рости також на агарі МакКонкі [22].

#### 2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки *Arthrobacter sp.*

*Arthrobacter sp. TC1* є аеробним грампозитивним мікроорганізмом, спочатку виділеним із ґрунту на місці розливу в Південній Дакоті, що містить гербіцид атразин. За Грамом забарвлюється позитивно. Оптимальна температура для росту та підтримки життєдіяльності складає 28-30 °С. Може рости при концентрації NaCl до 10% [19, 20, 22].

За типом живлення *Arthrobacter sp. TC1* є хемоорганогетеротрофом, як типова ґрунтова бактерія. Донором електронів є органічні речовини, а енергія отримується за рахунок окиснення. Як джерело вуглецю у процесі культивування використовується глюкоза [23].

Геном цієї бактерії складається з однієї кільцевої хромосоми та двох плазмід (pTC1 і pTC2), які кодують велику кількість білків, що беруть участь у стресових реакціях через голодування, висихання, іонізуюче випромінювання, кисневі радикали та токсичні хімікати. Здатність до

виживання безпосередньо пов'язана з геномною універсальністю, особливо щодо метаболізму азоту та здатності рости на полімерних підшарах, які не часто використовуються багатьма ґрунтовими мікробами. Дана бактерія має здатність рости на різноманітних вуглецевих сполуках і катаболізувати різноманітні ксенобіотичні сполуки, такі як гліфосат, метил-трет-бутиловий ефір, 2,4-дихлорфеноксіацетат (2,4-D), нікотин, 4-нітрофенол, диметилсиландіол, флуорен, фталат, нітрогліцерин і різні s-триазинові сполуки [19, 24].

Штам ТС1 може мати здатність розкласти опіни рослинного походження або інші нові амінокислотні сполуки, що утворюються в ризосфері рослин. Гени, наявні у *A. sp.* ТС1 дозволяють метаболізувати кілька s-триазинів як єдине джерело вуглецю та азоту для росту [19, 23].

### **2.5. Таксономічний статус *Arthrobacter sp.***

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Arthrobacter sp.* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [24]:

Царство: *Bacteria*

Тип: *Actinobacteria*

Порядок: *Actinomycetales*

Підпорядок: *Actinomycetales*

Сімейство: *Micrococcaceae*

Рід: *Arthrobacter*

Вид: *sp.*

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

### 3.1. Розрахунок потреби у біопрепараті для розкладання атразину

Атразин є росповсюдженим гербіцидним препаратом селективної дії. Найчастіше його використовують у технологічній схемі вирощування кукурудзи, оскільки однією з особливостей атразину є те, що переважно всі сорти кукурудзи до нього стійкі. В Україні кукурудза є однією з основних та найпопулярніших культур для вирощування, через її високу толерантність до різних біогенних та абіогенних факторів вирощування. В Україні згідно держстату, а саме документу на момент 2023 року було висіяно 4112 тис. га. кукурудзи за посівними площами вона займає друге місце, лише трохи не дотягуючи по посівним площам до пшениці озимої. Але технологія вирощування кукурудзи передбачає використання широкого спектру гербіцидів та інших видів пестицидів, що становить сильну навантаженість на супутню біосферу, високі концентрації атразину накоплюються в ґрунті, в с/г рослинах навіть наступного сезону і загалом атразин може поступово розноситися по харчовому ланцюгу, зрештою досягаючи людину або напряду, при споживанні кукурудзи, або непрямо через споживання продуктів тваринного походження, субстратом для яких слугувала кукурудза або її силос. Ці всі фактори створюють нагальну потребу в організації механізму біомедіації атразину, бо наразі в Україні не практикуються жодні методи цілеспрямованого видалення атразину з ґрунтів [25].

					НУХТ БТЕК 04.03.25 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування					
Розроб.		Мартиненко Я.О.						Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.							25	7
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.								

Згідно держстату в середньому в рамках повного циклу вирощування кукурудзи агропромисловими комплексами та фермерами за 2023 рік використовується 870 г або мл гербіцидів на гектар або 3 595 083 кг гербіцидів на 4112.7 тис га. посівних площ, з яких атразин становить 71 537 кг з середньою нормою внесення 960 г на гектар (3 л розчину) [26] (концентрація атразину 32% в препараті), виходячи з цих даних можна припустити:

$$0.96 \text{ г} - 1 \text{ га}$$

$$71537 \text{ кг} - x$$

$$73537 / 0.96 = 74517 \text{ га}$$

що на 74517 га був використаний атразин, як основний або суміжний гербіцид. Тобто потенційний ринок України для біопрепарату який розкладає атразин це 74517 га оброблювальних земель [27].

### **3.2. Розрахунок потужності виробництва біопрепарату для розкладання атразину**

Як відомо бактерії виду *Arthrobacter sp.* мають здатність розкладати атразин та використовувати його в своєму метаболізмі як джерело вуглецевого та азотного живлення.

В опрацьованій статті витрати культуральної рідини на обробку забрудненого ґрунту складають 5 мл культуральної рідини на 200 г забрудненого ґрунту, а ступінь забруднення ґрунту атразином складає 100 мг на 1 кг ґрунту.

Розрахуємо масу ґрунту яка міститься на площі 1 гектар.

Як правило шар ґрунту в якому містяться гербіциди складає 10 см.

Оскільки густина ґрунту коливається в межах від 1000 кг до 1250 кг/м<sup>3</sup> пропоную обрати значення густини ґрунту на значення 1100 кг/м<sup>3</sup>

$$\text{Отже } 100 * 100 * 0.1 * 1100 = 1100000 \text{ кг}$$

Розрахуємо потребу у культуральній рідині для утилізації атразину на площі в 1 гектар: 25 мл \* 1100000 = 27500 000 мл або 27 500 л

Але виходячи з того, що такого роду препарати не користуються популярністю в Україні, а атразин розкладаючи біопрепарат взагалі не представлені на ринку України, то пропонується для початку використати на площі в 3 гектари.

$$27500\text{л} \cdot 3\text{га} = 82500\text{л культуральної рідини}$$

Таблиця 3.1

Узагальнені результати підрахунку потреби в культуральній рідині

Шар землі де знаходиться атразин	Щільність ґрунту	Вага 10 см шару в 1 гектарі	Норма витрат КР	Кількість оброблюваних гектар	Потреба в культуральній рідині на 3 га
10 см	1100 кг/м <sup>3</sup>	1 100 000 кг	5 мл на 200 г землі	3	82500 л

### 3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Враховуючи потенційні втрати під час пакування, фасування кінцевого продукту на рівні 10%, отримуємо:

$$82500 \cdot 1.1 = 90750$$

Розрахунок виходу культуральної рідини за 1 цикл ферментації для подальшого розрахунку кількості стадій підготовки посівного матеріалу, кількість трудоднів беремо за 280 днів:

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 90750 : 280 = 324\text{л}$$

Кількість культуральної рідини для створення біодобрива за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \cdot V_d \cdot T_{\text{цф}}) / 24 = (1,128 \cdot 0,324 \cdot 48) / 24 = 0,730 \text{ м}^3 / \text{цикл}$$

Підготовка ферментера включає: миття дезінфікуючими розчинами та візуальний огляд (2 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Визначивши об'єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення  $K_3$ , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}} / K_3 = 0.731 / 0,6 = 1.21 \text{ м}^3.$$

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер  $V_{\phi} = 1.25 \text{ м}^3$ . Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$K_3 = 0.731 / 1.25 = 0,58$  – не перевищує оптимального значення (0.5-0.65).

### **3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу**

1. Початковий об'єм культуральної рідини:

Для виробничого циклу обрано ферментер об'ємом  $1.25 \text{ м}^3$ , який забезпечує отримання 731 літрів культуральної рідини за один виробничий цикл. Втрати культуральної рідини внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря становлять 10%. Таким чином, з урахуванням втрат, об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед біосинтезом визначається за формулою:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} * (1 + E_{\phi}) = 731 * 1,1 = 804 \text{ л}$$

де:

- $V_{\text{кр}}$  – об'єм культуральної рідини, який дорівнює 736 л;
- $E_{\phi}$  – втрати через краплевинос (10%).

### **Розрахунок робочого та геометричного об'єму ферментера**

Для визначення геометричного об'єму ферментера необхідно врахувати коефіцієнт заповнення, який для аеробних процесів зазвичай дорівнює 0,6. Таким чином, геометричний об'єм ферментера можна розрахувати за формулою:

$$V_{\phi} = V_{\text{роб.1}} / 0.6 = 0.804 / 0.6 = 1.35 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер на  $1.25 \text{ м}^3$ . Уточнений коефіцієнт заповнення для даного ферментера становить:

$$K_{3.1} = 0.804 / 1.25 = 0,64$$

Цей коефіцієнт не перевищує стандартні норми, (0,5-0,65), тому геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

### **Розрахунок кількості посівного матеріалу для ферментера**

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища:

$$V_{\text{пм.1}} = V_{\text{роб.1}} \times 0,1 = 804 \times 0,1 = 80,4 \text{ л}$$

Таким чином, об'єм поживного середовища у ферментері після відбору посівного матеріалу буде:

$$V_{\text{пс.1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пм.1}} = 804 - 80,4 = 723,6 \text{ л}$$

### **Розрахунок робочого об'єму посівного апарату**

Для виробництва 80,4л посівного матеріалу в посівному апараті необхідно врахувати втрати культуральної рідини на рівні 10%. Робочий об'єм посівного апарату розраховується за формулою:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм.1}} \times (1 + E_{\text{ф}}) = 80,4 \times 1,1 = 89 \text{ л}$$

За коефіцієнта заповнення 0,6 геометричний об'єм посівного апарату становить:

$$V_{\text{па.2}} = 0,089 / 0,6 = 0,148 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий стандартний посівний апарат об'ємом 0,15 м<sup>3</sup>. Коефіцієнт заповнення для цього апарата:

$$K_{з.2} = 0,089 / 0,15 = 0,59$$

Цей показник відповідає оптимальному показнику (0,5-0,65)

### **Кількість посівного матеріалу для інокулятора об'ємом 150 л.**

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату визначається аналогічно попередньому кроку:

$$V_{\text{пм.2}} = V_{\text{роб.2}} \times 0,1 = 89 \times 0,1 = 8,9 \text{ л}$$

Після відбору посівного матеріалу об'єм поживного середовища у посівному апараті:

$$V_{\text{пс.2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пм.2}} = 89 \text{ л} - 8,9 \text{ л} = 80,1 \text{ л}$$

### **Розрахунок робочого об'єму посівного апарату**

Для виробництва 8 л посівного матеріалу в посівному апараті необхідно врахувати втрати культуральної рідини на рівні 10%. Робочий об'єм посівного апарату розраховується за формулою:

$$V_{роб.2} = V_{пм.1} \times (1 + E_{ф}) = 8.9 \text{ л} \times 1,1 = 9.8 \text{ л}$$

За коефіцієнта заповнення 0,6 геометричний об'єм посівного апарату становить:

$$V_{па.2} = 9.8 / 0.6 = 16.3 \text{ л}$$

Обираємо найближчий стандартний апарат а саме об'ємом 15 л.

$$K_{з.3} = 9.8 / 15 = 0,65$$

Цей показник не відповідає оптимальному значенню, але є меншим за рекомендований, враховуючи, що продуцент є аеробним, це не є критично

### **Кількість посівного матеріалу для інокулятора об'ємом 15 л**

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату визначається аналогічно попередньому кроку:

$$V_{пм.2} = V_{роб.2} \times 0,1 = 9.8 \times 0,1 = 0.98 \text{ л} \sim 1 \text{ л}$$

Після відбору посівного матеріалу об'єм поживного середовища у посівному апараті:

$$V_{пс.2} = V_{роб.2} - V_{пм.2} = 9.8 \text{ л} - 1 \text{ л} = 8.8 \text{ л}$$

### **Визначення об'єму посівного матеріалу для інокулятора об'ємом 15 л**

Одержання посівного матеріалу  $V_{пм4} = 0.9 \text{ л}$  (900 мл) для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням *Arthrobacter sp. Strain LY 1* у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом  $V_{колб} = 750 \text{ мл}$  з коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ . Тоді кількість колб становить:

$$N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} * K_{зк}) = 900 / (750 * 0,2) = 6 \text{ колб}$$

Таким чином, після проведених розрахунків можна зробити висновок, що для виробничого біосинтезу необхідно використовувати ферментер об'ємом  $1.25 \text{ м}^3$ , посівний апарат об'ємом  $0.16 \text{ м}^3$ , посівний апарат об'ємом  $0.02 \text{ м}^3$ , та 7 колб для отримання необхідного об'єму культуральної рідини та посівного матеріалу.

Таблиця 3.2

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного  
матеріалу та виробничого біосинтезу

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{кр}$ , м <sup>3</sup> (л)	Уточнений об'єм культуральної рідини $V_{роб.}$ , м <sup>3</sup> (л)	Об'єм посівного матеріалу $V_{пм}$ , м <sup>3</sup> (л)	Об'єм поживного середовища $V_{пс}$ , м <sup>3</sup> (л)	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$ , частка	Геометричний об'єм ферментера $V_{ст}$ , м <sup>3</sup> (л)
IV	0.731	0.804	0.089	0.723	0.64	1.25
III	80.9 (л)	89 (л)	9.8(л)	81.1(л)	0.55	0.15
II	8.9(л)	9.8 (л)	0.9(л)	8.8(л)	0.49	0.015
I	0.9 (л)	-	-	0.9	0.2	6 колб

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ПРЕПАРАТУ *ARTHROBACTER sp.*

### 4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату у *Arthrobacter sp.*

Згідно літературних джерел як ростовий субстрат при вирощуванні *Arthrobacter sp.* найчастіше використовується крохмаль, який розкладається до глюкози, а глюкоза катаболізується через гліколіз, що підтверджується базою даних KEGG та наявністю ферменту 6-фосфоглюкокінази (КФ 2.7.1.11). Оскільки *A. sp.* має ряд ферментів амолітичного комплексу, такі як ізоамілазу [КФ: 3.2.1.68], альфа-амілаза [КФ: 3.2.1.1] та альфа-глюкозидаза [КФ: 3.2.1.20], то цей комплекс ферментів здатен гідролізувати крохмаль до D-глюкози через мальтодекстрин.

У процесі гліколізу у *Arthrobacter sp.*, глюкоза під дією глюкокінази-1 (КФ 2.7.1.1) перетворюється у  $\alpha$ -D-глюкозо-6-фосфат.

Під дією фруктозо-бісфосфатальдолази (КФ 4.1.2.13) D –фруктозо-1,6-фосфат-2 перетворюється у діоксиацетонфосфат, який за допомогою триозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) взаємо перетворюється з гліцеральдегід-3-фосфат.

Гліцеральдегід-3-фосфат перетворюється у гліцерат-1,3-дифосфат під дією гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12).

Гліцерат-3-фосфат за допомогою фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.11) перетворюється у гліцерат-2-фосфат.

Останньою реакцією шляху є перетворення фосфоенолпірувату у піруват за допомогою піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

					НУХТ БТЕК 04.03.25 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Біосинтез препарату <i>Arthrobacter sp.</i>		
Розроб.		Мартиненко Я.О.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.				32	8
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

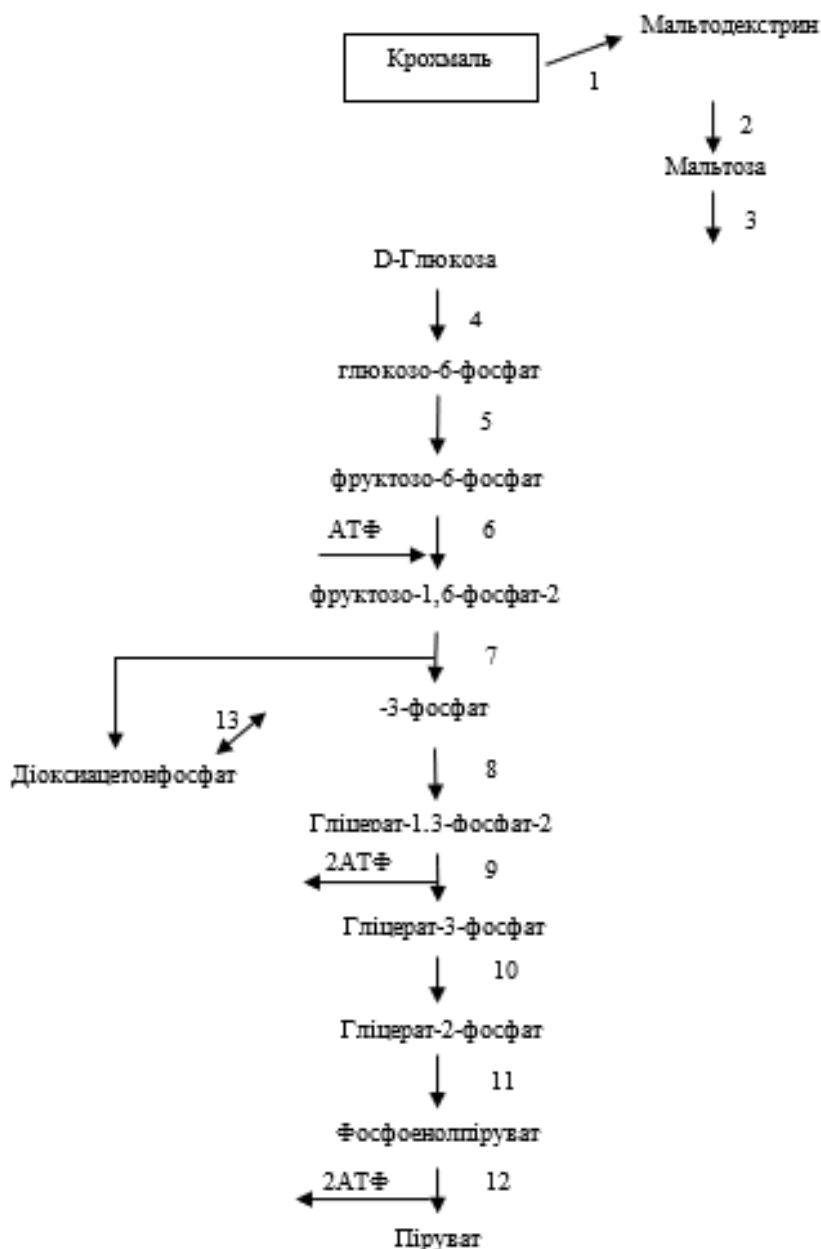


Рис. 4.1. Схема катаболізму крохмалю *Arthrobacter sp.*

**Ферменти:** 1 - ізоамілазу [КФ: 3.2.1.68]; 2 - альфа-амілаза [КФ: 3.2.1.1]; 3-альфа-глюкозидаза [КФ: 3.2.1.20]; 4 – глюкокіназа-2 (КФ 2.7.1.2), 5 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9), 6 – 6-фосфоглюкокіназа (КФ 2.7.1.11), 7 – фруктозо-бісфосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13), 8 – гліцераальдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12), 9 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3), 10– фосфогліцератмутаза-3 (КФ 5.4.2.11), 11 – енолаза (КФ 4.2.1.11), 12 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40), 13 - триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1).

## 4.2. Біотрансформація крохмалю у екзопротейни *A. sp.*

### **AtzA,B,C,D,E,F**

Цільовим продуктом є комплекс ферментів AtzA,B,C,D,E,F, що продукуються *A. sp.* та виділяються в культуральне середовище у якості вторинних метаболітів для біодеградації гербіцидів Атразин та інших гербіцидів, що в своїй хімічній структурі мають триазин.

Ферменти комплексу представляють собою звичайні поліпептиди, що після синтезу виділяються в культуральне середовище, для перетворення азитрацину в синюрову кислоту, яка використовується як джерело вуглецевого та азотного живлення [4].

Згідно бази даних NCBI окремі з зазначених ферментів можуть не мати однієї або більше протеїногенних амінокислот [29, 30], але в сумі комплекс ферментів включає всі 20 протеїногенних амінокислот, що виявляє необхідність детального опису біосинтезу всіх сімей амінокислот.

Як було вже описано у розділі 1, катаболізм ростового субстрату відбувається за схемою гліколізу до пірувату, після чого утворений піруват шляхом дії альфа-субодиниці компонента піруватдегідрогенази E1 (КФ 1.2.4.1) та дигідроліполізіну (КФ 2.3.1.12)), перетворюється на ацетил-КоА, який поступає на цикл трикарбонових кислот, який є повноцінним у даного мікроорганізму.

**Біосинтез гістидину:** гістидин синтезується з глюкозо-6-фосфату, який проходячи пентозофосфатний шлях перетворюється на 5-фосфорибозилдифосфат, який ферментом АТФ-фосфорибозилтрансфераза [КФ: 2.4.2.17 ] перетворюється фосфорибозил-АМФ, який шляхом прямих незворотніх реакцій з ферментом імідазолгліцеролфосфатсинтазою [КФ: 4.3.2.10] перетворюється на Імідазол-гліцерол-3-фосфат після чого відбувається завдяки ферменту гістидинол-фосфатамінотрансферазі [КФ: 2.6.1.9 ] відбувається синтез L-Гістидинолу фосфату, який шляхом декількох реакцій завдяки гістидинолдегідрогеназі [КФ: 1.1.1.23] перетворюється на L-гістидин.

**Біосинтез фенілаланіну, тирозину та триптофану:** Біосинтез всіх трьох амінокислот також починається з пентозофосфатного шляху де глюкозо-6-фосфат перетворюється на Еритрозо-4-фосфат. Першою реакцією синтезу цих амінокислот це конденсація Еритрозо-4-фосфат та фосфоенолпірувату ферментом 3-дезоксигептулоноатсинтаза [КФ: 2.5.1.54 ] з утворенням 3-дезоксигептулоноат 7-фосфату з подальшою циклізацією та утворенням шикімату ферментом НАД<sup>+</sup> залежною шикіматдегідрогеназою [КФ: 1.1.1.24 ], ці реакції є так званим «Шикіматним шляхом», наступним кроком є утворення хоризмату ферментом хоризматсинтазою [КФ: 4.2.3.5 ]. Хоризмат є ключовим інтермедіатом для синтезу триптофану, фенілаланіну та тирозину, оскільки саме на ньому відбувається розгалуження синтезу всіх трьох амінокислот. Триптофан синтезується через перехід хоризмату в Антранілат завдяки ферменту антранілатсинтазі [КФ: 4.1.3.27 ] та подальшому синтезу триптофану триптофансинтазою [КФ: 4.2.1.20 ] через індоїл гліцерофосфат або індол. Тирозин та триптофан синтезуються через префенат, який утворюється завдяки зміні хоризмату ферментом хоризмат мутазою [КФ: 5.4.99.5 ]. Після чого з префенату відбувається біосинтез фенілаланіну через фенілпіруват ферментом аспартатамінотрансферазою [КФ: 2.6.1.1 ]. У випадку *A. sp.* біосинтез тирозину відбувається не на пряму з фенілаланіну, оскільки фермент непеталактолмонооксигеназа [КФ: 1.14.14.161] відсутній, тому тирозин синтезується з префенату 4-гідроксифенілпіруват ферментом аспартатамінотрансферазою [КФ: 2.6.1.1].

**Біосинтез серину, гліцину, треоніну :** Біосинтез серину відбувається шляхом амінування 3-фосфогліцерату через фосфосерин. Спочатку 3-фосфогліцерат амінується ферментом фосфосеринамінотрансферазою [КФ: 2.6.1.52 ], з утворенням фосфосерину після чого відбувається дефосфорилування фосфосерину у серин ферментом фосфосеринфосфатазою [КФ: 3.1.3.3 ]. Після чого серин в одну

реакцію перетворюється на гліцин завдяки ферменту гліцингідроксиметилтрансферазі [КФ: 2.1.2.1 ], після чого гліцин може бути перетворений на треонін однією реакцією завдяки ферменту треонін-альдолазі [КФ: 4.1.2.48 ].

**Біосинтез цистеїну та метіоніну:** Біосинтез цистеїну відбувається через ацилювання серину серин-О-ацетилтрансферазою [КФ: 2.3.1.30 ] та додаванням сульфату ферментом цистеїнсинтаза [КФ: 2.5.1.47 ]. Метіонін в *A. sp.* найвирогідніше відбувається з аспартату через гомосерин утворення якого каталізується гомосериндегідрогеназа [КФ: 1.1.1.3 ], після чого реакцією ацилювання утворюється ацетилгомосерин, утворення якого каталізується ферментом О-сукцинілтрансфераза [КФ: 2.3.1.46 ], після чого ацетилгомосерин переходить в гомоцистеїн через фермент О-ацетилгомосерин (тіол)-ліаза [КФ: 2.5.1.49 ], після чого відбувається перетворення гомоцистеїну в метіонін через 5-метилтетрагідрофоліаттриглутамат - гомоцистеїн метилтрансфераза [КФ: 2.1.1.14 ].

**Біосинтез Лейцину, ізолейцину та валіну:** Всі ці амінокислоти синтезуються з пірувату, через спільний ферментний комплекс. Біосинтез ізолейцину відбувається через перетворення пірувату ацетолактатсинтазою [КФ: 2.2.1.6 ] на (S)-2-ацето-2-гідроксибутаноат який потім прямим синтезом перетворюється на ізолейцин через фермент амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом [КФ: 2.6.1.42 ]. Валін синтезується майже ідентичним шляхом, лиш з тією різницею, що першим прекурсором валіну виступає не (S)-2-ацето-2-гідроксибутаноат, а ацетолактат, ферментний комплекс ідентичний. Лейцин синтезується через ацетолактат як і валін, але на етапі синтезу 2-Оксоізовалеріату через дегідроксикислу дегідратазу [КФ: 4.2.1.9], Оксоізовалеріат завдяки ферменту 2-ізопропілмалатсинтазі [КФ: 2.3.3.13], перетворюється на ізопропілмалат, який шляхом декількох перетворень переходить в лейцин з фінальним

ферментом амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом [КФ: 2.6.1.42 ].

**Біосинтез Аланіну:** Біосинтез аланіну відбувається в 1 реакцію з пірувату завдяки або ферментам аланінсинтезуючі трансаміназі [КФ: 2.6.1.2 ], або аланіндегідрогеназі [КФ: 1.4.1.1 ].

**Біосинтез аспартату, аспаргіну, аргініну та лізину:** Аспартат синтезується в 1 реакцію з Оксалоацетату завдяки ферменту аспартат амінотрансферазі [КФ:2.6.1.1]. Згідно бази даних KEGG *A. sp.* не здатна синтезувати аспаргін жодним відомим методом, і даних щодо здатності *A. sp.* рости на безаспаргінових середовищах теж знайдено не було. Біосинтез Аргініну відбувається з аспартату через аргініносукцинат завдяки ферменту аргініносукцинатсинтаза [КФ: 6.3.4.5 ], після чого відбувається синтез аргініну з виділенням фумарату через фермент аргініносукцинатліаза [КФ: 4.3.2.1 ]. Біосинтез лізину може відбуватися через аспартат, довгим шляхом хімічних перетворень, який починається з перетворення аспартату на аспартат напівальдегід через аспартат-семіальдегіддегідрогеназу [КФ: 1.2.1.11 ], наступним кроком є синтез тетрагіднодипіколінату комплексом ферментативних реакцій, фінальну реакцію каталізує 4-гідрокси-тетрагідродипіколінатредуктаза [КФ: 1.17.1.8 ], наступними кроками є амінування піколінату групою ферментативних реакцій, фіналом якої є утворення L-лізину через фермент діамінопімелатдекарбоксилаза [КФ: 4.1.1.20 ].

**Біосинтез глутамату, глутаміну і проліну:** Глутамат синтезується через 2-оксоглутарат в одну реакцію через фермент НАДФ<sup>+</sup> залежну глутаматсинтазу [КФ: 1.4.1.13 ], потім завдяки ферменту глутамінсинтетаза [КФ: 6.3.1.2 ] глутамат перетворюється на глутамін. Пролін синтезується з глутамату шляхом ланцюга ферментативних реакцій. Спочатку глутамат переходить в глутаміл фосфат через глутамат-5-кіназа [КФ: 2.7.2.11 ], після чого глутаміл фосфат переходить в глутамат-5-напівальдегід через глутамат-5-напівальдегіддегідрогеназа [КФ: 1.2.1.41

], після чого під дією ферменту пірролін-5-карбоксилатредуктаза [КФ:  
1.5.1.2 ] утворюється пролін.

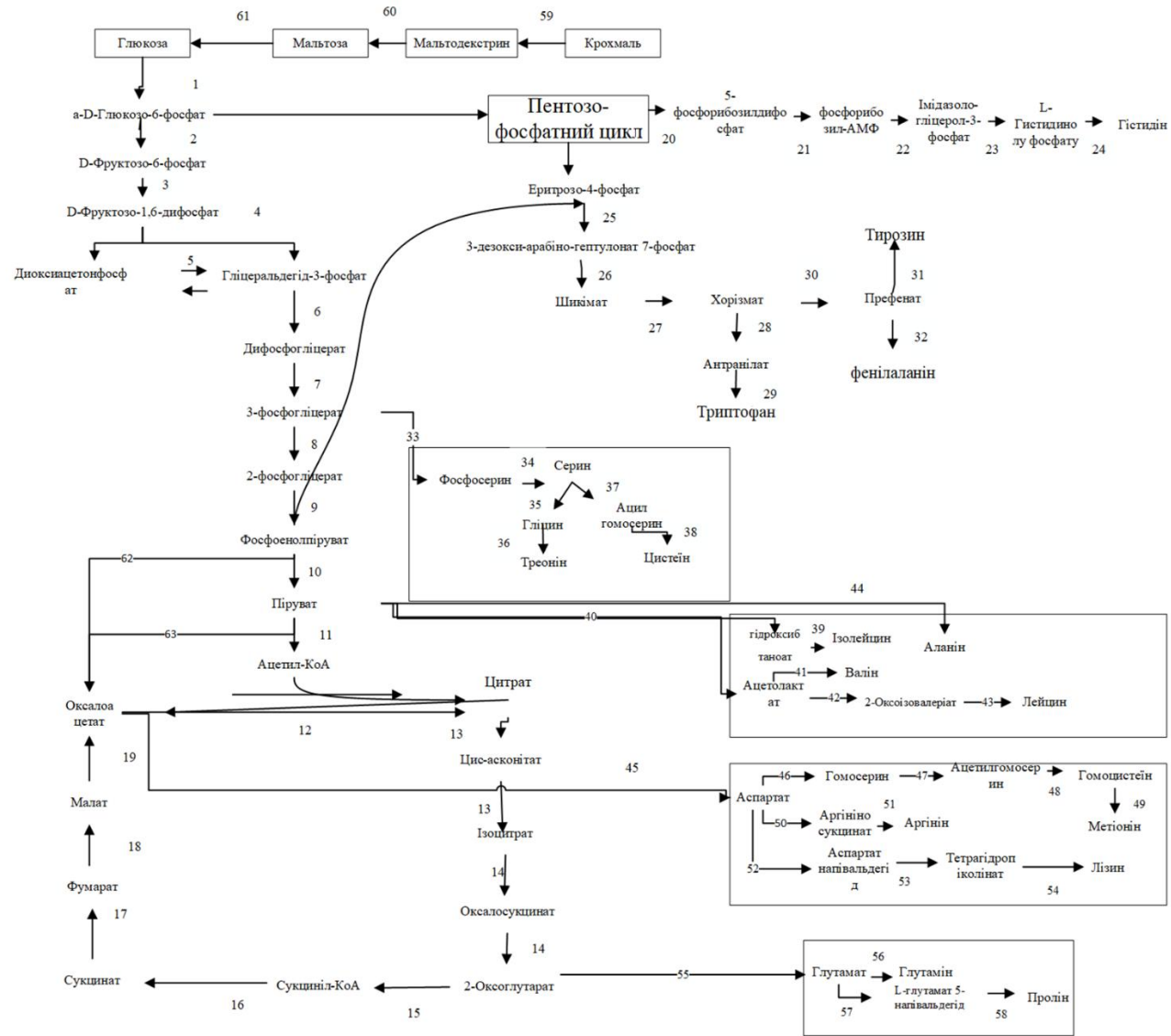


Рис. 4.2. Схема біосинтезу всіх протеїногенних амінокислот, що наявні в екзополіпептидах *Arthrobacter sp.* [31-41].

## РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 5.1. Обґрунтування умов культивування і типу ферментера

*Arthrobacter* sp. LY-1 є бактерією ризосфери землі, що зумовлює певні відмінності у культивуванні, що зумовлено природнім ареалом існування цих бактерій:

Оптимальні умови культивування *Arthrobacter* sp. LY-1 [42]:

Оптимальна температура росту	30°C
Оптимальний рН	7.0
Відношення до кисню	Облігантний аероб

Враховуючи характеристики штаму, необхідно застосувати асептичне культивування, оскільки *Arthrobacter* sp. LY-1 зростає і розвивається в умовах, подібних до культивування інших бактерій ризосфери ґрунту, грибів та дріжджів. Будь-яка контамінація може знизити вихід біомаси, що впливає на метаболічну активність кінцевого продукту, тому для культивування було обрано саме асептичний метод.

Мною обраний глибинний метод культивування, оскільки він економічно та виробничо вигідний. Глибинне культивування є простішим у реалізації, і оскільки кінцевим продуктом є культуральна рідина або центрифугат культуральної рідини, цей метод дозволяє отримувати кінцевий продукт одразу у його формі готового продукту.

					НУХТ БТЕК 04.03.25 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Мартиненко Я.О.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.				40	30
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

Оснащення для культивування *Arthrobacter* sp. LY-1 представляє собою класичний індустриальний ферментер, який має всі класичні функції фізико-хімічного контролю середовища та який би відповідав наступним вимогам:

#### **Елементи для реалізації аерації культуральної рідини.**

Оскільки *Arthrobacter* sp. LY-1 є облігантним аеробом, то наявність барботера та турбінної мішалки є обов'язковими для максимальної інтенсифікації трансферу кисню через культуральну рідину.

#### **Елементи контролю рН середовища**

Оскільки *Arthrobacter* sp. LY-1 як закислює середовище під час розвитку культури, і при рН нижче за 5 спостерігається значне інгібування росту та активності атразин-деградуючих ферментів, тому стерильне внесення розчину титрантів є необхідною функцією ферментера.

#### **Контроль концентрації цільового продукту**

Контроль концентрації цільового продукту є ключовим аналітичним відстеженням процесу культивування, тому у ферментері має бути присутня функція стерильного відбирання проб.

#### **Аналітичні інструменти ферментера**

Фізико-хімічні показники є ключовими в аналізі процесу культивування, тому ферментер має бути оснащений датчиками рН, концентрації розчиненого кисню, концентрації CO<sub>2</sub>, датчиками температури та термо-сорочкою, яка б підтримувала стабільну температуру культивування.

Оскільки в процесі культивування передбачається виділення CO<sub>2</sub>, тому важливими компонентами ферментера також є патрубок викачування вуглекислого газу та барботер для подачі стерильного повітря.

Оскільки ферментери для асептичного культивування об'ємом 1000 літрів вважаються велико-габаритними, знайти готову модель досить складно, тому пропонується звертатися в компанії які займаються розробкою ферментерів під замовлення, наприклад компанія BaoxingBIO,

що займається проєктуванням та продажем ферментерів. Згідно представленної веб-сторінки [43], велико-габаритні ферментери цієї фірми оснащуються всіма необхідними компонентами, згаданими у цьому підрозділі.

## **5.2. Обґрунтування системи аерації для ефективного культивування *Arthrobacter sp.***

*Arthrobacter sp.* є строгим аеробом, для ефективного культивування якого необхідна постійна подача стерильного повітря. Висока життєздатність клітин, яка має становити щонайменше  $4.5 \times 10^8$  КУО/мл [44] є критичною для забезпечення якості кінцевого продукту. У зв'язку з цим, безперервна аерація протягом усього 44-годинного циклу культивування є обов'язковою умовою.

Виходячи з розрахунків, геометричний об'єм ферментера складає 1,25 м<sup>3</sup>. При співвідношенні висоти до діаметра 1:3 висота ферментера дорівнює 3,6 м. Зважаючи на висоту стелі виробничого приміщення в 10 м, повітря буде забиратися із зовнішнього середовища через забірну трубу довжиною 13 м, розташовану на 3 м вище найвищої точки будівлі.

Для забезпечення чистоти повітря розроблена багатоступенева система його підготовки:

- 1. Первинне забирання повітря.** Забір зовнішнього повітря здійснюється через повітрязабірну трубу довжиною 13 м.
- 2. Грубе очищення.** Повітря спрямовується до фільтра початкового очищення класу G1-G5, здатного видаляти до 90% частинок розміром  $\geq 10$  мкм.
- 3. Стиснення та нагрівання.** Очищене повітря потрапляє до компресора, де стискається до тиску 0,35–0,5 МПа. В результаті цього процесу температура повітря підвищується до 120–250°C.
- 4. Охолодження та видалення вологи.** Стиснене гаряче повітря проходить через водяний теплообмінник, де охолоджується. У краплєвловлювачі відбувається конденсація та видалення вологи.

5. **Вирівнювання тиску.** Для подальшої стабілізації тиску та остаточного видалення вологи повітря спрямовується до ресивера.
6. **Додаткова фільтрація.** Повітря проходить через триступеневу систему фільтрів (класи M5, M6 та F7), які ефективно видаляють до 98% частинок розміром 3–10 мкм та до 90% частинок розміром 0,3–3 мкм.
7. **Фільтри тонкого очищення.** На повітропроводах, що постачають повітря до ферментера та інокулятора, встановлено фільтри тонкого очищення класів F8–F9. Вони затримують 99,999% частинок розміром 0,3–1 мкм або більше.

Оскільки всі вищезгадані фільтри виготовлені з волокнистих матеріалів і за своєю структурою є тканинними, перед використанням вони проходять стерилізацію. Для усунення сторонньої мікрофлори фільтри обробляються насиченою парою за температури 130°C протягом 40 хвилин [45].

### **5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

#### **5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів для біотехнологічного виробництва**

*Мийні засоби* — це як окремі хімічні сполуки, так і комплексні суміші речовин, які взаємно підсилюють ефективність одна одної. До їх складу входять поверхнево-активні речовини (ПАР) та компоненти, що знижують піноутворення. Зазвичай доцільніше використовувати багатокомпонентні мийні препарати, оскільки вони забезпечують ширший спектр дії та вищу ефективність очищення. Для повного видалення всіх типів забруднень застосовуються як лужні, так і кислотні мийні засоби. Лужні склади ефективно гідролізують білки та жири, сприяючи їхньому видаленню, тоді як кислотні засоби розчиняють мінеральні відкладення і забезпечують їхнє очищення з поверхонь обладнання [46].

До складу лужних мийних засобів, які застосовуються як окремо, так і в комбінації з іншими хімічними компонентами, найчастіше входить гідроксид натрію (каустична сода) та його солі.

Мийні засоби використовуються у формі водних розчинів, які повинні відповідати низці функціональних вимог. Зокрема, такі розчини мають характеризуватися низьким поверхневим натягом, високою змочувальною здатністю, вираженими піноутворювальними та емульгуючими властивостями. Важливими також є стабілізуючий ефект, здатність до солюбілізації, викликання пептизації та набухання білків. Крім того, мийні розчини повинні забезпечувати ефективне очищення та легко змиватися з поверхонь обладнання водою.

*Дезінфікуючі засоби:* на біотехнологічних виробництвах, де здійснюється масова обробка великих площ обладнання та приміщень, перевага надається доступним за ціною та водночас достатньо ефективним дезінфекційним засобам. Основною метою такої обробки є зменшення рівня сторонньої мікрофлори на поверхнях виробничих приміщень і устаткування. Зазвичай дезінфекція забезпечує зниження мікробної контамінації на 40–60% від початкового рівня. Під час вибору дезінфекційного засобу важливо враховувати не лише його біоцидну активність і спектр дії, але й потенційну токсичність для людини.

Сучасні дезінфекційні засоби повинні відповідати ряду ключових вимог, серед яких:

- 1) наявність широкого спектра антимікробної активності;
- 2) виражений бактерицидний ефект;
- 3) добра розчинність у водному середовищі;
- 4) відсутність руйнівного або корозійного впливу на оброблювані поверхні;
- 5) низький рівень токсичності та мінімальна ймовірність викликати алергічні реакції [46].

Отже, слід підібрати відповідні миючі та дезінфікуючі засоби для підтримання належних умов виробництва на біотехнологічному підприємстві з отримання біопрепарату з використанням нового штаму атразин деградуючих бактерій *Athrobacter* sp. LY-1.

Таблиця 5.1

## Підбір миючих та дезінфікуючих засобів

Назва, виробник	Склад	Активність	Властивості та сумісність	Спосіб застосування	Дані про державну реєстрацію	Вартість 1 л/кг	Джерело
<b>Дезінфікуючі засоби для обробки приміщень та поверхонь</b>							
Засіб дезінфекційний «Саніліт» ТОВ «М Д М», Україна	Натрієва сіль дихлороізоціанурової кислоти – 81, допоміжні компоненти, що забезпечують мийні властивості засобу та швидку розчинну дію таблеток (адипінова кислота), знижують корозійну дію хлору (бікарбонат натрію та карбонат натрію – 11). Вміст активного хлору не	Володіє антимікробною активністю відносно грамнегативних і грампозитивних бактерій, вірусів, патогенних грибів роду <i>Candida</i> , дерматофітів	Засіб добре розчиняється у воді. Водні розчини засобу прозорі, мають легкий запах хлору, відмінні змочувальні, мийні, відбілюючі, емільгуючі властивості, не пошкоджують вироби зі скла, полімерних матеріалів, гуми, корозійностійких металів, не фіксують забруднення органічного походження, добре змиваються з оброблених поверхонь, не залишаючи плям та нальоту. Робочі розчини засобу видаляють механічні, білкові, жирові забруднення, залишки біологічних рідин, лікарських	Поверхні у приміщеннях, санітарно-технічне устаткування, жорсткі меблі, поверхні приладів, апаратів зрошують або протирають ганчір'ям, змоченим у розчині засобу при нормі витрати робочого розчину	Від 21.04.2020 до 21.04.2025	445	[47]

Продовження таблиці 5.1

	менше 50 %.		засобів із зовнішніх поверхонь, порожнин та каналів виробів медичного призначення. Засіб сумісний із аніонними, амфотерними та неіоногенними поверхнево-активними речовинами (у т.ч. милами), солями лужних металів неорганічних та органічних кислот.	засобу - 100 мл/м <sup>2</sup> оброблюваної поверхні.			
Засіб дезінфікуючий «НС-DPE»  Дочірнє Підприємство «Глобал Хім Україна», Україна	Перекис водню у межах 20,0-35,0 % та надоцтова кислота у межах 15,0-30,0 %, стабілізатори	Забезпечує знищення вірусів, бактерій, грибів та їх спор при температурі 5-20°C.	Дезінфікуючий рідкий надзвичайно швидкодіючий непінний засіб на основі стабілізованої комбінації пероксиду водню і надоцтової кислоти. Робочий розчин (макс. 1%-ий) не пошкоджує поверхні з хромонікелевої сталі, алюмінію, оцинкованого заліза, кислотостійких полімерних матеріалів (поліетилен, полістирол, тефлон).	Поверхні у приміщеннях, санітарно-технічне устаткування, жорсткі меблі, поверхні приладів, апаратів зрошують або протирають ганчір'ям, змоченим у розчині	Від 02.06.2020 до 02.06.2025	167,34	[48]

Продовження таблиці 5.1

				засобу при нормі витрати робочого розчину засобу - 100 мл/м <sup>2</sup> оброблюваної поверхні.			
Засіб дезінфекційний «ЕконормDEZ Преміум»  Товариство з обмеженою відповідальністю «ДЕЗ-ЕКОМ», Україна	Діючі речовини: 21,0 - N,N'-біс(3-амінопропіл)-додецилдиметиламоній хлориду; допоміжні речовини: вода підготовлена, поверхнево-активні речовини.	Володіє антимікробною активністю відносно грамнегативних і грампозитивних бактерій, вірусів, патогенних грибів, спор	Засіб добре розчиняється у воді. Водні розчини засобу прозорі, мають відмінні мийні, змочувальні, емульгуючі властивості, не викликають корозії металів, не пошкоджують вироби, що виготовлені із корозійностійких і нестійких до корозії металів, скла, полімерних матеріалів, поліетилену, поліаміду, полістиролу, акрилового скла, силікону, гуми, каучуку, дерева, фаянсу, кахлю, поверхонь медичних приладів та	Дезінфекцію поверхонь у приміщеннях проводять способом протирання ганчір'ям, змоченим у розчині засобу. Норма витрати розчину засобу при протиранні - 100 мл/м <sup>2</sup> .	Від 15.07.2020 до 15.07.2025	800	[49]

Продовження таблиці 5.1

			устаткування із полімерним, лакофарбним, гальванічним покриттям, добре змиваються з поверхонь, підданих обробці, не залишаючи плям та нальоту, не фіксують органічні та неорганічні забруднення.				
<b>Засоби для миття обладнання</b>							
Лужний пінний миючий засіб, концентрат Prima Supra  Primaterra, Україна	Вода, гідроксид натрію, 5-15% неіоногенні ПАВ, глюконат натрію, барвник.	Мас дезінфікуючий ефект.	Для ефективного очищення виробничого обладнання, інвентарю, резервуарів, стін, підлог, вентиляції, каналізаційних систем від білкових, жирових забруднень, нагарів та кіптяви на підприємствах харчової промисловості. Придатний для використання на металевих, пластикових поверхнях, а також керамічній плитці.	Миття обладнання за допомогою СІР-мийки	Відповідно до Постанови Кабінету Міністрів України від 15.08.2023 № 863, миючі засоби, які не мають	133,3	[50]
Лужний миючий засіб для промислового очищення OXIN LD 103	Гідроксид натрію (NaOH) – 5-15%, силікати – 1-5%, неіоногенні та аніонні поверхнево-	Мас дезінфікуючий ефект.	Призначений для очищення виробничого обладнання, ємностей, трубопроводів та поверхонь у харчовій, молочній, м'ясопереробній промисловості та аграрному секторі.	Миття обладнання за допомогою СІР-мийки	дезінфекційних властивостей,	90,4	[51]

Продовження таблиці 5.1

«Абсолют центр», Україна	активні речовини – 1-10%, комплексоутворювачі – 1-5%, вода демінералізована – до 100%		Завдяки активним компонентам засіб ефективно розчиняє та видаляє жирові, білкові та органічні забруднення, що накопичуються під час виробничих процесів. Добре розчиняється у воді, створюючи активну піну, яка глибоко проникає в забруднення, розщеплює їх і полегшує змивання.		не підлягають обов'язковій державній реєстрації як дезінфекційні засоби		
<b>Засоби для обробки шкіри рук персоналу</b>							
Дезінфікуючий засіб для рук APESIN HD  ТОВ «Папір-Клуб», Україна	На 100 г: 40 г пропілового спирту, 1 г дідецилдімонію хлориду; <5% неіонних поверхнево-активних речовин, <5% амфотерних поверхнево-активних речовин	Антисептична, фунгіцидна та бактерицидна дія	Завдяки швидкій експозиції за допомогою втирання протягом 30 секунд, забезпечує швидке та ефективне дезінфікування рук.	Експозиція за допомогою втирання протягом 30 секунд, після чого змити під проточною водою.	Від 02.06.2020 до 02.06.2025	22	[52]

*Закінчення таблиці 5.1*

<p>Дезінфікуючий гель SOLO sterile light ТОВ “НАУКОВО- ВИРОБНИЧЕ ПІДПРИЄМСТ ВО “АТЛАНТИС ХІМ”, Україна</p>	<p>Етанол 70% об., вода дистильована, стабілізатор, косметичні зволожувачі шкіри, ароматична композиція, косметичний загущувач</p>	<p>Антисептичн а, фунгіцидна та бактерицидн а дія</p>	<p>Має нейтральний склад до шкіри рук. Зволожує шкіру та забезпечує пролонговану дію протягом 2-3 годин.</p>	<p>Рівномірне втирання у шкіру рук</p>	<p>Від 19.08.2020 до 19.08.2025</p>	<p>148</p>	<p>[53]</p>
--	--	---	--	--	---	------------	-------------

### 5.3.2. Обґрунтування вибору дезінфікуючих засобів

Залежно від активного компонента, дезінфекційні засоби класифікуються на такі основні групи: галогеновмісні, спиртовмісні, поверхнево-активні речовини, фенольні сполуки, окисники та препарати на основі альдегідів. У сучасній практиці дезінфекції найчастіше використовуються поверхнево-активні речовини (ПАР), зокрема четвертинні амонієві сполуки (ЧАС) та галогенвмісні засоби, переважно з вмістом хлору.

ЧАС мають низьку токсичність, добрі фізико-хімічні та екологічні властивості, проявляють мийну здатність, характеризуються стабільністю як у вигляді концентрату, так і в робочих розчинах, а також є зручними у застосуванні. Водночас до їхніх недоліків належать відсутність спороцидної активності та недостатньо виражені віруліцидні й туберкулоцидні властивості [54].

Гуаніди характеризуються низькою токсичністю та відсутністю летких властивостей. Проте вони демонструють обмежену віруліцидну та туберкулоцидну активність. Їх здатність утворювати захисну плівку на поверхні оброблюваних об'єктів подовжує тривалість незаражувальної дії. Водночас цей ефект є недоцільним при обробці високотехнологічного обладнання, де плівкоутворення є небажаним.

Хлоровмісні засоби вирізняються доступністю та широким спектром антимікробної дії. Однак їх використання обмежується низькою недоліків: несприятливими фізико-хімічними характеристиками, вираженою подразнювальною дією на слизові оболонки очей та верхніх дихальних шляхів, а також корозійним впливом на об'єкти незараження.

Альдегідовмісні дезінфекційні засоби вирізняються універсальністю протимікробної дії та стабільністю під час зберігання, однак характеризуються підвищеною токсичністю. Кисневмісні препарати демонструють виражену бактерицидну, віруліцидну, фунгіцидну та спороцидну активність, проте мають несприятливі фізико-хімічні

властивості, зокрема нестійкість при зберіганні, що обмежує їх використання.

Спиртовмісні засоби забезпечують швидкий антимікробний ефект, але через високу леткість доцільні для знезараження невеликих за розмірами об'єктів або важкодоступних ділянок обладнання та апаратури. Натомість використання фенолів, кислот та лугів у сучасній дезінфекційній практиці поступово втрачає актуальність [54].

Дані по підбору дезінфікуючих засобів представлено у таблиці 5.1.

### **5.3.3. Розрахунки витрат мийних та дезінфікуючих засобів для біотехнологічного виробництва**

Для виробничого біосинтезу необхідно використовувати ферментер об'ємом 1,25 м<sup>3</sup>, посівний апарат об'ємом 0,16 м<sup>3</sup>, посівний апарат об'ємом 0,02 м<sup>3</sup> та 7 колб для отримання необхідного об'єму культуральної рідини та посівного матеріалу.

Загалом для реалізації виробничого процесу, були обгрунтовані наступні апаратні рішення:

Для отримання посівного матеріалу в інокуляторі 15 л

- 1) Інокулятор 15 л для вирощування посівного матеріалу та стерилізації композиції Б
- 2) Реактор змішувач з нижнім зливом об'ємом 10 л для змішування солей композиції Б

Для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 150 л

- 1) Інокулятор 150 л для вирощування посівного матеріалу та стерилізації композиції Б
- 2) Реактор змішувач об'ємом 100 л для змішування солей композиції Б

Для виробничої ферментації в ферментері об'ємом 1250 л

- 1) Ферментер об'ємом 1250 л для вирощування кінцевого продукту та стерилізації композиції Б
- 2) Реактор змішувач об'ємом 1000 л для змішування солей композиції Б

3) Реактор збірник стерилізатор об'ємом 20 л для стерилізації розчину крохмалю композиції А

Для приготування титруючих агентів необхідно

- 1) Збірник змішувач об'ємом 10 л для приготування 6% НСІ
- 2) Збірник змішувач стерилізатор об'ємом 20 л для приготування і стерилізації 6% NaOH.

Виробничий біосинтез проводять в таких виробничих приміщеннях - цех біосинтезу; лабораторія для додаткових підготовчих стадій, в якій розташовано лабораторний бокс, автоклави, холодильники, термостати та інші апарати для контролю виробництва; приміщення з качалками для вирощування інокуляту в колбах.

Для розробки плану виробничого приміщення враховують розміри ферментеру, посівних апаратів та допоміжного обладнання. Відстань між апаратами приймаємо не менше 1 метра, довжину від стін - 1,5 метра.

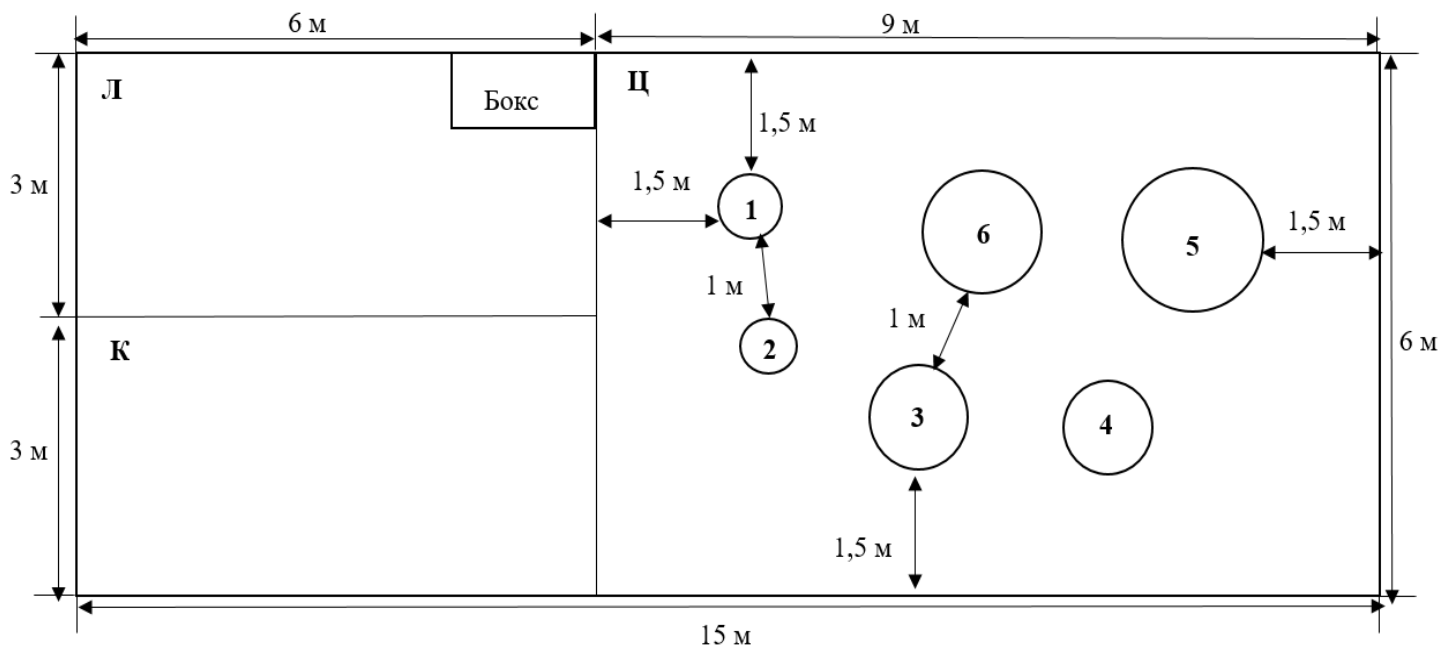


Рис. 5.1. Схематичне зображення плану приміщень для вирощування біомаси атразин деградуючих бактерій *Arthrobacter* sp. LY-1 для отримання біопрепарату.

Ц - цех виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу:  
1 – інокулятор 15 л для вирощування посівного матеріалу та стерилізації

композиції Б; 2 - реактор змішувач з нижнім зливом об'ємом 10 л для змішування солей композиції Б; 3 - інокулятор 150 л для вирощування посівного матеріалу та стерилізації композиції Б; 4 - реактор змішувач об'ємом 100 л для змішування солей композиції Б; 5 - ферментер об'ємом 1250 л для вирощування кінцевого продукту та стерилізації композиції Б; 6 - реактор змішувач об'ємом 1000 л для змішування солей композиції Б; Л – лабораторія; К – приміщення з качалками.

Таблиця 5.2

**Габаритні розміри обладнання для біосинтезу біомаси**

<b>Обладнання</b>	<b>Геометричний об'єм, л</b>	<b>Діаметр, м</b>	<b>Висота, м</b>
Інокулятор для вирощування посівного матеріалу та стерилізації композиції Б	15	0,9	1,7
Реактор змішувач з нижнім зливом для змішування солей композиції Б	10	0,25	0,45
Інокулятор для вирощування посівного матеріалу та стерилізації композиції Б	150	0,41	1,2
Реактор змішувач для змішування солей композиції Б	100	0,5	0,9
Ферментер для вирощування кінцевого продукту та стерилізації композиції Б	1250	1	1,63
Реактор змішувач для змішування солей композиції Б	1000	1	1,4
Реактор збірник стерилізатор для стерилізації розчину крохмалю композиції А	20	0,6	1
Збірник змішувач для приготування 6% HCl	10	0,25	0,45
Збірник змішувач стерилізатор для приготування і стерилізації 6% NaOH	20	0,6	1
<b>Всього</b>	<b>2 590</b>		

Таким чином, загальний об'єм обладнання, що буде піддаватись миттю, становить 2 590 л.

Розрахунок виходу культуральної рідини за 1 цикл ферментації для подальшого розрахунку кількості стадій підготовки посівного матеріалу свідчить, що кількість трудоднів прийнята 280. Тоді приймаємо, що миття підлоги буде здійснюватись 280 разів, тобто щодня. Кожного місяця заплановане генеральне прибирання, до якого входить миття стін, підлоги, вікон тощо, тому кратність миття буде 9 разів на 280 днів.

Далі слід вирахувати цільову площу обробки дезінфікуючими засобами, беручи до уваги площі підлоги виробничих приміщень та площі стін на висоту. Слід зазначити, що стіни підлягатимуть обробці на висоту 2,5 м.

Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить  $54 \text{ м}^2$  ( $9 \times 6 \text{ м}$ ), площа стін –  $[(9 \times 2,5) + (6 \times 2,5)] \times 2 = (22,5 + 15) \times 2 = 75 \text{ м}^2$ , загальна площа –  $54 + 75 = 129 \text{ м}^2$ . Узагальнення розрахунків площ поверхонь, що підлягатимуть обробці дезінфікуючими засобами, наведено в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

#### Площі стін та підлоги приміщень для одержання біомаси

Приміщення	Площа підлоги, $\text{м}^2$	Площа стін, $\text{м}^2$	Загальна площа, $\text{м}^2$
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	54	75	129
Мікробіологічна лабораторія	18	45	63
Приміщення з качалками	18	45	63
<b>Загальна площа</b>	<b>90</b>	<b>165</b>	<b>255</b>

Враховуючи потенційні втрати під час пакування, фасування кінцевого продукту на рівні 5%, необхідний об'єм культуральної рідини складає 90750 л. Кількість культуральної рідини для створення біодобрива за цикл буде становити 730 л. Знаючи це, можна розрахувати кількість виробничих циклів:

$$90750/730 = 124 \text{ цикли}$$

Підготовку обладнання на виробництві здійснюють перед кожним виробничим циклом, отже миття будуть проводити 125 разів, тому що після останнього циклу необхідно додатково очистити обладнання. Тоді загальний обсяг обладнання для миття становить:

$$2,59 \times 125 = 323,75 \text{ м}^3$$

Дані по площах миття й дезінфекції за весь час виробництва біомаси наведено у таблиці 5.4.

Таблиця 5.4

**Площі миття за весь час виробництва**

<b>Об'єкт миття та/або дезінфекції</b>	<b>Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м<sup>2</sup> (м<sup>3</sup>)</b>	<b>Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва</b>	<b>Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м<sup>2</sup> (м<sup>3</sup>)</b>
Обладнання	2,59	125	323,75
Підлога	90	280	25 200
Стіни, двері, вікна	165	9	1 485

Миття обладнання буде проходити за допомогою СІР-мийки, при такому способі миття витрата робочого розчину складає в середньому 20% від загального обсягу оброблюваного апарату. Отже, для миття 323,75 м<sup>3</sup> обладнання необхідно робочого розчину миючого засобу:

$$323,75 \times 0,2 = 64,75 \text{ м}^3 \text{ засобу в рік}$$

Рохраунки витрат миючих та дезінфікуючих засобів з урахуванням економічної доцільності їх використання подано в таблиці 5.5. Було враховано, що витрата робочого розчину дезінфікуючих засобів для обробки поверхонь становить 100 мл на 1 м<sup>2</sup> поверхні.

Таблиця 5.5

## Відомості щодо обраних миючих та дезінфікуючих для виробництва біопрепарату

Назва мийного/ дезінфікувального засобу	Державна реєстрація	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup>	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Лужний пінний миючий засіб, концентрат Prima Supra <sup>1</sup>	Відповідно до Положення про державну реєстрацію дезінфекційних засобів (Постанова Кабінету Міністрів України від 15.08.2023 № 863), миючі засоби, які не мають дезінфекційних властивостей, не підлягають обов'язковій державній реєстрації як дезінфекційні засоби	Обладнання	0,1	323 750	64 750	133,3	0,13	8 417,5
Лужний миючий засіб для промислового очищення OXIN LD 103 <sup>2</sup>		Обладнання	0,5	323 750	64 750	90,4	0,45	29 137,5

Закінчення таблиці 5.5

Засіб дезінфекційний «Саніліт» <sup>3</sup>	Від 21.04.2020 до 21.04.2025	Поверхні приміщень (підлога, стіни)	0,032	26 685*	2 668	445	0,14	373,52
Засіб дезінфікуючий «НС-DPE» <sup>4</sup>	Від 02.06.2020 до 02.06.2025	Поверхні приміщень (підлога, стіни)	0,1	26 685*	2 668	167,34	0,16	426,88
Засіб дезінфекційний «ЕконормDEZ Преміум» <sup>5</sup>	Від 15.07.2020 до 15.07.2025	Поверхні приміщень (підлога, стіни)	0,1	26 685*	2 668	800**	0,8	2 134,4

Примітка: \* - значення розраховано наступним чином -  $25\,200 + 1\,485 = 26\,685\text{ м}^2$ ; \*\* - вказано оптову ціну, від 16 шт. вартість за одиницю становить 800 грн.

1 - <https://primaterra.ua/ua/p1999522489-schelochnoe-pennoe-moyuschee.html?srsId=AfmBOoq49WCiobubo87Q8cJ8v4SyZYuR5aGKp2Nu603W97pHdUpAYfq7>

2 - <https://prom.ua/ua/p2172413035-oxin-103-zasib.html>

3 - <https://dez.ck.ua/sanilit/?srsId=AfmBOoqYUYzS94wgTBdwnIOg8P8zUFRoq5LT9Ctd0IBdQSs1ZzMZlms>

4 - [https://klineko.com.ua/product/hc-dpe/?srsId=AfmBOoqKQB\\_neu261vpc-wn-aMmzWoKqCnRpojks35O6a2iNBAKvi7eF](https://klineko.com.ua/product/hc-dpe/?srsId=AfmBOoqKQB_neu261vpc-wn-aMmzWoKqCnRpojks35O6a2iNBAKvi7eF)

5 - <https://prom.ua/ua/p1751659702-ekonormdez-premium.html>

Отже, згідно таблиці 5.5, за економічним фактором найбільш вигідним варіантом засобу для миття обладнання є лужний пінний миючий засіб, концентрат «Prima Supra», оскільки він майже втричі дешевший за засіб OXIN LD 103. Для дезінфекції приміщень та поверхонь варто обрати засоби «Саніліт» та «НС-DPE», оскільки вони мають набагато нижчу вартість, у порівнянні з «ЕконормDEZ Преміум». Застосовувати ці засоби будемо по чергово, змінюючи кожні 2-3 місяці.

Відповідно до таблиці 5.1, для обробки шкіри рук персоналу будуть використовуватись засоби «APESIN HD» та «SOLO sterile light».

#### **5.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища**

Для культивування *Arthrobacter* sp. LY-1 згідно джерела [42] використовується середовище наступного складу:

Компонент середовища	г/л
Крохмаль	3
KNO <sub>3</sub>	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.5
Розчин мікроелементів 1 мл/л	
FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	1
ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	5
CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	0.4
MnSO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O	1
EDTA:	2.5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	0.25
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ×10H <sub>2</sub> O	0.2

#### **Приготування розчину мікроелементів для всіх стадій культивування *Arthrobacter* sp. LY-1**

Для культивування *Arthrobacter* sp. LY-1 автори статті [42] використовували розчин мікроелементів наступного складу:

1 г/л FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 5 г/л ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 0.4 г/л CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O, 1 г/л MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O, 2.5 г/л EDTA, 0.25 г/л Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O, 0.2 г/л Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>×10H<sub>2</sub>O

Розчин мікроелементів додавали в концентрації 1 мл розчину на 1 л середовища, оскільки загалом протягом всього цикла виробництва буде приготовано 812 л поживного середовища:

$$0.9+7.9+80.1+723 = 812 \text{ л поживного середовища}$$

Виходячи з того, що розчин буде додаватися з розрахунку 1 мл на 1 л середовища, необхідно приготувати 817 мл поживного середовища, для оптимізації виробничих процесів пропонується готувати 1 л розчину, який буде стерилізований та буде окремо дозуватися в асептичних умовах для окремих стадій ферментації. Розчин буде додаватися до композиції Б та стерилізуватися за жорстких умов стерилізації при 131°C протягом 40 хв.

#### **Розрахунок наважок та обґрунтування стерилізації композицій поживного середовища**

Оскільки запропоноване поживне середовище складається переважно із солей і єдиним термолабільним компонентом у його складі є крохмаль, то поживне середовище розділяється на 2 композиції А та Б, де композиція А складається тільки із глюкози, а композиція Б із солей.

Оскільки в складі композиції Б присутні кислі фосфорні солі, а саме  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  та  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , а також солі магнію у вигляді  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , то задля унеможливлення реакції кислих солей та солей магнію ця композиція на етапах створення посівного матеріалу в інокуляторах та виробничому ферментері буде стерилізуватись з пониженням рН до 4-4.5 за допомогою 6% розчину  $\text{HCl}$  [46].

**Композиція А:** Крохмаль, режим стерилізації 112°C, 30 хв

**Композиція Б:**  $\text{KNO}_3$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $\text{NaCl}$  та 1 мл/л розчину мікроелементів, режим стерилізації 131°C, 40 хв/

#### **5.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках**

Оскільки доводити рН до початкового значення культивування (рН 6.5), у вже стерилізованій композиції Б в колбі є досить проблематичним та підвищує ризик контамінації, пропонується для етапу створення посівного

матеріалу в колбах на качалках розділити поживне середовище на 3 композиції:

**Композиція А:** Глюкоза, режим стерилізації 112°C, 30 хв

- **Композиція Б:**  $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$   $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   $\text{NaCl}$  та розчин мікроелементів режим стерилізації 131°C, 40 хв
- **Композиція В:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$  режим стерилізації 131°C, 40 хв

#### **Композиція А**

Композиція А складається з крохмалю і перед стерилізацією крохмаль необхідно розварити при температурі 70°C протягом 30 хв, попередньо суспендувавши в холодній воді, після чого він буде стерилізований у вигляді 3% розчину на дистильованій воді в колбі об'ємом 200 мл за м'яких умов стерилізації 112°C протягом 30 хв в автоклаві

#### **Підготовка та стерилізація композиції Б**

Композиція Б складається з розчину солей  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   $\text{NaCl}$  та розчину мікроелементів, що не реагують між собою і будуть стерелізовані у вигляді розчину на дистильованій воді об'ємом 800 мл за жорських умов стерилізації в колбі об'ємом 2 л при 131°C протягом 40 хв в автоклаві

#### **Підготовка та стерилізація композиції В**

Композиція В складається з кислих фосфорних солей  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , які є реакційно здатними за нейтральної кислотності по відношенню до інших солей. Солі будуть стерилізуватися у вигляді розчину на дистильованій воді об'ємом 100 мл в колбі об'ємом 200 мл за наступних умов стерилізації 131°C протягом 40 хв.

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах**

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі 900 мл, г/л	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	3	2.7	А	0.1
Вода	100			
KNO <sub>3</sub>	1	0.9	Б	0.7
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0.2	0.18		
NaCl	0.5	0.45		
Розчин мікроелементів	1	0.9		
Вода	700			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	0.45	В	0.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	2.7		
Вода	100			

**5.4.2. Приготування поживного середовища для одержання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 15 літрів**

Оскільки на цьому етапі композиція солей може бути стерилізована в інокуляторі, то всі солі можна об'єднати в 1 композицію та довести 6% розчином HCl до рівня рН 4-4.5.

**Композиція А**

Композиція А складається з крохмалю і перед стерилізацією крохмаль необхідно розварити при температурі 70°C протягом 30 хв, попередньо суспендувавши в холодній воді, після чого він буде стерилізований на воді в колбі об'ємом 500 мл за м'яких умов стерилізації 112°C протягом 30 хв в автоклаві

**Композиція Б**

Композиція Б складається з розчину солей KNO<sub>3</sub>, атразину-С8Н14СІN5, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> та розчин

мікроелементів. Для унеможливлення реакції між кислими фосфорними солями та іншими солями рН композиції має бути доведений до 4-4.5 6% розчином HCl. Солі будуть розчинятися в реакторі змішувачі, а стерилізовані в інокуляторі за жорстких умов стерилізації при 131°C протягом 40 хв.

Таблиця 5.7

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 15 л**

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі 8.8 л, г/л	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	3	26.4	А	0.3
Вода	280			
KNO <sub>3</sub>	1	8.8	Б	8.5
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0.2	1.58		
NaCl	0.5	1.76		
Розчин мікроелементів	1	8.8		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	4.4		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	26.4		
Вода	7.8(л)			
Конденсат	0.78			
Всього	8800 мл			

**5.4.3. Приготування поживного середовища для створення посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 150 літрів**

**Композиція А**

Композиція А складається з 216 г крохмалю розчинених у 1050 мл дистильованої води і перед стерилізацією крохмаль необхідно розварити при температурі 70°C протягом 30 хв, попередньо суспендувавши в холодній воді після чого композиція буде стерилізована в автоклаві за наступних умов стерилізації 112°C протягом 30 хв.

**Композиція Б**

Композиція Б складається з розчину солей  $KNO_3$ ,  $MgSO_4 \times 7H_2O$   $NaCl$   $KH_2PO_4$   $K_2HPO_4$  та розчину мікроелементів. Для унеможливлення реакції між кислими фосфорними солями та іншими солями рН композиції має бути доведений до 4-4.5 6% розчином  $HCl$ . Солі будуть розчинятися в реакторі змішувачі, а стерилізовані в інокуляторі за жорстких умов стерилізації при  $131^\circ C$  протягом 40 хв.

Таблиця 5.8

**Композиції стерилізації компонентів поживного середовища для створення посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 150 л**

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі 80,1 л, г/л	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	3	243,3	А	1.3
Вода	1050			
$KNO_3$	1	801	Б	78.8
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0.2	16,2		
$NaCl$	0.5	40		
$KH_2PO_4$	0.5	40		
$K_2HPO_4$	3	243,3		
Розчин мікроелементів	1	81		
Вода	71.7			
Конденсат	7.1			
Всього	81.1 л			

**5.4.4. Приготування поживного середовища для виробничої ферментації в ферментері об'ємом  $1.25 \text{ м}^3$**

**Композиція А**

Композиція А складається з крохмалю 2171 г розчиненого у 7 л холодної водопровідної води в реакторі змішувачі-стерилізаторі, перед стерилізацією композиція розварюється при температурі  $70^\circ C$  протягом 3-30 хв після чого композиція буде стерилізована за м'яких умов стерилізації  $112^\circ C$  протягом 30 хв в реакторі змішувачі-стерилізаторі

## Композиція Б

Композиція Б складається з розчину солей  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   $\text{NaCl}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$  та розчину мікроелементів. Для унеможливлення реакції між кислими фосфорними солями та іншими солями рН композиції має бути доведений до 4-4.5 6% розчином  $\text{HCl}$ . Солі будуть розчинятися в реакторі змішувачі, а стерилізовані в ферментері за жорстких умов стерилізації при  $131^\circ\text{C}$  протягом 40 хв.

Таблиця 5.9

### Композиції стерилізації компонентів поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом $1.25 \text{ м}^3$

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі 723.6 л, г/л	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	3	2171	А	10
Вода	7			
Конденсат	0.7			
$\text{KNO}_3$	1	723	Б	713
$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{CCIN}_5$	0.1	72.4		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	144.72		
$\text{NaCl}$	0.5	361		
Розчин мікроелементів	1	723		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5	361		
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	3	2171		
Вода	645			
Конденсат	64.5			
Всього	723 л			

## 5.5. Підготовка та стерилізація допоміжних розчинів

### 5.5.1. Обґрунтування та приготування 6%-го розчину $\text{HCl}$

6% розчин  $\text{HCl}$  необхідний для реалізації виробничого циклу для того, щоб перед стерилізацією композиції Б, підвищити кислотність

середовища до значення рН 4. Що дозволить стерилізувати всі солі в одному розчині, що в свою чергу оптимізує виробничий процес [45].

Створювати 6% розчин НСІ для коригування рН необхідно з того теоретичного припущення, що 2 мл 6% розчину НСІ [45] знижують значення рН на 1. Оскільки композиція буде створюватися на водопровідній воді, тому початкове значення рН приймаємо за 7.5. Тобто для доведення рН до 4 його необхідно зменшити на 2.5 значення. Тобто 5 мл 6% розчину НСІ, буде використано для зниження рН 1 л композиції Б на 1 значення.

Оскільки 6% розчин НСІ буде використаний до стерилізації, то його приготування пропонується реалізовувати в збірник змішувачі і подавати в апарати шляхом титрування з автоматичною зупинкою на рН = 4.

Як вже було з'ясовано для корекції кислотності 1 л композиції Б потрібно 5 мл, розраховуємо загальний об'єм композицій Б поживного середовища для створення посівного матеріалу та виробничого культивування:

Композиція Б для створення посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 15 л: 7.9 л.

Композиція Б для створення посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 150 л: 80.1 л.

Композиція Б для створення посівного матеріалу в виробничому ферментері об'ємом 1250 л: 723.6 л.

$$(7.9+80.1+723.6)*5 = 4040 \text{ мл } 6\% \text{ розчину НСІ}$$

Оскільки в середовищі присутній широкий спектр солей які мають буферну властивість, зокрема поєднання  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  та  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  то пропонується створювати 4500 мл 6% розчину НСІ.

Щоб підготувати 4500 мл 6% розчину НСІ із 36% розчину НСІ і дистильованої води, можна скористатися формулою розведення:

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

- $C1$  — початкова концентрація (36%),

- V1 — об'єм концентрованого розчину, який потрібно взяти,
- C2 — кінцева концентрація (6%),
- V2 — кінцевий об'єм (4500 мл).

Тобто:

$$V1 = (6 \cdot 4500) / 36 = 750 \text{ мл } 36\% \text{ розчину HCl}$$

Віднімаючи від загального об'єму 36% розчин і отримуємо:

$$4500 - 750 = 3750 \text{ мл дистильованої води}$$

Таким чином, для приготування 4500 мл 6% розчину HCl необхідно 3750 мл дистильованої води та 750 мл 36% розчину HCl.

Розчин пропонується готувати в збірнику змішувачі об'ємом 10 літрів (з корисним об'ємом не менше 5 л).

### **5.5.2. Обґрунтування та підготовка з стерилізацією 6% розчину**

#### **NaOH**

6% розчин їдкого натру необхідний для доведення рН композиції Б після стерилізації до значення 7.0, а також оскільки згідно складу поживного середовища, яке містить глюкозу та  $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$  і  $\text{KNO}_3$  [42], які під час свого метаболізму поступово закислюють середовища, вирогідно культуральна рідина під час ферментації потребуватиме підтитровки 6% розчином NaOH, тож для забезпечення всіх потреб пропонується підготувати 5000 мл 6% розчину їдкого натру.

Для приготування 5000 мл NaOH необхідно взяти  $(5000 \cdot 0.06 = 300)$  300 г сухого грінульованого NaOH та розвести в 4700 мл води водопровідної, після чого стерилізувати за жорстких умов  $131^\circ\text{C}$  протягом 40 хв в реакторі змшувачі-стерилізаторі об'ємом 10 л.

Загалом для реалізації виробничого процесу, були обґрунтовані наступні апаратні рішення:

Для створення посівного матеріалу в інокуляторі 15 л.

- 1) Інокулятор 15 л для створення посівного матеріалу та стерилізації композиції Б

2) Реактор змішувач з нижнім зливом об'ємом 10 л для змішування солей композиції Б

Для створення посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 150 л

1) Інокулятор 150 л для створення посівного матеріалу та стерилізації композиції Б

2) Реактор змішувач об'ємом 100 л для змішування солей композиції Б

Для виробничої ферментації в ферментері об'ємом 1250 л

1) Ферментер об'ємом 1250 л для створення кінцевого продукту та стерилізації композиції Б

2) Реактор змішувач об'ємом 1000 л для змішування солей композиції Б

3) Реактор збірник стерилізатор об'ємом 20 л для стерилізації розчину крохмалю композиція А

Для приготування титруючих агентів необхідно

1) Збірник змішувач об'ємом 10 л для створення 6% HCl

2) Збірник змішувач стерилізатор об'ємом 20 л для створення 6% NaOH.

**РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ  
ВИРОБНИЦТВА БІОПРЕПАРАТУ *ARTHROBACTER SP. LY-1***

*Таблиця 6.1*

**Специфікація обладнання для виробництва атразин-деградуючого  
біопрепарату на основі *Arthrobacter sp. LY-1***

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
ПЗ-1	Повітрязабірник для подачі повітря до компресора	1	Повітрязабірник стіновий NavyFlex VLB100 Виробництво Польща [55]
ФГО-2	Фільтр грубої очистки для попередньої фільтрації повітря	1	Карманий фільтр для вентиляції класу очистки F5. Ефективність для часточок більше 5 мкм 90%. Виробник: Словаччина [56]
К-3	Компресор для стискання та забору повітря	1	Виробник: німеччина Продуктивність: до 5 м <sup>3</sup> /хв (залежить від тиску). Тиск нагнітання: стандарт — 7–10 бар [57]
ТО-4	Теплообмінник охолоджувач, для видалення зайвої вологи з повітря	1	Максимальна пропускна здатність до 1500 літрів/ 1,5 м <sup>3</sup> /хв Тип компресора: гвинтовий/поршневий Робочий діапазон зовнішньої температури: 2 – 45 °С; Розміри: 730 x 420 x 770 мм; [58]
Р-5	Ресивер для стабілізації тиску повітря	1	Ресивер виробництва України, об'єм 2700 л, тиск до 10 бар [59]
ТН-6	Теплообмінник нагрівач для стабілізації вологості та температури повітря	1	Тип: водяний Розмір прямокутного каналу: 1000×500 мм Кількість рядів трубок: 3 Габаритні розміри: ширина — 1165 мм, висота — 540 мм, глибина — 200 мм [60]

					<b>НУХТ БТЕК 04.03.25 КР ПЗ</b>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Мартиненко Я.О.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.				70	3
Реценз.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					<b>РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання для виробництва біопрепарату <i>Arthrobacter sp.</i> LY-1</b>		

Продовження табл. 6.1

Ф-7	Фільтр тонкої очистки НЕРА	1	Фільтр тонкого очищення повітря Клас очищення: EN 779: H14, У волокна діаметром 0,25 волокон різної товщини, отримувати матеріали необхідної ефективності 99,9995), 610x610x150 [61]
ДЗ-8 ДЗ-10 ДЗ-12 ДЗ-17 ДЗ-22 ДЗ-26	Ваги технічні лабораторні для зважування композицій солей та крохмалю	5	Ваги лабораторні електронні ІНВ-24 Точність до другого знаку Максимальна допустима вимірювальна вага 6000 г
ЗЗ-9	Збірник-змішувач для приготування 6% розчину соляної кислоти	1	Ємність буферна об'ємом 15 літрів, з нижнім зливом та відкидною кришкою [62]
Л-18 Л-23 Л-27	Дозатор-лічильник води, автоматичний	3	Дозування від 10 мл та більше [63]
Р-11	Реактор-стерилізатор для приготування і стерилізації 6% розчину NaOH.	1	Об'єм робочий: 20 л Об'єм повний: 23 л Робочий тиск: від 0,9 до 3,0 бар Діапазон температур при стерилізації: +2...+130°C Робоче середовище у теплообмінній сорочці: пара (режим нагріву та стерилізації), вода (режим охолодження) ширина x висота 1085x 600 x1150 Швидкість обертання мішалки: плавно-регульована, 0–500 об/хв [64]
ЗЗ-13	Реактор-змішувач для композиції Б об'ємом 10 л	1	Апарат Сеон 0.010 Євромаш Розміри: 250мм*350мм*450мм Частота обертів мішалки 100 [70]
Н-14	Відцентровий насос для перекачування композиції Б до інокулятора 10 л	1	ОЕМ Mini DC Brushless Water Максимальна продуктивність: 15 л/хв [66]

Закінчення табл. 6.1

И-15	Інокулятор об'ємом 15 літрів	1	Інокулятор об'ємом 15 л «Techforce 15» Габаритні розміри: Висота 500 мм Діаметр 200 мм [65]
И-16	Насос перистальтичний для перекачування інокулянту з И-15 до		Насос перистальтичний Grothen G1016-1, 1500 мл/хв
33-19	Реактор збірник-змішувач для розчинення солей для композиції Б об'ємом 100 л	1	Апарат Сеон 0.1 Евромаш Розміри: 508*930*2800 мм Максимальна швидкість мішалки 100 об/хв [70]
И-19	Відцентровий насос для перекачування композиції Б в інокулятор об'ємом 150 л	1	ОЕМ Mini DC Brushless Water Максимальна продуктивність: 15 л/хв
И-21	Інокулятор об'ємом 150 л	1	Біореактор precision об'ємом 150 л Діаметр 457 мм висота 1200 мм [69]
33-24	Реактор збірник змішувач для композиції Б 1000 л	1	Апарат Сеон 1 Розміри: 1000*1410*3470 [70]
И-25	Відцентровий насос для перекачування композиції Б	1	Хімічний відцентровий насос із магнітною муфтою CM MAG-P4 PP, 3,4 м3/год (56,6 л/хв); натиск 7 м
ФР-29	Ферментер об'ємом 1250 л	1	Ферментер Umamachinery 1250 л об'єм. Висота: 2100 мм Діаметр: 1070 мм Максимальна швидкість мішалки 144 об/хв [72]

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ БІОПРЕПАРАТУ *ARTHROBACTER SP. LY-1*

### ДР 1 Підготовка та очищення аераційного повітря

#### ДР.1.1 Забір атмосферного повітря

Забір повітря відбувається через повітрязабірник (ПЗ-1), що знаходиться на висоті, що знаходиться на висоті 10 метрів.

#### ДР 1.2 Очищення від грубих домішок

На шляху до компресора у вентиляційній трубі встановлюється фільтр грубої очистки повітря (ФГО-2), задля видалення великодисперсних домішок розміром 5 мкм та більше з ефективністю  $E=90\%$

#### ДР 1.3 Компресування повітря

Для забезпечення необхідної аерації, подолання гідравлічного тиску рідини в ферментері, усунення інших опорів, а також для задоволення виробничих потреб, повітря стискають у компресорі (К-3). У процесі стиснення температура повітря підвищується до 120-200 °С, а тиск досягає 0,35 МПа.

#### ДР 1.4 Охолодження та видалення вологи з повітря

Стиснене повітря (з ДР 1.3) охолоджують у теплообміннику-осушувачі (Т-4) до 25-30 °С, щоб усунути надлишкову вологу. Для цього використовується ресивер (Р-5), який не лише видаляє зайву вологу, але й стабілізує потік повітря, запобігаючи пульсаціям, що можуть негативно вплинути на ефективність наступних фільтрів очищення. Оптимальна вологість повітря має становити 60-70%.

					НУХТ БТЕК 04.03.25 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мартиненко Я.О.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми біосинтезу біопрепарату <i>Arthrobacter sp. LY-1</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.					73	8
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

### **ДР 1.5 Стабілізація показників повітря**

Враховуючи те, що повітря протягом свого шляху до апаратів охолоджується та може падати рівень його волостї, то важливо стабілізувати показники повітря перед виходом його на подальшу фільтрацію, тому використовуючи теплообмінник-нагрівач (ТН-6), повітря нагрівається орієнтовно до 45-50°C, а вологість встановлюється на рівні 50%

### **ДР 1.6 Тонка фільтрація аераційного повітря**

Після стабілізації показників, повітря (від ДР.1.5) подається в фільтр тонкої очистки класу HEPA (Ф-7), з ефективністю затримання до 98% мікро-організмів.

### **ДР 1.7. Очищення повітря для індивідуальних фільтрах**

Після проходження повітря через фільтр тонкої очистки (від ДР 1.6), повітря подається в загальну магістраль подачі аераційного повітря і перед прямою подачею в апарати повітря проходить індивідуальні фільтри інокулятора та посівних апаратів, які є вбудованими і передбачені специфікацією самих апаратів, та індивідуальний фільтр виробничого ферментера (Ф-32), який видаляє 99.997% часточок розміром 0.2 мкм та більше.

## **ДР 2. Підготовка та стерилізація титрувальних агентів**

### **ДР 2.1. Приготування 6%-го розчину HCl**

Створювати розчини для коригування рН планується з розрахунку 5 мл 6% розчину HCl на літр виробничого середовища, що стерилізується в ферментері або інокуляторі тому для всього виробничого процесу, необхідно приготувати 2.940 літри (5\*588). Для приготування 2.940 літрів 6%-го розчину HCl у збірник (ЗЗ-9) об'ємом 5 літрів подається попередньо стерилізовані 2.45 літри дистильованої води відміряні мірним циліндром після чого подають подають 490 мл 36% розчину HCl відміряні попередньо у скляному мірному циліндрі (ДЗ-8).

### **ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH**

Для коригування рН протягом ферментаційного процесу варто підготувати 6-% розчин NaOH в об'ємі 5 літрів. Для цього необхідно в колбу або стакан об'ємом 5 л подати 300 грам безводного NaOH відважених на технічних вагах (ДЗ-10) розвести спочатку в 2000 мл дистильованої води та перемішувати за допомогою магнітної мішалки до повного розчинення наважки, після чого довести об'єм до 5 л за позначкою стакану або колби, після чого подати розчин в реактор стерилізатор (Р-11) та стерилізувати при температурі 131°C протягом 40 хв.

### **ДР 3. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів**

На технічних лабораторних вагах зважують наступні компоненти FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O: 1 г, ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O: 5 г, CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O: 0.4 г, MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O: 1 г, EDTA: 2.5 г, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O: 0.25 г, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>×10H<sub>2</sub>O: 0.2 г, та заносять у мірний стакан, після чого наливають 0.5 л дистильованої води та за допомогою магнітної мішалки перемішують композицію до повного її розчинення, після чого за допомогою мірного циліндра доводять об'єм розчину до 1 л. Розчин зберігають в холодильнику протягом всього циклу культивування, у випадку випадіння осаду роблять розчин заново.

### **ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ**

**ДР 4.1 Приготування і стерилізація поживних середовищ для культивування у колбах на качалках**

#### **ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А**

У колбу ємністю 200 мл наливають 100 мл питної води після чого наважку крохмалю 2.7 г зважують на технічних терезах та заносять у колбу, колбу нагрівають до 70°C та витримують за такої температури при перемішуванні протягом 20 хв. Після чого щільно закривають колбу ватно-марлевым короком, та відправляють на стерилізацію в автоклав при температурі 112°C на 40 хв.

#### **ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б**

У колбу ємністю 1 л заливають відміряні мірним циліндром 700 мл води дистильованої, після чого зважені на технічних вагах наважки KNO<sub>3</sub>:

1 г,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ : 0.18 г,  $\text{NaCl}$ : 0.45 г, г та почерзі додають до колби чекаючи повного розчинення. Після чого додають 0.9 мл розчину мікроелементів (від ДР 3) за допомогою піпетки об'ємом 1 мл та перемішують композицію за допомогою магнітної мішалки, після чого колбу закривають ватно-марлевым короком та ставлять на стерилізацію за температури  $130^\circ\text{C}$  на 30 хв.

#### **ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В**

Наважки  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0.45 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 2.7 г заважують на технічних лабораторних вагах, заносять в колбу об'ємом 200 мл та додають дистильовану воду об'ємом 100 мл відміряні мірний циліндром об'ємом 500 мл. Після чого перемішують композицію за допомогою магнітної мішалки до повного розчинення солей, після чого колбу щільно закривають ватно-марлевым короком та ставлять в автоклав на стерилізацію при  $131^\circ\text{C}$  протягом 40 хв.

#### **ДР 4.2. Приготування та стерилізація композицій поживного середовища 15 л**

##### **ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А**

У колбу ємністю 500 мл наливають 150 мл питної води після чого наважку крохмалю 26.4 г зважують на технічних терезах та заносять у колбу та розчиняють за допомогою магнітної мішалки, після чого нагрівають до  $70^\circ\text{C}$  та витримують за такої температури протягом 20 хв, після чого за допомогою мірного циліндра доводять розчин до об'єму 200 мл. Після чого щільно закривають колбу ватно-марлевым корком, та відправляють на стерилізацію в автоклав при температурі  $112^\circ\text{C}$  на 40 хв.

##### **ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б**

У реактор-змішувач ємністю 10 л (33-13) подають зважені на технічних вагах (ДЗ-12) наважки,  $\text{KNO}_3$ : 8.8 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 4.4 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 26.4 г  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ : 1.58 г,  $\text{NaCl}$ : 1.76 г. Після чого додають 8.8 мл розчину мікроелементів (від ДР 3) потім заливають відміряні мірним стаканом 7.9 л води дистильованої. Після чого глуху пару подають в сорочку апарату та

нагрівають розчин до 70°C та включають мішалку апарата з швидкістю 50 об/хв, після повного розчинення солей за допомогою відцентрового насосу (Н-14) розчин перекачують в інокулятор (ІН-15) Після чого додають 6% розчину НСІ для доведення рН до значення 4, орієнтуються по датчику рН інокулятора та ставлять на стерилізацію за температури 131°C на 30 хв.

### **ДР 4.3 Приготування та стерилізація композицій поживного середовища для створення посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 150 л.**

#### **ДР 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А**

У колбу ємністю 2000 мл подають 243,3 г крохмалю попередньо відважену на технічних лабораторних вагах. Після чого в колбу подають 800 мл дистильованої води та нагрівають колбу на водяній бані до 70°C та витримують за такої температури 20 хв. Після чого доводять розчин за допомогою мірного циліндру до об'єму 1300 мл. Після чого щільно закривають колбу ватно-марлевым корком, та відправляють на стерилізацію в автоклав при температурі 112°C на 40 хв.

#### **ДР 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б**

У реактор-змішувач ємністю 100 л подають зважені на технічних вагах (ДЗ-17) наважки,  $\text{KNO}_3$ : 80.1 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 40 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 243,3 г  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ : 16,2 г,  $\text{NaCl}$ : 40 г та 81 мл розчину мікроелементів (від ДР 3) після чого подають за допомогою лічильника-дозатора (Л-18) 63 л води питної та подають глуху пару в сорочку апарата нагріваючи розчин до 70°C при включеній мішалці (100-150 об/хв). По завершенню розчинення компонентів за допомогою відцентрового насоса (Н-20) розчин перекачують в інокулятор об'ємом 150 л (ІН-21). Після чого титрують 6% розчином НСІ для доведення рН до значення 4, після чого інокулятор закривають та встановлюють режим стерилізації температура 131°C на 30 хв.

### **ДР 4.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування**

#### **ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А**

У реактор-стерилізатор ємністю 20 л (Р-28) подають наважку крохмалю 2171 г зважену на технічних лабораторних (ДЗ-26) вагах та за допомогою рідинного дозатора-лічильника (Л-27) заливають 7000 мл питної води. Після подачі води, подають глуху пару в сорочку апарату та нагрівають розчин до 70°C при працюючій мішалці (100-150 об/хв) витримуючи цю температуру протягом 20 хв, після чого реактор переводять в режим стерилізації за температури 112°C на 30 хв.

#### **ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б**

У реактор-змішувач ємністю 1000 л (ЗЗ-24) подають наважки солей відважені на технічних вагах (ДЗ-22)  $\text{KNO}_3$ : 723 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 361 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 2171 г  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ : 144.72 г,  $\text{NaCl}$ : 361 г,  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{ClN}_5$ : 72.4г та 723 мл розчину мікроелементів (від ДР 3) попередньо зважені на технічних лабораторних вагах після чого за допомогою лічильника-дозатора (Л-23) подають 645 л води питної. Та за допомогою глухої пари поданої в сорочку апарату нагрівають розчин солей до 70°C паралельно включаючи мішалку зі швидкістю 100 об/хв. Після повного розчинення солей за допомогою відцентрового насоса (Н-25) розчин перекачують у виробничий ферментер (ФР-29) де титрують 6% розчином  $\text{HCl}$  для доведення рН до значення 4, після чого встановлюють режим стерилізації температура 131°C на 30 хв.

### **ТП 5. Виробничий біосинтез**

#### **ТП 5.1. Підтримання колекційної культури**

Колекційну виробничу культуру *Arthrobacter* sp. LY-1 зберігають у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі Лурія Бертані, при температурі 2-4°C. Пересіви на свіже поживне середовище проводять 1-2 рази на місяць. Всі роботи з колекційною культурою мають проводитися в умовах асептики.

#### **ТП 5.2. Одержання робочої культури для культивування**

*Arthrobacter* sp. LY-1 пересівається зі скошеного агару Лурія Бертані на чашку Петрі з середовищем Лурія Бертані методом виснажуючого

штриха задля виділення окремих колоній, після чого інкубують у термостаті при 30°C протягом 2-3-х діб.

### **ТП 5.3. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах**

Отримані ізольовані колонії з чашки Петрі (від ТП 5.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним агаром Лурія Бертані (по одній колонії на пробірку). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в термостаті при  $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (30-60 год).

### **ТП 5.4. Вирощування інокуляту в колбах-качалках**

В асептичних умовах у колбу об'ємом 1 л з стерильною композицією А (від ДР 4.1.1) зливають простерилізовані композицію Б та В (від ДР 4.1.2. та ДР 4.1.3), перемішують і розливають по 150 мл у 7 качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Arthrobacter* sp. LY-1 (від ТП 5.3) вносять 5 мл фіз. Розчину та суспендують клітини з агару, піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію 7-10 мл і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивують у термостатичному шейкері (220 об/хв) при  $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (24-36 год).

### **ТП 5.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 15 л**

До композиції Б (від ДР 4.2.2), що знаходиться у простерилізованому інокуляторі (ІН-15) асептичною передачею через посівний бачок зливають простерилізовану колбу з композицією А (від ДР 4.2.1) На датчику перевіряють значення рН, та титрують розчином 6% NaOH (ДР 2.2), доводячи рН до значення 7.0. Через засівний бачок вносять 0.9 л посівного матеріалу (від ТП 5.4.), Культивують до споживання вуглецевого компоненту живлення 50%+ з частотою обертів перемішуючого пристрою 220 об/хв і постійною аерацією впродовж 22 год. Проби на чистоту культури, концентрацію крохмалю та азотного живлення відбирають протягом кожних 4 годин

### **ТП 5.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 150 літрів**

До композиції Б (від ДР 4.3.2), що знаходиться у простерилізованому інокуляторі (ІН-21) асептичною передачею через посівний бачок зливають простерилізовану колбу з композицією А (від ДР 4.3.1). На датчику перевіряють значення рН, та титрують розчином 6% NaOH (від ДР 2.2), доводячи рН до значення 7.0 По простерилізованим комунікаціям інокулят подають перистальтичним насосом (Н-16) (від ТП 5.5.) в інокулятор (ІН-20). Культивують до споживання ростового субстрату на рівні 50%+ з частотою обертів перемішуючого пристрою 220 об/хв і постійною аерацією впродовж 22 год. Проби на чистоту культури, концентрацію крохмалю та азотного живлення відбирають протягом кожних 4 годин

### **ТП 6. Виробничий біосинтез**

#### **ТП 6.1 Виробниче культивування *Arthrobacter* sp. LY-1**

У попередньо простерилізований з композицією Б (від ДР 4.4.2) ферментер об'ємом 1.25 м<sup>3</sup> (ФР-29) з реактора стерилізатора на 20 літрів (Р-23) зливають простерилізовану композицію А (від ДР 4.4.1.). Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6 %-м розчином NaOH (від ДР 2.2.) рН середовища за показником датчика рН до 7.0 , підтримуючи ці значення протягом всього періоду культивування. Через стерильні комунікації за допомогою труби перетискування перекачують інокулят (від ТП 5.6.) та культивують до споживання вуглецевого субстрату 95+%, відповідно, при  $t = 30 \pm 1$  °С з частотою обертів перемішуючого пристрою 220 об/хв і постійною аерацією протягом 48 годин. Проби на чистоту культури, концентрацію крохмалю та азотного живлення відбирають протягом кожних 4 годин

## РОЗДІЛ 8. ОТРИМАННЯ БІОПРЕПАРАТУ ДЛЯ БІОЛОГІЧНОГО ОЧИЩЕННЯ ҐРУНТУ

Багато фермерів використовують хімічні добрива для підвищення врожайності сільськогосподарських культур. Але інтенсивне використання хімічних добрив руйнує ґрунт і забруднює джерела води. Воно також вбиває дощових черв'яків і корисні мікроорганізми. Тому важливим є збагачення ґрунту шляхом внесення до нього біопрепаратів. Корисні мікроорганізми у складі таких біопрепаратів роблять ґрунт пухким, багатим, родючим і захищають рослини від хвороб. Біопрепарати збільшують кількість корисних мікроорганізмів у ґрунті та збільшують кількість дощових черв'яків [73].

Рідкі біопрепарати містять специфічні корисні мікроорганізми, здатні фіксувати, розчиняти або мобілізувати поживні речовини рослин завдяки своїй біологічній активності. Використання рідких біопрепаратів є однією з найперспективніших та найсучасніших технологій [74].

Атразин є розповсюдженим гербіцидним препаратом селективної дії. Як відомо, бактерії виду *Arthrobacter sp.* мають здатність розкладати атразин та використовувати його в своєму метаболізмі як джерело вуглецевого та азотного живлення. Попередній курсовий проєкт присвячений розробці технологічної схеми біосинтезу біопрепарату з використанням нового штаму атразин деградуючих бактерій *Athrobacter* LY-1. Даним біопрепаратом планується оброблювати ґрунти, призначені для посадки кукурудзи на території України.

Фактично біопрепарат являє собою культуральну рідину після вирощування штаму *Athrobacter* LY-1. В опрацьованій статті витрати культуральної рідини на обробку забрудненого ґрунту складають 5 мл культуральної рідини на 200 г забрудненого ґрунту [44].

					НУХТ БТЕК 04.03.25 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мартиненко Я.О.			РОЗДІЛ 8. Отримання біопрепарату для біологічного очищення ґрунту	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.					81	5
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Swarnali Duary зі співавторами у статті [74] засвідчили переваги використання рідких біопрепаратів на основі культуральної рідини вирошеного мікробного продуцента. Серед цих переваг виділяють здатність до зберігання протягом 12-24 місяців, завдяки синтезу досліджуваними штамми спеціальних речовин, що сприяють подовженню терміну придатності, стійкість до ультрафіолетового випромінювання, відсутність втрати властивостей при зберіганні за температури до 55° С, більший потенціал для боротьби з патогенною мікрофлорою, що знаходиться в ґрунті, зручність застосування, висока ферментативна активність, здатність до адаптації до місцевих умов навколишнього середовища. Для сучасного сільського господарства це дуже економічно вигідно, ефективно та просто у використанні [74].

Однак слід підібрати відповідні допоміжні речовини для стабілізації складу такого біопрепарату для оптимального зберігання та реалізації.

У біопрепаратах на основі носіїв (твердих) термін придатності мікроорганізмів становить лише 6 місяців. Вони не стійкі до ультрафіолетового випромінювання та температур понад 30°С. Концентрація мікроорганізмів у складі таких біопрепаратів становить лише 10<sup>6</sup> КУО/мл на момент виробництва. Ця кількість зменшується день у день. Ці недоліки можна виправити та усунути шляхом використання рідких біопрепаратів. Термін придатності таких рідких біопрепаратів вищий, ніж у твердих біопрепаратів, за рахунок відсутності значної втрати життєздатності [75].

Так, дослідження [75] було проведено з метою розробки та визначення терміну придатності рідких біопрепаратів ефективних штамів (представники родів *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* та *Bacillus megaterium*) з регіону Гонконг з використанням різних клітинних протекторів та поживних речовин у рідкому середовищі. Як клітинні протектори використовувалися гліцерин (0,5%), полівінілпіролідон (ПВП,

0,5%), поліетиленгліколь (ПЕГ, 0,5%), гуміарабік (ГА, 0,5%) та альгінат натрію (АН, 0,1%).

Стаття засвідчує, що рідкі біопрепарати, до складу яких додавали ПВП та гліцерин у кількості по 0,5% відповідно, зберегли максимальну кількість життєздатних клітин у всіх штаммах.

Патент [76] описує спосіб одержання рідкого біопрепарату. Спочатку проводили отримання інокуляту та виробниче культивування штаму. Культуральну рідину зберігали при перемішуванні 80-120 об/хв, підтримуючи температуру 30-32°C протягом 24-48 годин. Тим часом готували розчин з консервантами – 67,5 кг гліцерину, 31,5 кг карбоксиметилцелюлози (КМЦ), 110 г рожевого бенгальського (барвник), додавали 3200 кг води. Значення рН доводили до 6,8-7,2 за допомогою соляної кислоти та гідроксиду калію. Загальний обсяг розчину консервантів становив 3300 кг. На основі цього можна вирахувати, що частка гліцерину складає 2%, КМЦ – 0,95%, барвника – 0,003%.

Після цього стерилізували при 121°C протягом 30 хвилин під тиском 15 фунтів. Після стерилізації охолоджували шляхом подачі холодною води в сорочку реактора [76].

Потім додавали культуральну рідину у даний розчин, перемішували до повного розчинення при перемішуванні 60-80 об/хв, підтримуючи температуру 30-32°C протягом 1 тижня. Проводили розлив біопрепарату в асептичних умовах, щоб уникнути забруднення, в 1 літрові пляшки. Герметично закупорювали пляшки кришками та відправляли на реалізацію [76].

Таким чином, на основі розглянутої інформації, поданої в сучасній науковій літературі, можна розробити технологію отримання біопрепарату, що міститиме культуральну рідину *Athrobacter* LY-1.

Якщо кінцевий продукт це культуральна рідина, то розбавляти її водою, а також відділяти біомасу недоцільно, оскільки саме при

синтезованій концентрації клітин продуцента досягатиметься заявлений ефект біодеградації атразину та покращення ґрунту.

Тому будуть проведені наступні стадії:

- 1) Зважування допоміжних речовин з розрахунку на конкретну партію біопрепарату: гліцерин (2%), КМЦ (0,95%). Додавання барвника недоцільно та економічно не вигідно, тому не будемо додавати цей компонент до рецептури біопрепарату.
- 2) Подача культуральної рідини до реактора;
- 3) Поступове внесення допоміжних речовин до реактора при перемішуванні 60-80 об/хв, підтримуючи температуру 30-32°C;
- 4) Фасування біопрепарату у каністри об'ємом 1000 л (єврокуби) з харчового поліетилену високої щільності [77].

На каністри наносять технічне, ідентифікаційне та попереджувальне маркування відповідно до вимог техніки безпеки, транспортування та сільськогосподарського регулювання.

Загальна схема виробництва біопрепарату, що міститиме культуральну рідину *Athrobacter* sp. LY-1, зображена на рисунку 8.1.

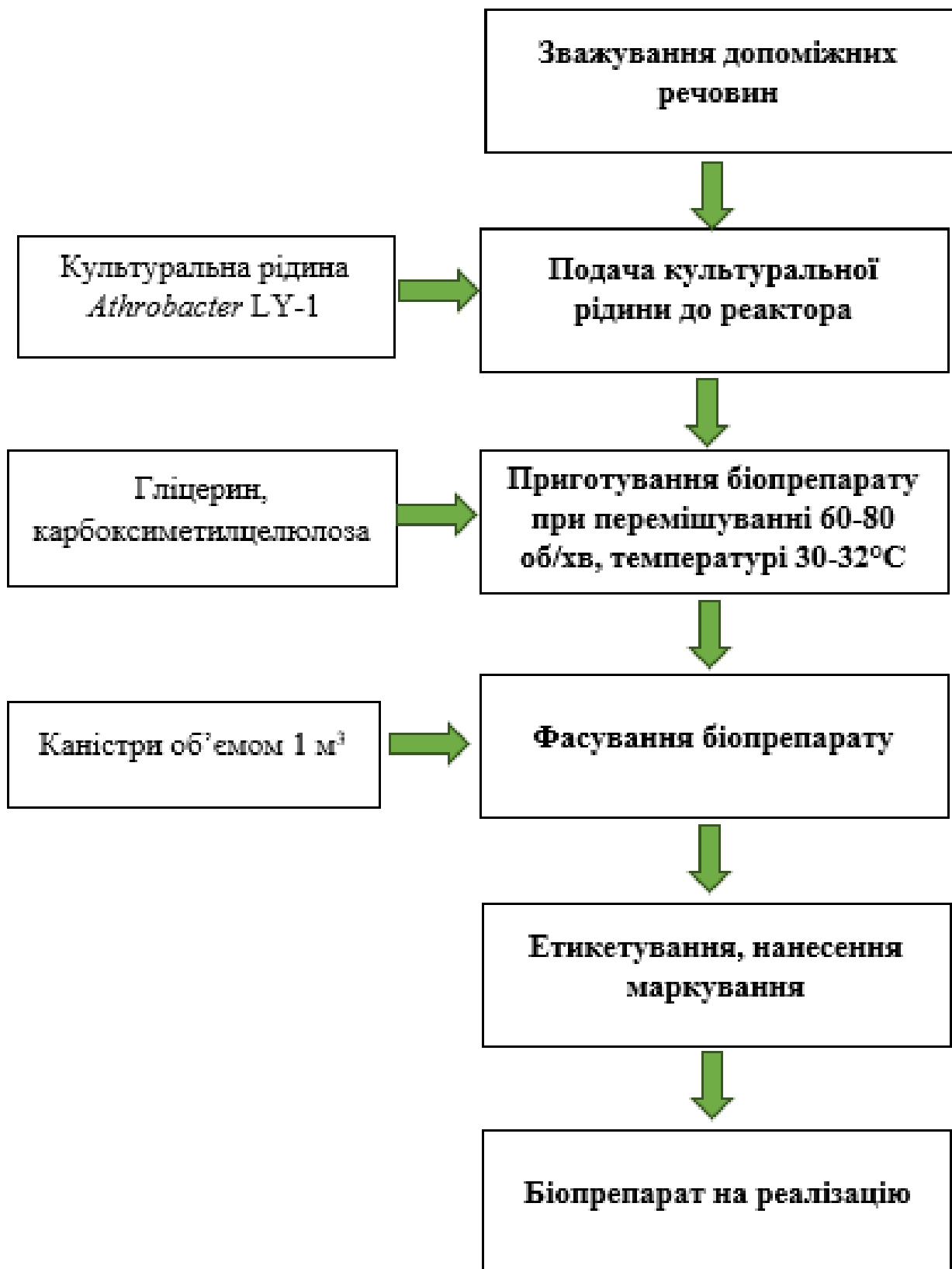


Рис. 8.1. Схема виробництва біопрепарату на основі культуральної рідини *Athrobacter sp.* LY-1.

## РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ СТАДІЙ КУЛЬТИВУВАННЯ

### ARTHROBACTER SP. LY-1

#### 9.1. Визначення концентрації цільового продукту (біопрепарат на основі *Arthrobacter sp. LY-1*) за допомогою спектрофотометрії

##### Принцип методу:

Метод полягає у вимірюванні оптичної густини при довжині хвилі 600 нм, щоб відстежувати розвиток бактеріальної культури в поживному середовищі. Зміна оптичної густини вказує на зміну концентрації клітин, які роблять суспензію оптично щільнішою. Завдяки побудові калібрувальної кривої можна відслідковувати зміну концентрації клітин протягом усього періоду культивування. Це дозволяє зрозуміти динаміку росту та розвитку бактеріальної культури і вчасно зупинити процес культивування. Аналіз бажано проводити кожні кілька годин, але не рідше одного разу на 12 годин. Головним недоліком методу є неможливість визначення колонієутворюючих одиниць (КУО), але його перевагами є швидкість і низька вартість аналізу [78, 79].

##### Необхідні матеріали:

- Культуральна рідина на певному етапі культивування
- Чисте, незасіяне поживне середовище
- 2 кювети висотою 1 см з пластику або скла
- Спектрофотометр, здатний працювати при довжині хвилі 600 нм
- Дистильована вода для очищення кювет

					НУХТ БТЕК 04.03.25 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Мартиненко Я.О.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.				86	15
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.					86		
Затверд.		Стабніков В.П.					

Умови проведення дослідження:

Відберіть 3 мл культуральної рідини з поживного середовища, де культивується *Arthrobacter* sp. LY-1, і 3 мл чистого поживного середовища, яке використовувалося для культивування. Налаштуйте спектрофотометр на довжину хвилі 600 нм. Заповніть одну кювету культуральною рідиною, а іншу – чистим поживним середовищем. Спочатку помістіть кювету з поживним середовищем у прилад і обнулите значення оптичної густини. Потім, не змінюючи налаштувань, замініть кювету на ту, що містить культуральну рідину, і запишіть показник. Після кількох вимірювань на різних етапах культивування побудуйте калібрувальний графік.

### **Спектрофотометр 722G [79]**

Для проведення цього аналізу можна використовувати будь-який спектрофотометр, але мною пропонується використовувати Спектрофотометр 722G який призначений для кількісного аналізу речовин шляхом вимірювання пропускання світла, що залежить від концентрації. Він оснащений однопроменевою системою з дифракційною решіткою на 1200 штрихів/мм, що забезпечує точність вимірювань. Відображення результатів здійснюється на LCD дисплеї з підсвічуванням.

---



**722**

Рис 9.1. Комерційне зображення спектрофотометра 722G [79].

## Характеристика спектрофотометра 722G

Характеристика	Значення
Виробник	Власне виробництво
Країна виробник	Китай
Оптична система	Однопроменева, 1200 штрихів/мм
Діапазон довжин хвиль, нм	325 - 1000
Похибка встановлення хвилі	±2 нм
Ширина спектрального інтервалу	5 нм
Діапазон вимірювань (А)	-0,301 - 4,000
Габаритні розміри, мм	550 x 430 x 200
Маса, кг	11 кг
Комплектація	Спектрофотометр, набір кювет, кабель живлення, інструкція
Гарантія	6 місяців

**9.2. Визначення титру цільового продукту *Arthrobacter* sp. LY-1**

Оскільки спектрофотометричний аналіз демонструє лише динаміку росту біомаси, і може використовуватися лише як експрес метод аналізу для побудови кривої росту, то також необхідний аналіз титру культури КУО/мл, оскільки саме певний титр життєздатних клітин є цільовим продуктом біосинтезу.

Для аналізу титру культури пропонується використовувати метод серійних розведень з подальшим висіюванням кінцевих розведень на чашку Петрі з поживним середовищем Лурія Бертані.

**Методика проведення аналізу серійних розведень для визначення титру бактерій**

**Матеріали:**

- Стерильний зразок бактерій
- Стерильні піпетки
- Стерильний фізіологічний розчин
- Живильні агарові середовища

- Шпателі для висіву

- Термостат

### **Методика:**

#### 1. Підготовка розведень:

- Використовуючи стерильну піпетку, додайте 1 мл зразка в 9 мл стерильного розчинника, утворюючи розведення 1:10.

- Перемішати круговими обертами.

- Повторюйте цей процес, створюючи серію розведень до 8 розведення

#### 2. Висів на живильне середовище:

- Візьміть 0,1 мл з 6,7 та 8 розведення та висійте на поверхню агару.

- Розподіліть зразок по поверхні агару стерильною петлею або шпателем.

#### 3. Інкубація:

- Інкубуйте чашки при відповідній температурі 30°C протягом 24-48 годин.

#### 4. Підрахунок колоній:

- Після інкубації підрахуйте кількість колоній на чашках з відповідними розведеннями.

#### 5. Розрахунок титру бактерій:

- Розрахуйте кількість КУО на мілілітр зразка, враховуючи розведення. Кількість колоній на певному розведенні відповідає титру [80].

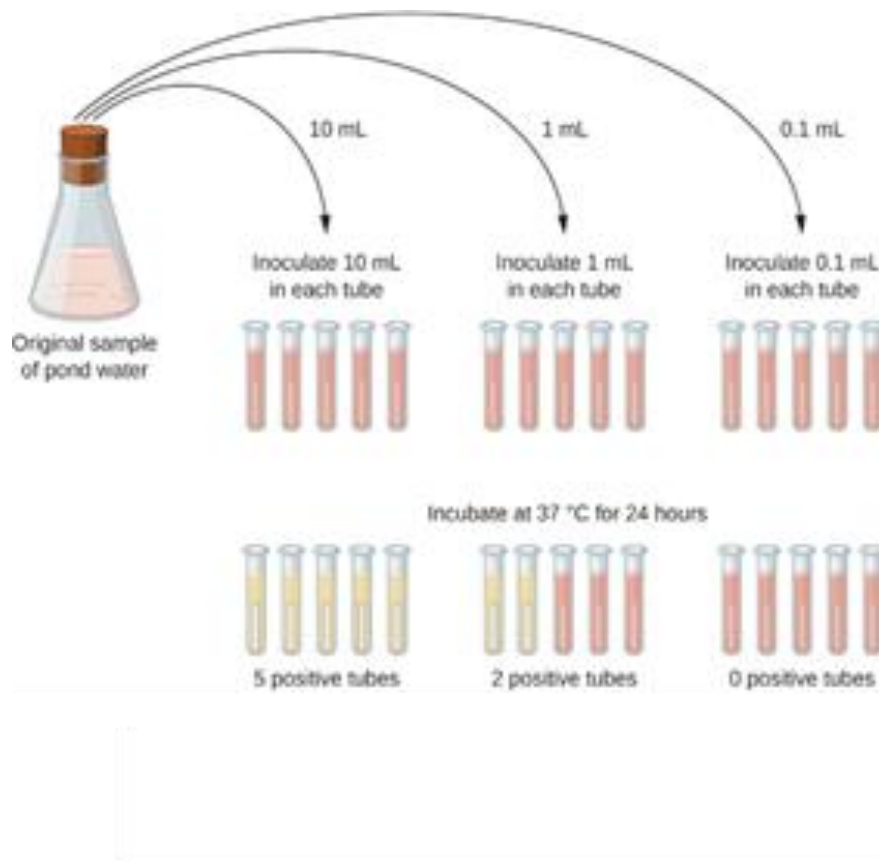


Рис 9.2. Схематичне зображення техніки серійних розведень [80].

### 9.3. Контроль азотного живлення

Оскільки згідно складу поживного середовища головним джерелом азоту є  $\text{KNO}_3$  тобто джерело нітратного азоту, то пропонується використовувати спектрофотометричну методику з використанням реактиву Грідса, за протоколом із зазначеного джерела [81, 82].

#### Реагенти:

- Ванадій (III) хлорид ( $\text{VCl}_3$ ).
- Сульфаніламід (SULF).
- N-(1-нафтил)-етилендіамін (NEDD).
- Солі нітратів та нітритів.
- 1 М  $\text{HCl}$ .
- $\text{H}_3\text{PO}_4$  (як альтернатива  $\text{HCl}$ ).

#### Інструменти:

- Мікротитровальна планшетка.
- Спектрофотометр з абсорбцією на 540 нм.

- Фільтраційна система для очищення води.

### **Методика:**

#### 1. Підготовка:

- Приготування насиченого розчину  $VCl_3$  в 1 М  $HCl$ .
- Розчинення NEDD (0.1% w/v) у воді, SULF (2% w/v) у 5%  $HCl$  або  $H_3PO_4$ .
- Фільтрація для видалення часток.
- Підготовка стандартних розчинів нітратів і нітритів.

#### 2. Проведення аналізу:

- Увімкнення мікротитровальної планшетки та завантаження зразків (100  $\mu$ л кожного зразка).
- Додавання 100  $\mu$ л розчину  $VCl_3$  до кожної пробірки.
- Швидке додавання 50  $\mu$ л реагента SULF і 50  $\mu$ л NEDD.
- Інкубація при  $37^\circ C$  на 30–45 хвилин.
- Вимірювання абсорбції при 540 нм.

#### *Розрахунок результату*

Побудова калібрувальної кривої в діапазонах концентрації  $KNO_3$  від 0 до 1 г з шагом 0.2 г та нанесення отриманого результату на калібрувальну криву.

## **9.4. Мікробіологічний контроль виробництва**

### **9.4.1. Контроль стерильності поживних середовищ**

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ проводиться для уникнення контамінації при підготовці посівного матеріалу та під час культивування.

Класичний метод контролю передбачає висів простерилізованого поживного середовища на чашки Петрі, заповнені різними селективними середовищами: одне середовище повинно бути селективним до грибів і дріжджів із слабо-кислою реакцією, а інше — селективним до бактерій з нейтральною реакцією.

Перед культивуванням *Arthrobacter* sp. LY-1 необхідно перевірити поживне середовище на відсутність сторонньої мікрофлори. Для цього використовують три селективні середовища: М'ясо-пептонний агар (для бактерій) та сусло-агар (для дріжджів і грибів), а також рідке тіогліколятне середовище для перевірки анаеробних бактерій, оскільки культивація буде проходити в анаеробних умовах.

#### **Методика контролю стерильності:**

1. Після стерилізації, коли температура поживного середовища знижується нижче 30°C, стерильно відберіть пробу об'ємом 20 мл.

2. В асептичних умовах висійте 1 мл поживного середовища на дві підготовлені чашки Петрі (МПА і сусло-агар) і в пробірку з тіогліколятним середовищем за допомогою стерильної піпетки.

3. Інкубуйте чашки Петрі з МПА і пробірку з тіогліколятним середовищем при температурі 37°C, а чашку Петрі з сусло-агаром при 27°C.

4. Інкубація триває 30 годин. Кожні 10 годин перевіряйте чашки та пробірку. Не повинно бути жодного росту колоній на чашках або помутніння в пробірці з тіогліколятним середовищем (порівняйте з новою стерильною пробіркою з ТС середовищем).

#### **9.4.2. Контроль чистоти культури**

Мікробіологічний контроль чистоти посівного матеріалу проводиться з метою перевірки чистоти посівного матеріалу, тобто наявності будь-яких інших мікроорганізмів окрім *Arthrobacter* sp. LY-1 в культуральній рідині. Контроль проводиться шляхом мікроскопіювання та висіву на чашки Петрі з метою дослідження морфології колоній.

Для висіву на чашки Петрі буде використано 2 поживні середовища, а саме агар Лурія Бертані, яке було використано для колекціонування культури, зокрема для ефективного та швидкого росту *Arthrobacter* sp. LY-1, та Сусло-агар для виявлення грибів та дріжджів.

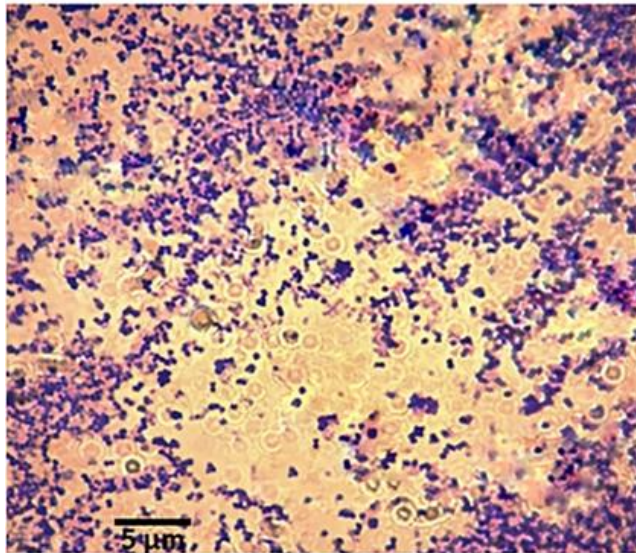


Рис 9.3. Морфологія клітин *Arthrobacter* sp. LY-1 у світловому мікроскопі.



Рис. 9.4. Морфологія колоній *Arthrobacter* sp. LY-1 на агарі Лурія Бертані.

**Характеристика колоній *Arthrobacter* sp. LY-1 на агарі Лурія Бертані [83]:**

**Форма колоній:** Колонії *Arthrobacter* зазвичай мають округлу форму. Вони можуть бути невеликими і мають різну текстуру, часто мають нерегулярний або хвилястий край.

**Колір:** Колонії можуть мати білий, жовтуватий або сірий колір. Деякі види можуть утворювати пігментовані колонії.

**Текстура:** Колонії *Arthrobacter* можуть бути гладкими або зернистими. Текстура може варіюватися від м'якої до твердої.

**Поверхня:** Поверхня колоній може бути рівною або злегка зморщеною. Деякі колонії можуть мати шорсткість.

**Ріст:** Колонії зазвичай мають ріст, що розширюється поступово, і можуть бути досить великими при тривалій інкубації.

#### **Морфологічні характеристики клітин *Arthrobacter*:**

*Форма клітин:* Клітини *Arthrobacter* зазвичай мають паличкоподібну або циліндричну форму. Вони можуть бути одно- або двосторонніми, часто мають характерний вигляд "коротких" або "квадратних" паличок.

*Розмір:* Клітини *Arthrobacter* мають розмір від 0,5 до 1,0 мкм в ширину і від 1,0 до 2,0 мкм в довжину. Розмір може варіюватися в залежності від умов культивування.

*Розташування клітин:* Клітини можуть бути розташовані поодинокі або утворювати пари, короткі ланцюжки або мікроколонії. Вони не утворюють довгі ланцюги або кластерні структури.

*Грам-позитивність:* *Arthrobacter* є грам-позитивними бактеріями. При грам-фарбуванні клітини залишаються фіолетовими (грам-позитивні).

*Спори:* *Arthrobacter* зазвичай не утворює спори.

### **9.5. Контроль вуглецевого живлення**

В зазначеному поживному середовищі основним та єдиним джерелом вуглецю виступає крохмаль, як відомо крохмаль є полісахаридом, який складається з мономерів глюкози, перед споживанням крохмалю клітиною, його необхідно гідролізувати гідролітичними екзоклітинними ферментами – амілазами. Тому для аналізу динаміки споживання вуглецевого живлення пропонується використовувати спектрофотометричний аналіз концентрації крохмалю, за допомогою йод-каліййодистого реактиву, що дає забарвлену в темнофіолетовий колір сполуку, яка поглинає світло на довжині хвилі 600 нм [84].

### 9.5.1. Методика визначення концентрації крохмалю

#### Процедура

#### Побудова калібрувального графіка

1. Приготуйте стандартні розчини крохмалю (наприклад, 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 мкг/мл).
2. До кожного стандарту (1,0 мл) додайте 5,0 мл **реактиву I<sub>2</sub>-KI**.
3. Акуратно перемішайте і залиште на 10 хв при кімнатній температурі.
4. Виміряйте **оптичну густину при 600 нм** (використовуйте дистильовану воду як контроль).
5. Побудуйте графік залежності оптичної густини від концентрації крохмалю.

#### В. Вимірювання зразків

1. Візьміть **1,0 мл культуальної рідини** у чисту пробірку.
2. Додайте **5,0 мл реактиву I<sub>2</sub>-KI**, перемішайте.
3. Інкубуйте 10 хв при кімнатній температурі.
4. Виміряйте оптичну густину при **590 нм**.

За допомогою калібрувального графіка визначте концентрацію крохмалю у зразку.

Таблиця 9.2

Карта точок контролю технологічного процесу біосинтезу добрив на основі біомаси *Arthrobacter* sp. LY-1

<b>Номер контрольної точки та назва стадії</b>	<b>Об'єкт контролю та показник, що визначається</b>	<b>Засоби та методи контролю</b>	<b>Періодичність перевірки та відбору проб</b>	<b>Нормативні значення показника</b>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
<i>Кт 1.1</i> <i>Перевірка повітрязбірника</i>	<b>Повітрязбірник</b> , Наявність бруду або засорів	Візуальний аналіз та миття у випадку незадовільного стану	1 раз на сезон виробництва	Повітрязбірник (ПЗ-1) Немає забруднень та зон непроходження повітря
<i>Кт 1.2</i> <i>Фільтр грубого очищення (ФГО-2)</i>	<b>Фільтр грубої очистки</b> Пропускна здатність, якість фільтрації	Візуальний аналіз, продування повітря та його аналіз на кількісний та якісний аналіз часточок, аналіз перепаду тиском	1 раз на сезон виробництва	Фільтр грубої очистки (ФГО-2), рівномірно пропускає повітря, $E=90\%$ для часток розміром понад 20 мкм
<i>Кт 1.3</i> <i>Компресор (К-3)</i>	<b>Повітря</b> Тиск, температура	Манометр термометр	1 раз на сезон виробництва	$P = 0,35 - 0,5$ МПа $t = 220-250^{\circ}\text{C}$
<i>Кт 1.4</i> <i>Темплообмінник охолоджувач (Т-4)</i>	<b>Повітря</b> Тиск, температура	Манометр термометр	1 раз на сезон виробництва	Швидкість охолодження та продуктивність згідно специфікацій
<i>Кт 1.5</i> <i>Ресивер (РС-5)</i>	<b>Повітря</b> Тиск	Манометр Мильний розчин	1 раз на сезон виробництва	$P = 1$ МПа, повна герметичність

Продовження таблиці 9.2

<i>Кт 1.6</i> <i>Теплообмінник</i> <i>нагрівач (Т-6)</i>	<b>Повітря</b> Тиск температура	Манометр термометр	1 раз на сезон виробництва	P = 1.6 МПа Швидкість нагрівання згідно паспорту апарата
<i>Кт 1.7</i> <i>Головна</i> <i>система</i> <i>фільтрування</i> <i>(Ф-7-8)</i>	<b>Повітря</b> Тиск Ефективність Візуальний аналіз	Манометр Аналіз на кількість часточок	1 раз на 3 цикли ферментації	E=99.95% часточок більше 0.2 мкм, перепад тиску згідно паспорту фільтрів
<i>Кт, Км 1.8</i> <i>Індивідуальні</i> <i>фільтри</i>	<b>Повітря</b> Тиск Ефективність Візуальний аналіз, мікробіологічни й контроль	Манометр Аналіз на кількість мікроорганізмів	1 раз на цикл ферментації	E=99.99% часточок та мікроорганізмів в більше 0.2 мкм, перепад тиску згідно паспорту фільтрів
<i>Кт, Км, Кх</i> <i>ДР. 2.1</i> <i>Приготування</i> <i>6%-розчину</i> <i>НСІ</i>	<b>6%-розчин</b> <b>НСІ</b> Тиск, температура, час, концентрація, відсутність мікробіоти	pH метр та літр дистильованої води для перевірки концентрації розчину НСІ мікробіологічни й контроль	Мікробіологічни й контроль проводиться перед початком змішування (перевірка стерильної води) та після приготування розчину. pH визначається після змішування	відсутність мікробіоти. Розчин НСІ дійсно 6%
<i>Кт, Км, Кх</i> <i>ДР. 2.2</i> <i>Приготування</i> <i>і</i> <i>стерилізація</i> <i>6%-розчину</i> <i>гідроксиду</i> <i>натрію</i>	<b>6%-розчин</b> <b>NaOH.</b> Тиск, температура, час, концентрація, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічни й контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
<i>Кт</i> <i>ДР 3</i> <i>Приготування</i> <i>розчину</i> <i>мікроелементів</i> <i>в</i>	<b>Розчин</b> <b>мікроелементів</b> Об'єм Світловий режим температура	Мірна колба 1 л Холодильник	Контроль об'єму визначається мірним посудом, має знаходитися	Протягом всього терміну зберігання знаходиться в темряві та в холодильнику за температури не вище 4°C

Продовження таблиці 9.2

<p><i>Кт, Км</i> 4.1.1, 4.2.1, 4.3.1 <i>Приготування</i> <i>та</i> <i>стерилізація</i> <i>Композиції А</i></p>	<p><b>Композиція А</b> Тиск, температура, час, мікробіологічний контроль</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>t = 70\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau</math> <math>= 20\text{ хв}</math> <math>P =</math> <math>0,05\text{ МПа}</math>, <math>t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 30\text{ хв}</math>, відсутність мікробіоти</p>
<p><i>Кт, Км</i> ДР. 4.1.2, 4.2.2, 4.3.2 <i>Приготування</i> <i>та</i> <i>стерилізація</i> <i>Композиції Б</i></p>	<p><b>Композиція Б</b> Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>P =</math> <math>0,15\text{ МПа}</math>, <math>t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 40\text{ хв}</math>, відсутність мікробіоти</p>
<p><i>Кт, Км</i> ДР. 4.1.3 <i>Приготування</i> <i>та</i> <i>стерилізація</i> <i>Композиції 3</i></p>	<p><b>Композиція В</b> Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>P =</math> <math>0,15\text{ МПа}</math>, <math>t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 40\text{ хв}</math>, відсутність мікробіоти</p>
<p><i>Кт, Км</i> ТП. 5.1 <i>Підтримання</i> <i>колекційної</i> <i>культури</i></p>	<p><b>Колекційна культура</b> <i>Arthrobacter LY-1</i> Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти.</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль Фарбування по граму</p>	<p>Мікробіологічний контроль проводять кожні 1.5-2 місяці</p>	<p><math>t = 2-4\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 1.5-2\text{ міс}</math>, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

Продовження таблиці 9.2

<p><i>Кт, Км</i> <i>ТП. 5.2</i> <i>Одержання</i> <i>робочої</i> <i>культури</i></p>	<p><b>Колекційна культура</b> <i>Arthrobacter LY-1</i> Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр, годинник мікробіологічний контроль</p>	<p>Мікробіологічний Контроль УМА агару проводять перед висівом</p>	<p>t = 30 °С, τ = 72 год, відсутність сторонньої мікробіоти.</p>
<p><i>Кт, Км</i> <i>ТП. 5.3</i> <i>Вирощування</i> <i>інокуляту на</i> <i>агаризованих</i> <i>поживних</i> <i>середовищах</i></p>	<p><b>Колекційна Культура:</b> <i>Arthrobacter LY-1</i> Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура постійна час час культивування залежить від появи колоній мікробіологічний Контроль проводиться перед засівом</p>	<p>t = 30 °С, τ = 48-72 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p><i>Кт, Км, Кх</i> <i>ТП. 5.4</i> <i>Вирощування</i> <i>культури в</i> <i>колбах на</i> <i>качалках</i></p>	<p><b>Посівний Матеріал:</b> Температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури Концентрація біомаси</p>	<p>Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, рН метр мікробіологічний ФЕК</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично рівень рН, оптична густина та мікроскопіювання кожні 12 годин</p>	<p>t = 30 °С, τ = 18 год, рН = 6,5 n = 220 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p><i>Кт, Км, Кх</i> <i>ТП. 5.5</i> <i>Вирощування</i> <i>Посівного</i> <i>матеріалу в</i> <i>інокуляторі</i> <i>об'ємом 15 л</i></p>	<p><b>Посівний Матеріал:</b> Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, Концентрація біомаси, рівень аерації</p>	<p>Термометр технічний, годинник, аналізатор швидкості мішалки, рН метр (датчики вбудовані в інокулятор) рН метр мікроскоп ФЕК, аерометр</p>	<p>Температура і швидкість обертання а також аерація контролюються і підтримуються автоматично весь час культивування, рівень рН мікроскопіювання. Аналіз концентрації вуглецевого та азотного живлення – кожні 12 годин</p>	<p>t = 30 °С, τ = 18 год, рН = 6,5 n = 220 об/хв,  відсутність сторонньої мікробіоти  Вуглецевий компоненти середовища поглинуті на 40-50+%</p>

Закінчення таблиці 9.2

<p><i>Кт, Км, Кх</i> <i>ТП. 5.6</i> <i>Вирощування</i> <i>Посівного</i> <i>матеріалу в</i> <i>інокуляторі</i> <i>об'ємом 150 л</i></p>	<p><b>Посівний</b> <b>Матеріал:</b> Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, Концентрація біомаси, рівень аерації</p>	<p>Термометр технічний, годинник, аналізатор швидкості мішалки, рН метр (датчики вбудовані в інокулятор) рН метр мікроскоп ФЕК, аерометр</p>	<p>Температура і швидкість обертання а також аерація контролюються і підтримуються і автоматично весь час культивування, рівень рН мікроскопіювання. Аналіз концентрації вуглецевого та азотного живлення – кожні 12 годин</p>	<p>t = 30 °С, τ = 18 год, рН = 6,5 n = 220 об/хв,  відсутність сторонньої мікробіоти  Вуглецевий компоненти середовища поглинуті на 40-50+%</p>
<p><i>Кт, Кх, Км</i> <i>ТП. 6.1</i> <i>Виробний</i> <i>біосинтез у</i> <i>ферментері</i> <i>об'ємом 1,25</i> <i>м<sup>3</sup></i></p>	<p><b>Культуральна</b> <b>Рідина:</b> Температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рН, рівень піноутворення, мікробіологічна чистота культури, Концентрація біомаси</p>	<p>Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення (вбудовані в ферментер) мікроскоп та ФЕК. аерометр</p>	<p>Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН, рівень піни контролюються і підтримуються і автоматично весь час культивування; Аналіз концентрації вуглецевого та азотного живлення мікроскопіювання – кожні 12 годин</p>	<p>t = 30 °С, τ = 24 год, n = 220 об/хв, рН = 6,5, відсутність сторонньої мікробіоти Вуглецевий компоненти середовища поглинуті на 90+%</p>

## ЛИТЕРАТУРА

1. Pathak, R.K. & Dikshit, A.. (2012). Atrazine and its use. *Int. J. Res. Chem. Environ.* 2. 1-6.
2. Liang, Yuan & Ding, Lina & Song, Qing & Zhao, Ben & Wang, Siyu & Liu, Sheng. (2022). Biodegradation of atrazine by three strains: identification, enzymes activities, and biodegradation mechanism. *Environmental Pollutants and Bioavailability*. 34. 549-563. 10.1080/26395940.2022.2151515.
3. Esquirol L., Peat S. An unexpected vestigial protein complex reveals the evolutionary origins of an s-triazine catabolic enzyme, *Journal of biochemistry*, V.293, P. 7880-7891, 2018 [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)36981-7/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)36981-7/fulltext)
4. Zhao J., Zhang X. Enhanced biodegradation of atrazine by *Arthrobacter* sp. DNS10 during co-culture with a phosphorus solubilizing bacteria: *Enterobacter* sp. P1 *Ecotoxicology and Environmental Safety* 172:159-166, 2018 [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://www.researchgate.net/publication/330883161\\_Enhanced\\_biodegradation\\_of\\_atrazine\\_by\\_Arthrobacter\\_sp\\_DNS10\\_during\\_co-culture\\_with\\_a\\_phosphorus\\_solubilizing\\_bacteria\\_Enterobacter\\_sp\\_P1](https://www.researchgate.net/publication/330883161_Enhanced_biodegradation_of_atrazine_by_Arthrobacter_sp_DNS10_during_co-culture_with_a_phosphorus_solubilizing_bacteria_Enterobacter_sp_P1)
5. Li M., Zhan F. Atrazine Degradation Pathway and Genes of *Arthrobacter* sp. FM326 *Pol. J. Environ. Stud.* Vol. 29, No. 5 (2020), 3683-3689 [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.pjoes.com/pdf-115326-51805?filename=Atrazine%20Degradation.pdf>
6. Sajjaphan K., Shapir N. *Arthrobacter* sp. TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli* *Appl Environ Microbiol.* 2004 Jul;70(7):4402-7. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15240330/>
7. Sajjaphan K., Shapir N *Arthrobacter* sp. TC1 Atrazine Catabolism Genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* Are Linked on a 160-Kilobase Region and Are Functional in *Escherichia coli* *Appl Environ Microbiol.* 2004 Jul; 70(7): 4402–

4407. [Электронный ресурс] Режим доступа:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC444770/>

8. Solomon, R. D., Kumar, A., & Satheeja Santhi, V. (2013). Atrazine biodegradation efficiency, metabolite detection, and trzD gene expression by enrichment bacterial cultures from agricultural soil. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 14(12), 1162–1172.  
<https://doi.org/10.1631/jzus.B1300001> [Электронный ресурс] Режим доступа:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3863374/>

9. Lunin V., Li Y., Cygler M. High-resolution crystal structure of *Arthrobacter* sp. chondroitin AC lyase: an enzyme-substrate complex defines the catalytic mechanism *J Mol Biol.* 2004 Mar 19;337(2):367-86. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15003453/>

10. Yu S., Zhang T. Identification of a Novel Di-D-Fructofuranose 1,2':2,3' Dianhydride (DFA III) Hydrolysis Enzyme from *Arthrobacter* sp. SK8.001 [Электронный ресурс] Режим доступа:  
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0142640>

11. Hiyama K., Okada S., Multiple Forms of Chondroitinase AC from *Arthrobacter* sp., *Agricultural and Biological Chemistry*, Vol. 41, 1977 [Электронный ресурс] Режим доступа:  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00021369.1977.10862655>

12. Yanze-Kontchou C, Gschwind N. 1994. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. *Appl Environ Microbiol* 60:<https://doi.org/10.1128/aem.60.12.4297-4302.1994>

13. Nick, G., De Lajudie, P., Eardly, B. D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., ... & Lindström, K. (1999). *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(4), 1359-1368.

14. Struthers, J. K., Jayachandran, K., & Moorman, T. (1998). Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this

strain in bioremediation of contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3368-3375.

15. Wang J, Zhu L, Wang Q, Wang J, Xie H (2014) Isolation and Characterization of Atrazine Mineralizing *Bacillus subtilis* Strain HB-6. *PLoS ONE* 9(9): e107270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107270>

16. Zhao Y, Li X, Li Y, Bao H, Nan J and Xu G (2023) Rapid biodegradation of atrazine by a novel *Paenarthrobacter ureafaciens* ZY and its effects on soil native microbial community dynamic. *Front. Microbiol.* 13:1103168. doi: 10.3389/fmicb.2022.1103168

17. Wang, Q., & Xie, S. (2012). Isolation and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 71, 61–66. doi:10.1016/j.ibiod.2012.04.06

18. Roy P., Kumar A. Beneficial Microbes in Agro-Ecology, 2020, p.3-11 [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128234143000010>

19. Genome atlas - *Arthrobacter* sp. TC1 – classification. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://bacmap.wishartlab.com/organisms/434>

20. Strong L., Rosendahl C., Johnson G. *Arthrobacter* sp. TC1 Metabolizes Diverse s-Triazine Ring Compounds, *Appl Environ Microbiol.* 2002 Dec; 68(12): 5973–5980 [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC134431/#:~:text=In%20this%20report%2C%20we%20describe,bacterium%2C%20Arthrobacter%20sp.%20strain%20TC1.>

21. Bioresource Collection and Research Center (BCRC) - *Paraenrthrobacter* sp. [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://mcoddb.bcrc.firdi.org.tw/detail.jsp?bcrc\\_id=12110](https://mcoddb.bcrc.firdi.org.tw/detail.jsp?bcrc_id=12110)

22. Busse H.J. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter* sensu lato, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov.,

Paenarthrobacter gen. nov. and Pseudarthrobacter gen. nov., and emended description of Arthrobacter roseus. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66:9-37.

23. Soitan K., Lawbah K., Mawpun K. Cultivable microbial diversity in speleothems using MALDI-TOF spectrometry and DNA sequencing [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-022-02916-8>

24. Gobbetti M., Smacchi E. Encyclopedia of Food Microbiology, 1999, p. 54-61 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B0122270703000702>

25. Проф., д-р Петро Когут. Вирощування Кукурудзи: Умови Посіву та Методи Догляду. *EOS Data Analytics*. URL: <https://eos.com/uk/blog/vyroshchuvannia-kukurudzy/> (дата звернення: 23.10.2024).

26. LNZweb, Гербіцид Syngenta Примекстра® Голд <https://lnzweb.com/product-primekstra-gold>

27. Державна служба статистики України. *Держстат*. URL: <https://www.ukrstat.gov.ua/> (дата звернення: 15.10.2024).

28. Біодобрива – це новий рівень сільськогосподарського виробництва | Журнал ECOBUSINESS. *Журнал ECOBUSINESS. Екологія підприємства* | [ecolog-ua.com](http://ecolog-ua.com). URL: <https://ecolog-ua.com/articles/biodobryva-ce-novyu-riven-silskogospodarskogo-vyrobnytva> (дата звернення: 23.10.2024).

29. Hydroxyatrazine hydrolase (plasmid) [Paenarthrobacter sp.] - Protein - NCBI. National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAS20043.1> (date of access: 08.06.2024).

30. putative hydroxydechloroatrazine ethylaminohydrolase [Paenarthrobacter - Protein - NCBI. National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/119949260> (date of access: 08.06.2024).

31. Starch and sucrose metabolism - *Paenarthrobacter* sp. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kegg.jp/entry/aau00500>
32. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Paenarthrobacter* sp. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kegg.jp/entry/aau00010>
33. Citrate cycle (TCA cycle) - *Paenarthrobacter* sp. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kegg.jp/entry/aau00020>
34. Histidine metabolism - *Paenarthrobacter* sp. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?aau00340](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?aau00340)
35. Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis - *Paenarthrobacter* sp. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?aau00400](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?aau00400)
36. Glycine, serine and threonine metabolism - *Paenarthrobacter* sp. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?aau00260](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?aau00260)
37. Cysteine and methionine metabolism - *Paenarthrobacter* sp. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?aau00270](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?aau00270)
38. Alanine, aspartate and glutamate metabolism - *Paenarthrobacter* sp. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?aau00250](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?aau00250)
39. Arginine and proline metabolism - *Paenarthrobacter* sp. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?aau00330](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?aau00330)
40. Arginine biosynthesis - *Paenarthrobacter* sp. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kegg.jp/entry/aau00220>
41. Lysine biosynthesis - *Paenarthrobacter* sp. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kegg.jp/entry/aau00300>
42. Li, Y., Liang, D., Sha, J., Zhang, J., Gao, J., Li, H., Liu, R. (2019). Isolating and Identifying the Atrazine-Degrading Strain *Arthrobacter* sp. LY-1 and Applying it for the Bioremediation of Atrazine-Contaminated Soil. *Polish*

*Journal of Environmental Studies*, 28(3), 1267-1275.  
<https://doi.org/10.15244/pjoes/86219>

43. China Founded in 1993 Bioreactor Manufacturer, Bioreactor, Fermenter Supplier - Shanghai Baoxing Bio-engineering Equipment Co., Ltd. China Founded in 1993 Bioreactor Manufacturer, Bioreactor, Fermenter Supplier - Shanghai Baoxing Bio-engineering Equipment Co., Ltd. URL: <https://shbxbio.en.made-in-china.com/> (date of access: 22.06.2024).

44. Kundu, K., Marozava, S., Ehrl, B., Merl-Pham, J., Griebler, C., & Elsner, M. (2019). Defining lower limits of biodegradation: atrazine degradation regulated by mass transfer and maintenance demand in *Arthrobacter sp.* TC1. *The ISME journal*, 13(9), 2236-2251.

45. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79 с.

46. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс: Навч. посібник. – К.: НУХТ, 2022. – 373 с.

47. І Н С Т Р У К Ц І Я щодо застосування засобу дезінфекційного «Саніліт» з метою дезінфекції та передстерилізаційного очищення [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/images/documents/instrukciya-sanilit.pdf>

48. НС-DPE ДЕЗІНФІКУЮЧИЙ ЗАСІБ НА ОСНОВІ НАДОЦТОВОЇ КИСЛОТИ [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://klineko.com.ua/wp-content/uploads/2024/01/h-c-dpe.pdf?srsId=AfmBOooI0iwrJpIyvtvIjsOhRZ4YNi8Nj6\\_VA71DX7INGSFLFr iaotHQQ](https://klineko.com.ua/wp-content/uploads/2024/01/h-c-dpe.pdf?srsId=AfmBOooI0iwrJpIyvtvIjsOhRZ4YNi8Nj6_VA71DX7INGSFLFr iaotHQQ)

49. ІНСТРУКЦІЯ ЩОДО ЗАСТОСУВАННЯ ЗАСОБУ «ЕКОНОРМДЕЗ ПРЕМІУМ» З МЕТОЮ ДЕЗІНФЕКЦІЇ, ПЕРЕДСТЕРИЛІЗАЦІЙНОГО ОЧИЩЕННЯ ТА СТЕРИЛІЗАЦІЇ [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://storage.ua.prom.st/2659223\\_nstruktsiya\\_ekonorm\\_dez\\_premium\\_2023.pdf](https://storage.ua.prom.st/2659223_nstruktsiya_ekonorm_dez_premium_2023.pdf)

50. ЛУЖНИЙ ПІННИЙ МІЮЧИЙ ЗАСІБ, КОНЦЕНТРАТ SUPRA 12КГ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://primaterra.ua/ua/p1999522489-schelochnoe-pennoe-moyuschee.html?srsltid=AfmBOoogXNscMJxi-b36SVhF6115Mj5RTmwFtd7BPFxQj004zA3fedP3>

51. OXIN LD 103, засіб мийний лужний з дезінфікуючою дією для харчової промисловості, кан 23 кг [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://absolut.lviv.ua/OXINLD103zasibmujnujluzhnujzdezinfikuyuchoyudiyeyudlyaxarchovoipromuslovostikan25kg%D0%9E%D0%94-0044-ua>

52. Дезінфікуючий лосьйон для рук на спиртовій основі Тана APESIN HD, 1 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://bs24.com.ua/catalog/zasoby\\_dlya\\_dezinfektsiyi/ruk\\_ta\\_tila/dezinfikuyuchiy-losyon-dlya-ruk-na-spirtoviy-osnovi-tana-apesin-hd-1-l/](https://bs24.com.ua/catalog/zasoby_dlya_dezinfektsiyi/ruk_ta_tila/dezinfikuyuchiy-losyon-dlya-ruk-na-spirtoviy-osnovi-tana-apesin-hd-1-l/)

53. ГЕЛЬ-АНТИСЕПТИК ДЛЯ РУК STERILE LIGHT (0.2 КГ) [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://primaterra.ua/ua/p1181941512-gel-antiseptik-dlya.html?srsltid=AfmBOoobvHe1b1Vzw7Nv-H9ZKkdUY8ViS8EAR\\_c2zsbwUVQHzo\\_kcdnW](https://primaterra.ua/ua/p1181941512-gel-antiseptik-dlya.html?srsltid=AfmBOoobvHe1b1Vzw7Nv-H9ZKkdUY8ViS8EAR_c2zsbwUVQHzo_kcdnW)

54. Управління якістю в фармації : матеріали XIV наук.-практ. конф., м. Харків, 22 трав. 2020 р. – Х. : НФаУ, 2020. – 251 с.

55. Повітрозабірник стіновий NAVYFLEX VLB100. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://aes.in.ua/uk/povitrozabirnik-stinovij-navyflex-vlb100/>.

56. Кишеньковий фільтр для вентиляції F5. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tehno-parts.com.ua/karmannyi-filtr-dlia-ventiliatsii-f5>.

57. Гвинтовий компресор SCC ZA 40. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sps.com.ua/products/scc-za-40-series-screw-compressor-30-kw>.

58. Рефрижераторний осушувач Profinstrument 10AC. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://profinstrument-ua.com.ua/product/refrezhyratornyj-osushuvach-profinstrument-10ac-15-m%C2%B3-hv/>.

59. Ресивер повітряний Lider 10 бар 2700 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tusk.ua/product/resiver-vozdushnyj-lider-10-bar-2700-l-rv2700120001-dlya-kompressora>

60. Водяний каналний нагрівач ВЕНТС НКВ 1000x500-3. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vencon.ua/ua/products/vents-nkv-1000x500-3> (дата звернення: 06.01.2025).

61. Фільтр тонкого очищення повітря ФТОВ Нера Нера. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tehnofilter.ub.ua/goods/view/6364274/all/filtr-tonkogo-ochishchennya-povitrya-ftov-nera-hera/>.

62. Реактор, Україна, КФТ-2. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.kft2.com.ua/v15.html>

63. Дозуючий лічильник води: [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://agro-teh.com.ua/p370228267-dozator-vody-zhidkostej.html?source=merchant\\_center&gad\\_source=1&gclid=Cj0KCQiA4-y8BhC3ARIsAHmjC\\_EFeXzAphAwDI-NuNKoL9VBx6kkYOSH-uVhU5Oo0Yi1vNloEhoGB7caAuOPEALw\\_wcB](https://agro-teh.com.ua/p370228267-dozator-vody-zhidkostej.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=Cj0KCQiA4-y8BhC3ARIsAHmjC_EFeXzAphAwDI-NuNKoL9VBx6kkYOSH-uVhU5Oo0Yi1vNloEhoGB7caAuOPEALw_wcB)

64. Promvit. Лабораторний реактор робочим об'ємом 20 л (модель РС-20.00.000 ПС). [онлайн доступ 9 січня 2025 року]. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/laboratornij-reaktor-robochim-ob%E2%80%B2уємом-20-l-rc-20-00-000-ps/>

65. Labfirst Scientific. BR500-C1-15L Cell Culture Fermentation System: Technical Specifications [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://infors-ht.com/getmedia/a5eae247-ed48-4982-ae53-fbab4cc830e0/Product-Data-Sheet-Techfors-S-3-en-GB-1>

66. Aurora Pro Scientific. OEM Mini DC Brushless Water Pump 5017 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.auroraprosci.com/Centrifugal-Pump/OEM-Mini-DC-Brushless-Water-Pump-5017>.

67. Реактор, 63 л. Євромаш: [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://euromash.kiev.ua/ua/aparati\\_emal\\_mehanicheskim\\_perem\\_ustroystvom\\_ua.php](https://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php)

68. Aurora Pro Scientific. OEM Mini DC Brushless Water Pump 5017 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.auroraprosci.com/Centrifugal-Pump/OEM-Mini-DC-Brushless-Water-Pump-5017>

69. INFORS HT. Techfors – індивідуалізований пілотний біореактор з нержавіючої сталі [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.phxequip.com/equipment/6684/150-liters-b-braun-fermenter-bioreactor>

70. Євромаш. Апарати сталеві емальовані з механічним змішувачем пристроєм [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://euromash.kiev.ua/ua/aparati\\_emal\\_mehanicheskim\\_perem\\_ustroystvom\\_ua.php](https://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php).euromash.kiev.ua

71. PumpCentre. Хімічний відцентровий насос з магнітною муфтою CM MAG-P4 PP: 34 м<sup>3</sup>/год (566 л/хв), напір 7 м [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pumpcentre.com.ua/ua/himicheskij-tsentrobegnyj-nasos-s-magnitnoj-muftoj-cm-mag-p4-pp-34-m3ch-566-lmin-napor-7-m/>.

72. Uma Pharmatech Machinery. Виробник пілотних ферментерів [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.bioprocessonline.com/doc/used-liter-abec-fermenter-bioreactor-0001>

73. Organic biofertilizer in liquid and solid form [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://assets.accessagriculture.org/s3fs-public/Organic\\_biofertiliser\\_in\\_liquid\\_and\\_solid\\_form\\_1.pdf](https://assets.accessagriculture.org/s3fs-public/Organic_biofertiliser_in_liquid_and_solid_form_1.pdf)

74. Duary, Swarnali & Mondal, Krishnendu & Sahoo, Monalisa. (2021). Liquid Biofertilizer-an Innovative Tool for Sustainable Agriculture. *Indian Journal of Natural Sciences*, 12. 37458-37463.

75. G P, Santhosh. (2015). Formulation and shelf life of liquid biofertilizer inoculants using cell protectants. *International Journal of Researches in Biosciences, Agriculture and Technology*. 2. 243-247.

76. IN2482/CHE/2015 - POTENT LIQUID BIO-FERTILIZER FORMULATION [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf;jsessionid=E7830FA5353FB47A02F765A0FFE773AD.wapp2nC?docId=IN211780320&\\_cid=P22-LSDXGU-59316-2](https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf;jsessionid=E7830FA5353FB47A02F765A0FFE773AD.wapp2nC?docId=IN211780320&_cid=P22-LSDXGU-59316-2)

77. Єврокуб 1000 л (Німеччина) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.skladsystems.com/uk/product/%d1%94vrokub-1000-l-bv-kopirovat/>

78. Trumbo, T. A., Schultz, E., Borland, M. G., & Pugh, M. E. (2013). Applied spectrophotometry: analysis of a biochemical mixture. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 41(4), 242-250.

79. Спектрофотометр 722G (аналог КФК-3-01) - купити за найкращою ціною в Києві від компанії "Термолаб" - 351867704. "Термолаб". [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://thermolab.net.ua/ua/p351867704-spektrofotometr-722g-analog.html?source=merchant\\_center&gad\\_source=1&gclid=CjwKC-AjwoJa2BhBPEiwA0l0ImP3RJVUfQot-IUmTUEQxMhXyYwK79pSnQXe0O\\_imFpO-4kOCLtoCMxoCAP0QAvD\\_VwE](https://thermolab.net.ua/ua/p351867704-spektrofotometr-722g-analog.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=CjwKC-AjwoJa2BhBPEiwA0l0ImP3RJVUfQot-IUmTUEQxMhXyYwK79pSnQXe0O_imFpO-4kOCLtoCMxoCAP0QAvD_VwE) (дата звернення: 22.07.2024).

80. Libretexts. 9.1: How Microbes Grow. Biology LibreTexts. URL: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology\\_\(OpenStax\)/](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(OpenStax)/)

09:\_Microbial\_Growth/9.01:\_How\_Microbes\_Grow (date of access: 22.07.2024).

81. Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide*, 5(1), 62-71.

82. Ridnour, L. A., Sim, J. E., Hayward, M. A., Wink, D. A., Martin, S. M., Buettner, G. R., & Spitz, D. R. (2000). A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media. *Analytical biochemistry*, 281(2), 223-229.

83. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. *Arthrobacter*. Wiley Online Library. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118960608>.

84. Wang, X., Conway, P. L., Brown, I. L., & Evans, A. J. (1999). In vitro utilization of amylopectin and high-amylose maize (amylomaize) starch granules by human colonic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 65(11), 4848-4854.

Original Research

## Isolating and Identifying the Atrazine-Degrading Strain *Arthrobacter* sp. LY-1 and Applying it for the Bioremediation of Atrazine-Contaminated Soil

Yangyang Li, Dong Liang, Junxue Sha, Jinbo Zhang, Jiguo Gao,  
Haitao Li, Rongmei Liu\*

College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin, China

Received: 15 October 2017

Accepted: 4 March 2018

### Abstract

Atrazine is a widely used herbicide, and because of its potential to seriously pollute soil and water resources, has attracted widespread attention. In this study, the bacterial strain LY-1 was isolated and identified as the species *Arthrobacter*. At present, there are many different atrazine-degrading bacteria that have been screened out, including *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., and *Shewanella* sp. However, previous reports only studied their degradation effects and soil remediation capabilities under optimum conditions and there were few studies performed which took into account a wider array of environmental circumstances. This study investigated the degradation effects of LY-1, as well as its capacity for soil remediation, under various conditions. The strain had broad optimum ranges of temperature and pH and the additional carbon and nitrogen sources did not decrease the atrazine degradation rate. In addition, the soil remediation tests indicated that the strain LY-1 might be a good candidate for bioremediation of atrazine-polluted soil.

**Keywords:** atrazine, *Arthrobacter* sp., atrazine-degrading genes, biodegradation, bioremediation

### Introduction

The s-triazine chemical herbicide atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1, 3, 5-triazine) is widely used to control annual grass and broadleaf weeds in the agriculture of sugarcane (*Saccharum officinarum*), sorghum (*Sorghum* spp.), maize (*Zea mays*), and other crops [1]. Because of its long half-life and high mobility in soil, atrazine and its derivatives have been detected in soils, and surface and groundwater [2]. Moreover, it

also interferes with the endocrine systems of humans and animals and its use affects ecosystems and human health [3]. In recent years, bioremediation methods have become an ideal solution to the problem of atrazine contamination because of their low cost, effectiveness, and lack of secondary pollution [4].

Currently, a number of bacteria with different atrazine degradation efficiencies and growth characteristics have been isolated. These strains include *Shewanella* sp. YJY4, *Arthrobacter* sp. TC1, *Pseudomonas* sp. ADP, *Citricoccus* sp. TT3, *Rhodococcus* sp. BCH2, and *Bacillus subtilis* HB-6 [5-9]. Of all presently known strains, the degradation

\*e-mail: liurongmei@neau.edu.cn

pathways of *Pseudomonas* sp. ADP and *Arthrobacter* sp. TC1 are studied most clearly. Strain ADP contains the degradation genes *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE*, and *atzF*, which can completely degrade atrazine [10]. Strain TC1 contains the degradation genes *trzN*, *atzB*, and *atzC*, which can transform atrazine into non-toxic cyanuric acid. The atrazine-degrading genes *trzN*, *atzA*, *trzD*, and *atzD* have the same function respectively [11].

In this study, a high-efficiency atrazine degrader, bacterial strain LY-1, was isolated from a cornfield where atrazine had been used for a long time. The identification of the strain, its degradation genes, the influence of environmental factors, and soil remediation ability were studied. Environmental factors have a significant effect on atrazine degradation [12]. These factors include atrazine concentration, temperature, pH, carbon, and nitrogen sources. The objective of this study was to provide a highly efficient strain resource for the bioremediation of atrazine-contaminated soil.

## Materials and Methods

### Soil Samples and Reagents

Experimental soil was sampled from the surface layer of the cornfield where atrazine was used for a long time (0–10 cm). The area is located northwest of Heilongjiang Province, China. Soil samples were treated in a 2.0 mm sieve and stored at 4°C.

Atrazine of 99% purity was used to characterize the atrazine-degrading bacteria, which were purchased from Shanghai KALANG Technology Ltd. The 99% pure cyanuric acid was purchased from WEIFANG KAIRUI Chemical Co., Ltd. All other chemicals in the experiment were analytical or HPLC-grade reagents.

The liquid enrichment medium consisted of mineral salts medium (MSM), 3 g·l<sup>-1</sup> glucose, and 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine as the carbon and nitrogen sources, respectively. The MSM contained 0.5 g·l<sup>-1</sup> of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0 g·l<sup>-1</sup> of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g·l<sup>-1</sup> of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g·l<sup>-1</sup> of NaCl, and 1 ml·l<sup>-1</sup> of trace element concentrate solution. Trace element concentrate solution had the following composition: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g·l<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 g·l<sup>-1</sup>; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.4 g·l<sup>-1</sup>; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1 g·l<sup>-1</sup>; EDTA, 2.5 g·l<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.25 g·l<sup>-1</sup>, and Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 0.2 g·l<sup>-1</sup>. The solid medium was added to 13 g·l<sup>-1</sup> of agar. All of the above cultures were regulated to pH 7.0 and sterilized at 121°C for 30 min.

### Enrichment and Isolation

The five-gram soil specimens were transferred to 250 ml flasks containing 100 ml of MSM, to which 3 g·l<sup>-1</sup> glucose and 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine were added. These specimens were cultured on a 160 r·min<sup>-1</sup> shaker for 7 days and the temperature was kept at 30°C. And then enrichment culture was inoculated into the new medium according to the inoculation amount of 5%.

The concentration of atrazine in the new medium was 200 mg·l<sup>-1</sup> and this process was repeated until the concentration of atrazine reached 500 mg·l<sup>-1</sup>. Eventually, the medium was diluted and placed onto the agar plates that contained 100 mg·l<sup>-1</sup> of atrazine. LY-1 was used for further studies because it demonstrated a high capacity for degrading atrazine.

### Identifying Atrazine-Degrading Strain LY-1

The identification of strain LY-1 was accomplished by observing the results of biochemical reactions and 16S rDNA sequencing. The total DNA of the strain was used as a template for amplification. 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3') were used as forward and reverse primers, respectively [13]. The PCR conditions were as follows: 94°C for 5 min followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 54°C for 1 min, and 72°C for 2 min, with a final extension of 10 min at 72°C. The products of PCR were divided on a 1.2% agarose gel electrophoresis. The resulting DNA fragments were purified through AxyPrep DNA gel extraction kit (Axygen), and then cloned into the pMD19-T vector (TaKaRa, China). The vector was transformed into *Escherichia coli* strain DH5α. Genetic sequencing was completed by Jilin Comate Bioscience Co., Ltd., and the results were compared using the Blast program in the NCBI GenBank nucleotide database. MEGA version 6.0 was used to construct the phylogenetic tree.

### PCR Detection of Atrazine-Degrading Genes

Currently known atrazine-degrading genes included *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE*, *atzF*, *trzD*, and *trzN* [14]. The size, sequences, and anneal temperature of these primers were shown in Table 1. The total chromosomal DNA of strain LY-1 was used as a template to amplify these genes. The conditions of PCR were as follows: at 94°C preheated 5 min, 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealed at 58, 64, 54, 60, 52, 55, 56, and 53°C for 1 min to *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE*, *atzF* genes and *trzN*, *trzD* genes, respectively, extension at 72°C for 90 s, and final extension at 72°C for 10 min. The research team performed sequencing and sequence analysis according to the above method.

### Growth and Biodegradation Capacity of Strain LY-1 and Influential Factors

In order to determine the growth curve of the strain, either atrazine or cyanuric acid (100 mg·l<sup>-1</sup>) was added to the 100 ml MSM medium as the nitrogen source, and glucose (3 g·l<sup>-1</sup>) was added as the carbon source. The strain LY-1 used for inoculation was incubated at 30°C for 12 h and centrifuged at 7000 r·min<sup>-1</sup>, and it was suspended with sterile water to 0.1 at 600 nm (OD<sub>600</sub>). One milliliter of treated bacteria was inoculated into the medium and these treatments were incubated in

Table 1. PCR primers, expected product sizes, and annealing temperatures in the amplification of atrazine-degrading genes.

Gene	Primer	Gene size (kb)	Sequence (5'→3')	Annealing (°C)
<i>atzA</i>	<i>atzA-1</i>	530	CCATGTGAACCAGATCCT	58
	<i>atzA-2</i>		TGAAGCGTCCACATTACC	
<i>atzB</i>	<i>atzB-1</i>	510	TCACCGGGGATGTCGCGGGC	64
	<i>atzB-2</i>		CTCTCCCGCATGGCATCGGG	
<i>atzC</i>	<i>atzC-1</i>	610	GCTCACATGCAGGTACTCCA	54
	<i>atzC-2</i>		GTACCATATCACCGTTTGCCA	
<i>atzD</i>	<i>atzD-1</i>	1050	GGAGACATCATATGTATCACATCGACGTTTTTC	60
	<i>atzD-2</i>		CCAATAAGCTTAGCGCGGGCAATGACTGCA	
<i>atzE</i>	<i>atzE-1</i>	990	TACGCGGTAAGAATCTGTT	52
	<i>atzE-2</i>		GGAGACCGGCTGAGTGAGA	
<i>atzF</i>	<i>atzF-1</i>	910	CGATCGGAAAAACGAACCTC	55
	<i>atzF-2</i>		CGATCGCCCCATCTTCAAC	
<i>trzD</i>	<i>trzD-1</i>	760	CCTCGCGTTCAAGGTCTACT	53
	<i>trzD-2</i>		TCGAAGCGATAACTGCATTG	
<i>trzN</i>	<i>trzN-1</i>	1360	ATGATCCTGATCCGCGGACTGA	56
	<i>trzN-2</i>		CTACAAGTCTTGGGAATGAGTG	

a 160 r·min<sup>-1</sup> shaker with a culture temperature of 30°C. Samples were taken every 4 h, until 48 h worth of samples were measured. The growth of the strain was determined by measuring its absorbance at 600 nm using a spectrophotometer (U-2910; HITACHI, Japan). The effects of atrazine concentration, temperature, pH, carbon, and nitrogen sources on the growth of the strain were also measured. All experiments were repeated three times to ensure accuracy.

When the effect of atrazine concentration on the growth of the strain was determined, the concentration was adjusted to 50, 100, 200, 500 and 1000 mg·l<sup>-1</sup>, respectively. The temperature was adjusted to 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, and 40°C and the pH was adjusted to 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11, respectively. The concentration of atrazine in these cultures was 100 mg·l<sup>-1</sup>. The effects of the carbon and nitrogen sources on the growth of strain LY-1 were studied by referring to previous methods [15]. The methods for determining the effects of carbon sources on the growth of strain LY-1 were as follows: 1) MSM (100 ml) + 100 mg·l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub> + 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine; 2) MSM (100 ml) + 100 mg·l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub> + 3 g·l<sup>-1</sup> glucose; 3) MSM (100 ml) + 100 mg·l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub> + 3 g·l<sup>-1</sup> sucrose; 4) MSM (100 ml) + 100 mg·l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub> + 3 g·l<sup>-1</sup> starch; and 5) MSM (100 ml) + 100 mg·l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>. The last one is a control group which did not add a carbon source. The methods for determining the effects of additional nitrogen sources on the growth of strain LY-1 were as follows: 1) MSM (100ml) + 3 g·l<sup>-1</sup> starch + 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine + 100 mg·l<sup>-1</sup> cyanuric acid; 2) MSM (100ml) + 3 g·l<sup>-1</sup> starch + 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine + 100 mg·l<sup>-1</sup> urea;

3) MSM (100ml) + 3 g·l<sup>-1</sup> starch + 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine + 100 mg·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl; 4) MSM (100ml) + 3 g·l<sup>-1</sup> starch + 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine + 100 mg·l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>; and 5) MSM (100ml) + 3 g·l<sup>-1</sup> starch + 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine. The last one is a control group, which did not add an additional nitrogen source. These treatment groups were incubated in a 160 r·min<sup>-1</sup> shaker for 48 h, and the culture temperature was maintained at 30°C. The growth of the strain was determined by measuring its absorbance at 600 nm using a spectrophotometer (U-2910; HITACHI, Japan).

The degradation capacity of atrazine was monitored using high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis [16]. The concentrations of atrazine, as well as its temperature and pH, were the same as those mentioned above, and the concentration of atrazine was 100 mg·l<sup>-1</sup>. The methods for determining the effects of carbon sources on the biodegradation capacity of strain LY-1 were as follows: 1) MSM (100 ml) + 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine + 3 g·l<sup>-1</sup> glucose; 2) MSM (100 ml) + 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine + 3 g·l<sup>-1</sup> sucrose; 3) MSM (100 ml) + 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine + 3 g·l<sup>-1</sup> starch; and 4) MSM (100 ml) + 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine. The methods for determining the effects of nitrogen sources on the biodegradation capacity of strain LY-1 were as follows: 1) MSM (100 ml) + 3 g·l<sup>-1</sup> starch + 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine + 100 mg·l<sup>-1</sup> urea; 2) MSM (100 ml) + 3 g·l<sup>-1</sup> starch + 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine + 100 mg·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl; 3) MSM (100 ml) + 3 g·l<sup>-1</sup> starch + 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine + 100 mg·l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>; and 4) MSM (100 ml) + 3 g·l<sup>-1</sup> starch + 100 mg·l<sup>-1</sup> atrazine. In the two

experiments, control groups were set which did not add carbon and additional nitrogen sources. The atrazine concentration and cyanuric acid production were quantified by HPLC (Waters 600; Waters). The detection conditions for atrazine were as follows: the mobile phase was methanol: water = 80:20 (v:v), the flow rate was 1 ml·min<sup>-1</sup> and the UV detector was set to 216 nm. For the detection of cyanuric acid [17], the flow rate was 0.8 ml·min<sup>-1</sup> (50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / methanol = 95:5, v:v), and the UV detector was set to 213 nm. The injection volumes of all samples were 20 µl.

#### Bioremediation of Atrazine-Contaminated Soil

The soil was collected from the experimental farm of Northeast Agricultural University, where atrazine had never been used (0-20 cm). Soil samples were treated in a 2.0 mm sieve and sterilized at 121°C for 50 min. Then, the soil was baked in an oven (80°C) and stored at 4°C until used.

The atrazine was dissolved in methanol (10<sup>4</sup> mg·l<sup>-1</sup>). The soil was placed in a fume hood for 48 h until the methanol evaporated. The final concentration of atrazine in the soil was 100 mg·kg<sup>-1</sup>. 200 g of contaminated soil was added to each pot. The strain LY-1 was resuspended with sterile water to a density of about 1×10<sup>6</sup> and 1×10<sup>8</sup> colony forming units (CFU)·ml<sup>-1</sup> (adjusted using a standard curve relating absorbance at 600 nm with plate count on MSM) [18]. Experimental treatments were used as follows: 1) contaminated soil (200 g) + strain LY-1(5 ml, 1×10<sup>6</sup> CFU·ml<sup>-1</sup>); 2) contaminated soil (200 g) + strain LY-1(5 ml, 1×10<sup>8</sup> CFU·ml<sup>-1</sup>); and 3) contaminated soil (200 g) + sterile water (5 ml). Each treatment was performed in triplicate. During the test period, the soil-water content of each treatment was maintained at 20%.

All treatments were placed at 25°C room temperature. On the 7th and 14th days, 10 g of soil samples were weighed from each group to detect the concentration of residual atrazine.

Thirty milliliters of methanol was added to each weighed soil sample, which was agitated for 2 h. The samples were placed for 24 h and then shaken for another hour. The treatments were centrifuged at 8000 r·min<sup>-1</sup> for 10 min and the supernatant was passed through a 0.22 µm filter for the detection of HPLC. The detection conditions were the same as those mentioned above.

## Results and Discussion

### Isolation and Identification of Strain LY-1

The strain LY-1 was isolated from the experimental soil, which was a Gram-positive bacterium. The results of HPLC showed that the strain could degrade 99.5% of the atrazine (100 mg·l<sup>-1</sup>) within 48 h. The 16S rDNA amplification products were sequenced and the sequence was submitted to GenBank (under accession No. KX905053). The sequence had a high similarity with many *Arthrobacter* sp. strains (Fig. 1). According to its physiological and biochemical characteristics, together with the sequential analysis, the strain LY-1 was identified as *Arthrobacter* species. *Arthrobacter* species strains were often found in many contaminated areas, and many *Arthrobacter* species were isolated from agricultural soil and were capable of degrading atrazine [19]. These results showed that *Arthrobacter* sp. LY-1 might hold great potential for the bioremediation of atrazine-contaminated soil.

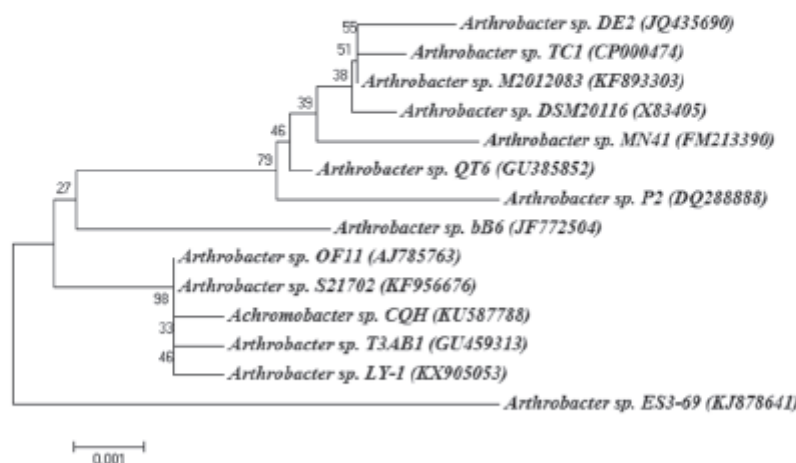


Fig. 1. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA sequences of *Arthrobacter* sp. LY-1; numbers on the branch points represent bootstrap values from the neighborhood-joining analysis of 1,000 resampled data sets; the bar indicates 0.1% substitution per nucleotide position.

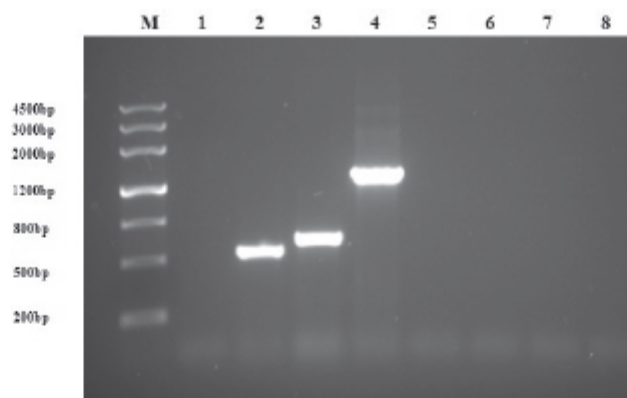


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis (1.2%) of PCR products of atrazine-degrading genes of strain LY-1; lanes 1 to 8 indicate the PCR amplification products for *atzA*, *atzB*, *atzC*, *trzN*, *atzD*, *atzE*, *atzF*, and *trzD*.

#### PCR Detection of Atrazine-Degrading Genes in Strain LY-1

The atrazine-degrading related genes were amplified by using the total DNA of the strain LY-1 as template. The products of 1370 bp *trzN*, 500 bp *atzB* and 600 bp *atzC* genes were obtained, as shown in Fig. 2, while the products of other genes were not obtained, including *atzC*, *atzD*, *atzE*, *atzF*, and *trzD*. The conditions of PCR were adjusted repeatedly, but other atrazine-degrading genes were not amplified successfully. The results of sequence determination and comparison demonstrated that the nucleotide sequences of *trzN*, *atzB*, and *atzC* from *Arthrobacter* sp. LY-1 showed 98%, 99%, and 100% sequence similarity with those of *Arthrobacter* sp. TC1 (Genbank accession number CP000475). These all indicated that strain LY-1 contained *trzN*, *atzB*, and *atzC* genes.

A number of reported *Arthrobacter* species only contained *trzN*, *atzB*, and *atzC* genes, such as

*Arthrobacter* sp. DAT1, *Arthrobacter* sp. AK-YN10 and *Arthrobacter* sp. TC1 [20-22]. These *Arthrobacter* species could only degrade atrazine to cyanuric acid and it was supposed that the strain LY-1 could also degrade atrazine to non-toxic cyanuric acid.

#### Growth and Degradation Characteristics of Strain LY-1

The growth characteristics of strain LY-1 were measured in the medium in which the sole nitrogen sources were atrazine or cyanuric acid (Fig. 3a). When using atrazine as the sole nitrogen source,  $OD_{600}$  increased markedly and reached its maximum value at 44 h, while within 12 h after inoculation the strain grew slowly, indicating that the strain has a certain period of adaptation. When cyanuric acid was used as the sole nitrogen source, the strain hardly grew. This illustrated that strain LY-1 could not utilize cyanuric acid as the sole nitrogen source to grow.

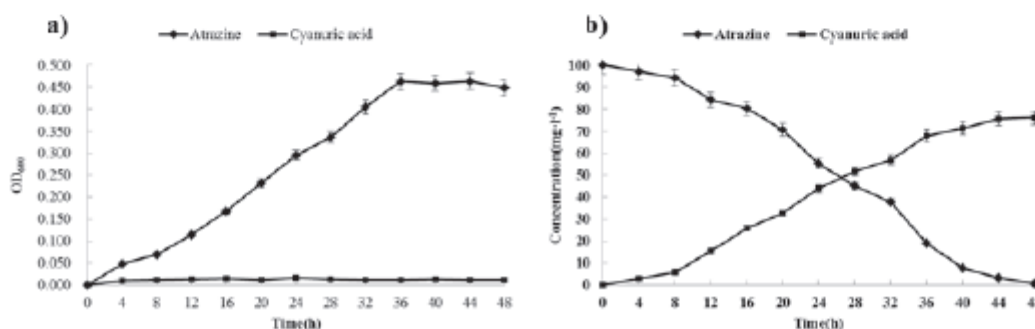


Fig. 3. a) Growth curve of strain LY-1 in MSM medium containing either atrazine or cyanuric acid ( $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) as the sole nitrogen source and b) Atrazine degradation curve containing atrazine ( $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) as the sole nitrogen source; the concentration of cyanuric acid was detected by HPLC in MSM medium.

We also measured the degradation characteristics of strain LY-1 in the medium in which the sole nitrogen source was atrazine (Fig. 3b)). The strain LY-1 could

degrade 99.5% of the atrazine ( $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) within 48 h. With the decrease of atrazine concentration, the concentration of cyanuric acid increased gradually.

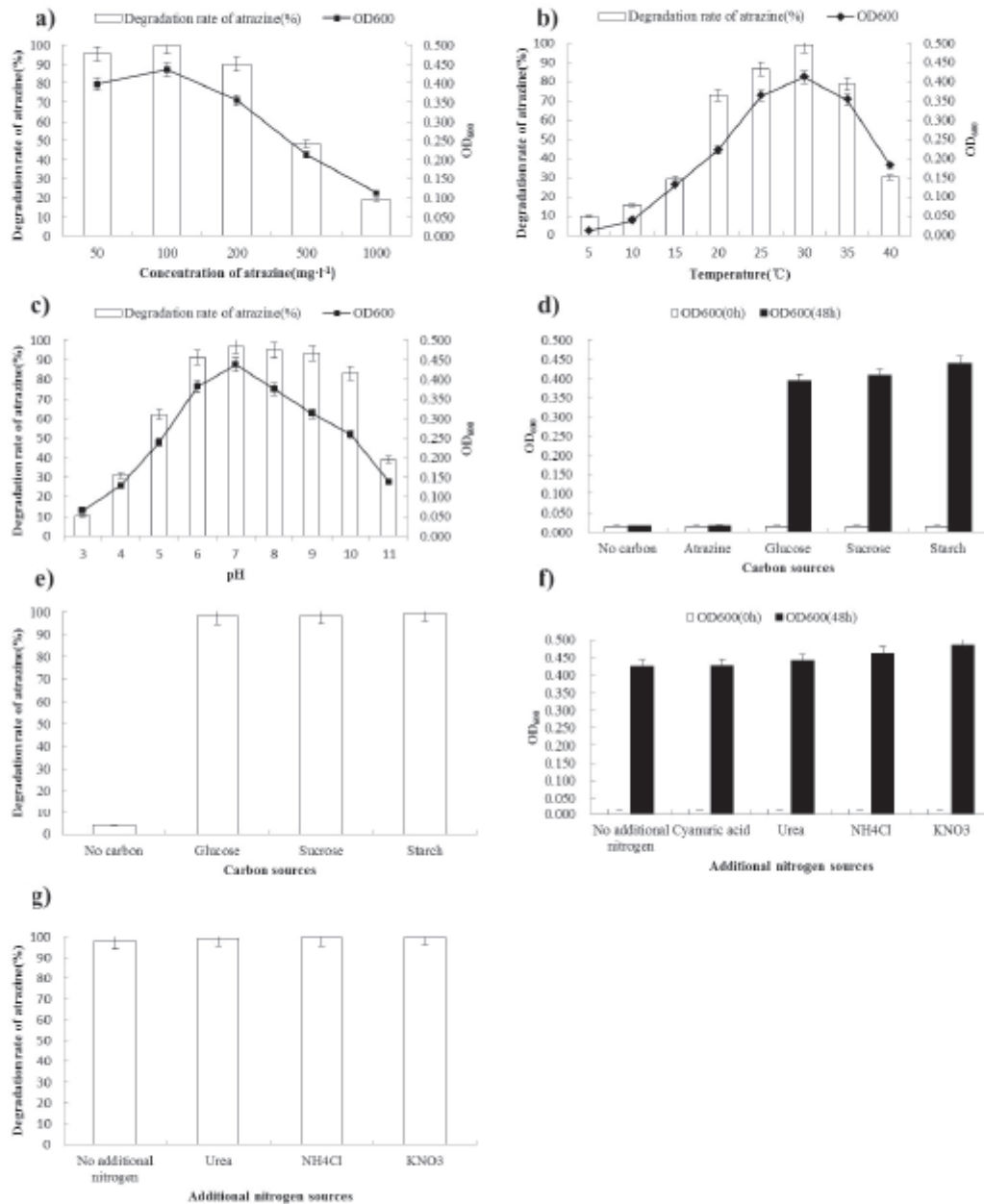


Fig. 4. After 48-h incubation: a) Effects of atrazine concentration on growth and degradation capacity of strain LY-1, b) effects of temperature on the growth and the degradation capacity of strain LY-1, c) effects of pH on the growth and the degradation capacity of strain LY-1, d) effects of different carbon sources on the growth of strain LY-1, e) effects of different carbon sources on the degradation capacity of strain LY-1, f) effects of different additional nitrogen sources on the growth of strain LY-1, and g) effects of different additional nitrogen sources on the degradation capacity of strain LY-1.

At 44-48 h, atrazine was almost completely degraded and the concentration of cyanuric acid was also stable. All of these certified that *Arthrobacter* sp. LY-1 could convert atrazine to cyanuric acid. The speculative pathway of atrazine degradation by *Arthrobacter* sp. LY-1 was the same as the reported pathway [23].

#### Effects of Environmental Factors on Growth and Biodegradation

Atrazine concentration, temperature, pH, carbon, and nitrogen sources influence atrazine degradation, but few reported studies have investigated the effects of these conditions on atrazine degradation. Most the previous studies referred to the degradation of atrazine at lower concentrations. *Arthrobacter* sp. C3 could almost completely degrade atrazine ( $25 \text{ mg l}^{-1}$ ) after being cultured for 30 h and *Arthrobacter* species DNS10 could degrade 99.6% of  $100 \text{ mg l}^{-1}$  of atrazine within 36 h [24-25]. Fig. 4 indicated that when the atrazine concentration was below  $200 \text{ mg l}^{-1}$ , the degradation rate of atrazine in the medium was more than 90% within 48 h. When atrazine concentration was  $500 \text{ mg l}^{-1}$ , the degradation rate was 50%. This showed that the strain demonstrated a positive degradation effect, although the atrazine concentration was higher. When the atrazine concentration was  $100 \text{ mg l}^{-1}$ , the growth and degradation abilities of strain LY-1 were optimal. When the atrazine concentration was  $1000 \text{ mg l}^{-1}$ , the growth and degradation abilities of strain LY-1 were less effective. Atrazine has a toxic effect on microorganisms, and if the concentration of atrazine in the culture is too high, then its toxicity will inhibit the metabolic activities of microorganisms, resulting in a significant reduction in growth and degradation activity.

The currently known optimum temperature range for degradation of atrazine by *Arthrobacter* species HB-5 is  $20\text{-}40^\circ\text{C}$  [26]. The effects of different temperatures on growth and atrazine degradation by *Arthrobacter* species LY-1 were shown in Fig. 4b), which indicated that the optimum temperature range was  $20\text{-}35^\circ\text{C}$ . Growth and degradation abilities were both inhibited when the temperature was higher than  $35^\circ\text{C}$  or lower than  $20^\circ\text{C}$ . Fig. 4b also demonstrated that strain LY-1 exhibited a particular degradation ability at low temperatures, and the degradation rate of atrazine was about 30% at  $15^\circ\text{C}$ . Therefore, strain LY-1 was also suitable for bioremediation of atrazine at lower temperatures.

The optimum pH range for atrazine degradation by *Pseudomonas* sp. ZXY-1 was 6.0-8.0 and *Arthrobacter* species HB-5 was 6.0-9.0 [27]. The effects of different pH values on the growth of *Arthrobacter* species LY-1 and its atrazine degradation ability were shown in Fig. 4c). The optimum pH range was 6.0-10.0 and the degradation and growth abilities of the strain under alkaline conditions were better than those in acidic conditions. The strain still could have degradation rates of 62.1% and 38.9% at pH 5.0 and 11.0, respectively.

These results indicated that strain LY-1 had wide ranges of temperature and pH, and it demonstrated better environmental adaptability and scavenging ability in contaminated soil. Overall, the strain had superior bioremediation potential.

Carbon sources were a necessary precondition for the growth of strain LY-1. Fig. 4d) indicated that starch was the most suitable carbon source for its growth. When glucose, sucrose, and starch were used as carbon sources, the removal rates of atrazine were more than 95%; however, when no carbon source was added, the concentration of atrazine changed insignificantly (Fig. 4e). Moreover, when atrazine was used as the sole carbon source, the strain hardly grew. All these findings point to the fact that atrazine could not be used as the sole carbon source of strain LY-1.

Fig. 4f) demonstrated the effects of additional nitrogen sources on the growth of strain LY-1. The addition of urea, ammonium salt, and nitrate promoted the growth of the strain LY-1, with nitrate resulting in the highest strain growth, while cyanuric acid did not cause higher growth. These results implied that strain LY-1 could not use cyanuric acid as a nitrogen source to grow. This also indirectly verified that the strain could convert atrazine to cyanuric acid, but it was unable to degrade cyanuric acid. Some previous studies showed that additional nitrogen sources had a negative impact on atrazine degradation [28-30]. While additional nitrogen sources did not affect the degradation of atrazine by strain LY-1 (Fig. 4g), the degradation rates all exceeded 98%. This illustrated that strain LY-1 had a great potential for bioremediation of atrazine-contaminated soil, and even contaminated soil containing rich nitrogen sources.

#### Bioremediation Effect of Atrazine-Contaminated Soil by Strain LY-1

The degradation rate of atrazine in the soil by strain LY-1 was shown in Fig. 5. After incubation at  $25^\circ\text{C}$  for

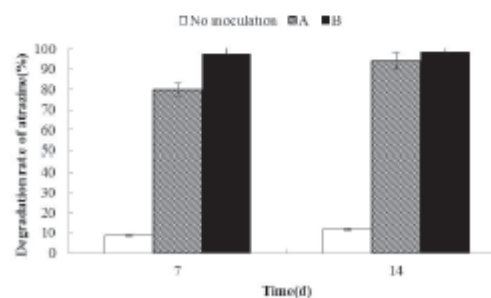


Fig. 5. The degradation rate of atrazine in the soil by strain LY-1 after incubation at  $25^\circ\text{C}$  for 7 d and 14 d. A) strain LY-1 was resuspended with sterile water to a density of about  $1 \times 10^6$  colony forming units (CFU)  $\text{ml}^{-1}$  and B) strain LY-1 was resuspended with sterile water to a density of about  $1 \times 10^8$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ .

7 d, 79.9% and 97.4% of atrazine were removed by  $1 \times 10^6$  CFU $\cdot$ ml $^{-1}$  and  $1 \times 10^8$  CFU $\cdot$ ml $^{-1}$  of LY-1, respectively. After incubation at 25°C for 14 d, the degradation rates of atrazine by  $1 \times 10^6$  CFU $\cdot$ ml $^{-1}$  and  $1 \times 10^8$  CFU $\cdot$ ml $^{-1}$  of LY-1 were 94.1% and 98.3%, respectively. However, after incubation at 25°C for 7 d and 14 d, 8.7% and 12% of atrazine were removed in the negative control. In comparison, after 20 days, atrazine degradation rates by *Arthrobacter* sp. DNS10 were 67.7%, and the initial concentration of atrazine in the soil was 20 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ . The study showed that atrazine-degrading bacteria *Arthrobacter* sp. LY-1 had a better remediation capability for atrazine-contaminated soil compared with most other reported atrazine-degrading strains. This strain could achieve a better degradation effect in a relatively short time and might be a new candidate for the remediation of atrazine-contaminated soil.

### Conclusions

A highly efficient atrazine-degrading bacterial strain, *Arthrobacter* sp. LY-1, was isolated from agricultural soil. The strain harbored *trzN*, *atzB*, and *atzC* genes, which could transform atrazine to cyanuric acid. The strain was capable of using atrazine as the sole nitrogen source to grow, while atrazine could not be used as a carbon source for growth. The degradation rates of atrazine under different environmental factors were determined and when atrazine concentration was 100 mg $\cdot$ l $^{-1}$ , the growth and degradation ability of strain LY-1 were the best. The optimum temperature range of this strain was 20-35°C, and the optimum pH range was 6.0-10.0. Starch was the most suitable carbon source for its growth and atrazine degradation. Additional nitrogen sources did not affect the degradation of atrazine. Strain LY-1 could degrade 99.5% of atrazine (100 mg $\cdot$ l $^{-1}$ ) in the medium within 48 h, and in the soil, atrazine (100 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ ) was almost completely degraded by the strain after 14 days. These results demonstrated that strain LY-1 held promising potential for bioremediation of atrazine-contaminated soil.

### Acknowledgements

This study was supported by the Heilongjiang Provincial National Science Foundation (C2016025), and the open fund of State Key Laboratory of Biology for Plant Diseases and Insect Pests (SKLOF201705).

### Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### References

1. MA L.M., CHEN S.S., YUAN J., YANG P.P., LIU Y., STEWART K. Rapid biodegradation of atrazine by *Ensifer* sp. strain and its degradation genes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **116**, 133, 2017.
2. WANG Q., XIE S. Isolation and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **71** (4), 61, 2012.
3. SHENOY K. Environmentally realistic exposure to the herbicide atrazine alters some sexually selected traits in male guppies. *Plos One*, **7** (2), e30611, 2012.
4. YE J.Y., ZHANG J.B., GAO J.G., LI H.T., LIANG D., LIU R.M. Isolation and characterization of atrazine-degrading strain *Shewanella* sp. YJY4 from cornfield soil. *Letters in Applied Microbiology*, **63** (1), 45, 2016.
5. SAJJAPHAN K., SHAPIR N., WACKETT L.P., PALMER M., BLACKMON B., TOMKINS J., SADOWSKY M.J. *Arthrobacter aureus* TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*. *Applied & Environmental Microbiology*, **70** (7), 4402, 2004.
6. DESITTI C., CHERUTI U., BELIAVSKI M., TARRE S., GREEN M. Long-term atrazine degradation with microtube-encapsulated *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Environmental Engineering Science*, **33** (3), 2016.
7. YANG X., WEI H., ZHU C., GENG B. Biodegradation of atrazine by the novel *Citricoccus* sp. strain TT3. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, **147**, 144, 2017.
8. KOLEKAR P.D., PHUGARE S.S., JADHAV J.P. Biodegradation of atrazine by *Rhodococcus* sp. BCH2 to N-isopropylammelide with subsequent assessment of toxicity of biodegraded metabolites. *Environmental Science & Pollution Research*, **21** (3), 2334, 2014.
9. WANG J., ZHU L., WANG Q., WANG J., XIE H. Isolation and characterization of atrazine mineralizing bacillus subtilis strain HB-6. *Plos One*, **9** (9), e107270, 2014.
10. GOVANTES F., GARCIA-GONZALEZ V., PORRUA O., PLATERO A.I., JIMENEZ-FERNANDEZ A., SANTERO E. Regulation of the atrazine-degradative genes in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Fems Microbiology Letters*, **310** (1), 1, 2010.
11. MEYER A.H., PENNING H., ELSNER M. C and N isotope fractionation suggests similar mechanisms of microbial atrazine transformation despite involvement of different enzymes (*AtzA* and *TrzN*). *Environmental Science & Technology*, **43** (21), 8079, 2009.
12. KONG X., JIANG J., MA J., YANG Y., LIU W., LIU Y. Degradation of atrazine by UV/chlorine: efficiency, influencing factors, and products. *Water Research*, **90**, 15, 2016.
13. FRANK J.A., REICH C.I., SHARMA S., WEISBAUM J.S., WILSON B.A., OLSEN G.J. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied & Environmental Microbiology*, **74** (8), 2461, 2008.
14. ZHANG Y., JIANG Z., CAO B., HU M., WANG Z.G., DONG X.N. Metabolic ability and gene characteristics of *Arthrobacter* sp. strain DNS10, the sole atrazine-degrading strain in a consortium isolated from black soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **65** (8), 1140, 2011.
15. WANG Q., XIE S. Isolation and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strain.

**Office**

India

**Application Number**

2482/CHE/2015

**Application Date**

18.05.2015

**Publication Number**

2482/CHE/2015

**Publication Date**

25.11.2016

**Publication Kind**

A

**IPC**

A01N

**Applicants**

SHIVASHAKTHI BIO TECHNOLOGIES LTD

**Inventors**

MURTHY; KONDRAGUNTA SRI RAMA  
VENKATARAO; GONUGUNTLA  
RAJ; MOHAN BOGU

**Title**

[EN] POTENT LIQUID BIO-FERTILIZER FORMULATION

**Abstract**

[EN] The present invention provides Liquid Bio-fertilizer Formulation comprising microorganisms particularly Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and médium of a mixture of Peptone, Beef extract, Yeast extract, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, Tryptophan, Defoamer, Distilled water, and pH ranging between 6.8 - 7.5.Said potent Liquid Bio-fertilizer Formulation are useful as direct farming fertilizer and as replacement of chemical fertilizer, which are not only useful in handling and environment friendly but also provides long term benefits to the soil and environment.The process technique according to present invention also provide large scale production of such potent Liquid Bio-fertilizer Formulation comprising microorganisms particularly Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) comprising the steps-Step-1: Isolation procedure for PGPR bacteriaStep-2: Characterization of isolates dilutionStep-3: Growth under different temperature conditions according to the present inventionStep-4: Incubation and RecoveryStep-5: Direct Commercial Aseptic Packaging.Such process resulting a naturally stabilized composition provides long term stability to the composition.

# 1. IN2482/CHE/2015 - POTENT LIQUID BIO-FERTILIZER FORMULATION

National Biblio. Data Description Claims Documents

[PermaLink](#) [Machine translation](#)

**Note:** Text based on automatic Optical Character Recognition processes. Please use the PDF version for legal matters

[EN]

**POTENT LIQUID BIO-FERTILIZER FORMULATION**The following specification particularly describes the invention and the methodology to be performed.**INTRODUCTION**The present application relates to the Potent Liquid Bio-fertilizer Formulation directly useful in farming resulting in improved crop production and long term soil reclamations. More specifically, the present invention relates to Potent Bio-fertilizers formulation containing micro organisms and their carrier and stabilizers. Biofertilizers (fertilization compositions comprising microbes) have been identified as an alternative to chemical fertilization to increase soil fertility and crop production using sustainable farming.. The use of nitrogen-fixing bacteria provides plants with nitrogen compounds needed for growth and there is increasing evidence that other bacteria provide plant hormones to enhance growth. Bio-fertilizers are exclusively based on living microorganisms. Unlike chemical fertilizers; though they themselves are not the direct source of nutrients but assist the plants in securing the nutrients and micronutrients available in its soil and surrounding environment. Most commonly utilized microorganisms as bio-fertilizers may be Nitrogen fixing type soil bacteria (e.g. Rhizobium, Azotobacter), Nitrogen-fixing cyanobacteria (Anabaena), Phosphate solubilizing bacteria (Pseudomonas putida) and Arbuscular mycorrhizal fungi. Similarly, phyto-hormone (auxin) producing bacteria and cellulolytic microorganisms may also be part of Bio-fertilizer formulation. When utilized to the field, the activities like Nitrogen fixation, Phosphate solubilization and Production of phytohormones of the plants/crop are benefited resulting in improved growth and productivity. Therefore, viability of these useful micro-organisms during. production, formulation, storage, transportation / distribution and field application is directly related to plant growth promoting potential of a bio-fertilizer formulation. The farmers have often questioned the efficiency and efficacy of Bio-fertilizer including but not limited to constraints of storage and longer duration between production and field application. This limits their use due to compatibility, stability and microorganism survival issues under different/extreme soil conditions. Hence, improved shelf life could be the key contributor for further popularization of Bio-fertilizer applied role. A few commercial bio-fertilizer formulations are also available and different strategies have been applied to ensure maximum viability of the microorganisms used in these formulations, which strategies includes (i) optimization of Bio-fertilizer formulation, (ii) Application of thermo-tolerant/drought-tolerant/genetically modified strains and, (iii) application of liquid Bio-fertilizer. For convenience of application, a carrier material is used as a vehicle for the microorganisms to be used as biofertilizer. Such materials may have a significant role in maintaining the viability (shelf-life) of the microorganisms prior to its release into the field as well as they also provide a suitable microenvironment for rapid growth of the organisms upon their release. A carrier may be a material, such as peat, vermiculite, lignite powder, clay, tale, rice bran, seed, rock phosphate pellet, charcoal, soil, paddy straw compost, wheat bran or a mixture of such materials. In common practice, for better shelf-life of biofertilizer formulation, a carrier or a mixture of such carrier materials are selected based on the viability/stability of the microorganisms mixed with them. Similarly, pre-sterilization of the carrier material and its enrichment with nutrient is the other strategy to improve the shelf-life by allowing the microorganism to maintain/grow in a non-competitive microenvironment [Yardin MR, Kennedy IR, Thies JE (2000). Development of high quality carrier materials for. field delivery of key microorganisms used as bio-fertilisers and bio-pesticides. [Radiation Physics and Chemistry 57: 565-568.]. Liquid biofertilizer formulation may be considered as one potential strategy for improving the shelf-life of biofertilizer. Unlike solid carrier based biofertilizers, liquid formulations allow the manufacturer to include sufficient amount of nutrients, cell protectant, and inducers responsible for cell/spore/cyst formation to ensure prolonged shelf-life. The shelf-life of common solid carrier based biofertilizers is around six months; however, it could be as high as two years for a liquid formulation [Mahdi SS, Hassan GI, Samoon SA, Rather HA, Dar SA, et al. (2010). Biofertilizers in Organic Agriculture. Journal of Phytology 2: 42-54 and TNAU Agritech Portal, Biofertilizers Technology. Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore]. Further, solid carrier based biofertilizers are less thermo-tolerant whereas; liquid formulations can tolerate the temperature as high as 55 °C [Yadav AK. Biofertilizers an input less exploited, National Centre of Organic Farming, Ghaziabad]. Hence, improved shelf-life may be achieved by the application of a liquid biofertilizer formulation, if a suitable carrier and shelf life enhancing agent or a combination is identified. In their endeavor to get such solution, it is also observed that process cost of liquid bio-fertilizer increases to significantly higher than a solid formulation. Thus, successful commercialization of less expensive liquid biofertilizer is a big challenge, need of the time and shelf-life of such products is still a concern. Consequently, efforts are also underway to conceive efficient biofertilizers compatible with a wide range of soils and plants by molecular and genetic engineering. For instance, biofertilizers have been produced, firstly, based on nitrogen-fixing rhizobial bacteria found "naturally" in the root nodules of legumes. However, these bacteria are not able to provide non-leguminous plants with the nitrogen that they fix from the atmosphere. In this

root nodules of legumes. However, these bacteria are not able to provide non-leguminous plants with the nitrogen that they fix from the atmosphere. In this case, molecular engineering is of particular interest, since it allows the development of effective delivery systems, so that non-leguminous plants can also be grown with symbiotic rhizobial root nodules without the need for added nitrogen fertilizers. Anand Agricultural University (AAU) has also developed a liquid formulation of Bio-fertilizers which are claimed safe and eco-friendly alternative to chemical fertilizers. These liquid Bio-fertilizers are suspensions having useful microorganisms, which fix atmospheric nitrogen and solubilise insoluble phosphates and make it available for the plants. They are sold to farmers under the brand name "Anubhav liquid Bio-fertilizers" by the University. Anubhav LBF (liquid Bio-fertilizers) is based on native cultures of bacteria viz., Azotobacter chroococcum, Azospirillum lipoferum and Bacillus coagulans. Amy in US Patent 8,029,593. provides a bio-fertilizer composition comprising a bacteria consortium of Azospirillum brasilense in combination with at least one other bacteria that provides a function selected from the group consisting of: (a) bacteria that fix nitrogen; (b) bacteria that lyses other bacteria in the soil and (c) bacteria that produce siderophores. These claimed Bio-fertilizer compositions are particularly useful in Turf grasses which are selected from the group consisting of annual bluegrass, annual ryegrass, bahiagrass, bermudagrass, buffalograss, carpetgrass, centipede grass, creeping bentgrass, colonial bentgrass, fine fescue, " hybrid bermudagrass, Kentucky bluegrass, kikuyugrass, orchardgrass, perennial ryegrass, quackgrass, rough bluegrass, seashore paspalum, St. Augustine grass, tall fescue and zoysiagrass. In these claimed compositions, the N-compound utilized was selected from the group consisting of urea, ammonium sulfate, ammonium nitrate, ammonium

atentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf;jsessionid=E7830FA5353FB47A02F765A0FFE773AD.wapp2nC?docId=IN211780320&\_cid=P22-...

phosphate, calcium nitrate, potassium nitrate, sodium nitrate; and a P-compound was selected from the group consisting of ammonium phosphate, superphosphate,  $\text{Ca}^{\text{H}}\text{PO}^{\text{A}}$ , tricalcium phosphate, phosphate salts of sodium or potassium, including orthophosphate salts; and a K-compound was selected from the group consisting of KCl, potassium sulfate, potassium nitrate, orthophosphate salts of potassium and phosphate salts of potassium. Gidekelet al in US 8, 415, 271 provides another bio-fertilizer composition, comprising psychrophilic bacterial strains isolated from rhizosphere of *Deschampsia antarctica*, wherein the composition contains bacterial strains selected from the group consisting of *Pseudomonas antarctica* DaBact TI-9, *Pseudomonas trivialis* DaBact 2H and *Arthrobacter* ssp. DaBact MII-9. These unique compositions prepared before use by combining a bacterial suspension and a polysaccharide solution, wherein said bacterial suspension consists of *Pseudomonas antarctica* DaBact TI-9, *Pseudomonas trivialis* DaBact 2H and *Arthrobacter* ssp. DaBact MII-9 strains each at concentration of 10 CFU and 1% (w/v) of sun protecting product, and said polysaccharide solution being 1% (w/v) solution of guar gum, gellan gum, pectin, carboxymethyl cellulose, agar, agar or xanthan gum. This biofertilizer composition is useful in low temperatures conditions. Nautiyal et al in US 6, 495, 362 disclose a bio-fertilizer composition comprising biologically pure culture of bacteria that suppresses diseases caused by pathogens in chickpea crops and a culture of bacteria comprising a strain of *Pseudomonas fluorescens*. The patent discloses a simple live-sand or soil assay method for large scale screening of the rhizosphere-competent bacteria effective in suppressing plant pathogens. Screening for chickpea rhizosphere competitive bacteria having biological control properties were conducted at three different stages: (1) development of a screening method for large scale initial selection of bacterial isolates from chickpea rhizosphere, (2) testing of biocontrol activity under in vitro conditions, and (3) screening of antibiotic resistant mutants for rhizosphere competence in non sterile field soil, which assay was used to disclose one *Pseudomonas fluorescens* NBRI 1303 (ATCC 55939) which is effective in suppressing plant pathogens, including *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri, *Rhizoctonia bataticola* and *Phthium* sp. in chickpeas, and the purified bacterial strain can be used as active agent for biocontrol compositions and can also be used for enhancement of chickpea plant growth and yield, as well as for the production of antibiotics directed towards phytopathogenic fungal diseases. Canadian patent No. 1,172,585 discloses the use of particular strains of naturally-occurring *Pseudomonas* in bio-fertilizer composition to benefit plant growth in root crops by reducing the population of other indigenous root-zone microbiota that adversely influence plant growth. Porubcanet al in US 6, 878, 179 discloses fertilizer compositions for plant production comprised of decontaminated manure and *Bacillus* spores, preferably a humic acid derived from lignite and, optionally, one or more N-containing compounds, P-containing compounds, K-containing compounds, and combinations of two or more of these compounds. Preferred compositions are those wherein the ingredients are blended into an admixture resulting in a granular product. Other preferred compositions are those blended into an admixture resulting in a powdered product. Preferably, the ingredients are formed into hardened pills or pellets. Mehta et al in US 6, 228, 806 describes a biochemical fertilizer. A broad list of microorganisms, listed by genera, is provided, including *Bacillus*. The need for microbial nutrients is mentioned as part of the microorganism ingredient, not the bulk organic ingredient. Wilson et al in US 6, 312, 492 discloses improved fertilizer effect of poultry manure by adding sulfuric acid followed by drying. Wilson teaches specifically the co-addition of cellulose containing materials. Branly et al in US 6, 232, 270 focuses on using *Bacillus* bacteria to enhance the effectiveness of chemical herbicides and lists every imaginable *Bacillus* ever discovered and claims they will all benefit this purpose. US patent 6, 025, 187 describes bacterial complexes comprising at least one non-pathogenic *Bacillus* and at least one non-pathogenic *Lactobacillus* which essentially allow the conversion of inorganic nitrogen into organic nitrogen in the form of bacterial proteins, which allow the conversion of excrement into nitrogenous compounds (stable nitrogenous compounds and/or compost) and, particularly for waste having a sufficient C/N ratio (in relation to the level of solids content), into non-polluting compounds rich in fulvic acid and humic acid, by digestion and conversion of excrements, while at the same time removing the associated pathogenic germs in particular *Clostridium*, *Bacteroides*, *Colibacilli*, *Listeria*, *Salmonellae* and *Staphylococci*. In view of plethora of literature disclosing diverse Bio-fertilizer composition, there are still the hurdles in acceptance of the Biofertilizers by farmers due to one or the other reasons including but not limited to cost, stability, time of benefit to the crop and soil, offending product nature (in terms of odour, colour etc.) etc. Hence, the main object of the present invention is to provide an improved and Potent Liquid Bio-fertilizer Formulation, which may be directly useful in farming resulting in improved crop production and long term soil reclamations, cost effective, which obviates the drawback as detailed above. Another object of the present invention is to develop improved process for pure culture medium for regeneration of desirable microorganisms in a particular medium according to present invention. Yet another object of the present invention is to develop a Potent Liquid Bio-fertilizer Formulation having user friendly color resulting in stability and acceptable odour for farming and easy to handle. Still yet another object of the present invention is to develop a protocol for preparing consistent quality of Liquid Bio-fertilizer Formulation comprising microorganisms particularly Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). SUMMARY OF INVENTION Different aspects of the present application are summarized herein below individually. In one aspect of the present application, the present invention provides Liquid Bio-fertilizer Formulation comprising microorganisms particularly Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). In a further specific aspect of the present application, the present application provides steps to be followed for the preparation of said potent liquid Bio-fertilizer Formulation comprising Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), which process technique according to present invention also retains purity of cultured microorganism. This protocol comprise the steps of- Step-1: Isolation procedure for PGPR bacteria Step-2: Characterization of isolates dilution Step-3: Growth under different temperature conditions according to the present invention Step-4: Incubation and Recovery Step-5: Direct Commercial Aseptic Packaging In a further specific aspect of the present application, the present application provides an inoculation medium comprising- Peptone - 2.4 kgo Beef extract - 600 go Yeast extract - 600 go K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 600go MgSO<sub>4</sub> - 600go CaCl<sub>2</sub> - 40go Tryptophan - 400 go Defoamer - 50 mio Distilled water - 400

2.4 kgo Beef extract - 600 go Yeast extract - 600 go K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> -600go MgSO<sub>4</sub> -600g o CaCl<sub>2</sub> -40go Tryptophan - 400 go Defoamer - 50 mio Distilled water - 400 liters o pH - 6.8 - 7.2 (adjust with HCL and NaOH)and final preservatives composition of o Glycerol - 67.5 kgo CMC -31.5kgo RoseBengal -HOgBRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS Fig. 1 is an process protocol according to present invention Fig. 2 is a demonstration of stability and comparative study with and without rose Bengal coloring agent DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION As set forth herein, aspects of the present invention relates to potent Liquid Bio-fertilizer Formulation comprising microorganisms particularly Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) are a group of bacteria that enhances plant growth and yield via various plant growth promoting substances. The plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), are characterized by the following inherent distinctiveness's: (i) they must be proficient to colonize the root surface (ii) they must survive, multiply and compete with other microbiota, at least for the time needed to express their plant growth promotion/protection activities, and (iii) they must promote plant growth. About 2-5% of rhizobacteria, when reintroduced by plant inoculation in a soil containing competitive microflora, exert a beneficial effect on plant growth and are termed as plant growth promoting rhizobacteria. PGPR's are also classified based on their functional activities as (i) biofertilizers (increasing the availability of nutrients to plant), (ii) phyto-stimulators (plant growth promotion, generally through phytohormones), (iii) rhizoremediators (degrading organic pollutants) and (iv) Biopesticides (controlling diseases, mainly by the production of antibiotics and antifungal metabolites). Furthermore, in most studied cases, a single PGPR will often reveal multiple modes of action including biological control. Furthermore, have recently shown that the PGPR associations range in the degree of bacterial proximity to the root and intimacy of association. In general, these can be separated into extracellular (ePGPR), existing in the rhizosphere, on the rhizoplane, or in the spaces between cells of the root cortex, and intracellular (iPGPR), which exist inside root cells, generally in specialized nodular structures. Some examples of ePGPR are like, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Serratia* etc.. Similarly, some examples of the PGPR are *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* and *Rhizobium* of the family *Rhizobiaceae*. Most of rhizobacteria belonging to this group are Gram-negative rods with a lower proportion being Gram-positive rods, cocci or pleomorphic. Moreover, numerous actinomycetes are also one of the major components of rhizosphere microbial communities displaying marvelous plant growth beneficial traits. Among them, *Micromonospora* sp., *Streptomyces* spp., *Streptosporangium* sp., and *Thermobifida* sp., which have shown an enormous potential as biocontrol agents against different root fungal pathogens, are worthy of mention. PGPR mediated plant growth promotion occurs by the alteration of the whole microbial community in rhizosphere niche through the production of various substances. Generally, PGPR promote plant growth directly by either facilitating resource acquisition (nitrogen, phosphorus and essential minerals) or modulating plant hormone levels, or indirectly by decreasing the inhibitory effects of various pathogens on plant growth and development in the forms of biocontrol agents. In an embodiment according to the present application, it provides a protocol for providing large scale production of such potent Liquid Bio-fertilizer Formulation comprising microorganisms particularly Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) comprising

the following steps-Step-1: Isolation procedure for PGPR bacteria Step-2: Characterization of isolates dilution Step-3: Growth under different temperature conditions according to the present invention Step-4: Incubation and Recovery Step-5: Direct Commercial Aseptic Packaging Step-1: Isolation procedure for PGPR bacteria: Soil samples were collected from the rhizosphere of plants in different areas of India. The rhizosphere was dug out with intact root system. The samples were placed in plastic bags and stored at 4°C in refrigerator. Ten grams of rhizosphere soil were taken into a 250 mL of conical flask, and 90 mL of sterile distilled water was added to it. The flask was shaken for 10 min on a rotary shaker. One milliliter of suspension was added to 10 mL vial and shaken for 2 min. Serial dilution technique was performed upto 10 CFU. Step-2: Characterization of isolates dilution An aliquot (0.1 mL) of this suspension was spread on the plates of Luria-Bertany (LB) agar medium. Plates were incubated for 3 days at 28°C to observe the colonies of bacteria. Bacterial colonies were streaked to other LB agar plates and the plates were incubated at 28°C for 3 days. Typical bacterial colonies were observed over the streak. Well isolated single colony was picked up and restreaked to fresh LB agar plate and incubated similarly. The technique was perpetuated thrice and cultures were made single colony type. Morphological characteristics of the colony of each isolate were examined on LB agar plates. All the isolates were streaked on LB agar plates. After 3 days of incubation, different characteristics of colonies such as shape, size, elevation, surface, margin, color, odor, pigmentation, etc were recorded. A loopful of bacterial culture from each isolates was diluted into a test tube containing 1 mL sterile distilled water and was vortexed. A loopful was then taken on a glass slide and smeared. The slide was air dried and fixed by heating on a Bunsen flame. The slide was flooded with crystal violet solution for 3 min. The slide was washed gently in flow of tap water and air dried. The slide was observed under microscope and the shape was recorded. A drop of sterile distilled water was placed in the center of glass slide. A loopful of growth from young culture was taken, mixed with water, and placed in the center of slide. The suspension was spread out on slide using the tip of inoculation needle to make a thin suspension. The smear was dried in air and fixed through mild heating by passing the lower side of the slide 3 to 4 times over the flame. The smear was then flooded with crystal violet solution for 1 min and washed gently in flow of tap water. Then the slide was flooded with iodine solution, immediately drained off, and flooded again with iodine solution. After incubation at room temperature for 1 min, iodine solution was drained out followed by washing with 95% ethanol. After that, it was washed with water within 15 to 30 seconds and blot dried carefully. The smear was incubated with safranin solution for 1 min. The slide was washed gently in flow of tap water and dried in air. The slide was observed under microscope and data were recorded. Motility of bacteria was observed by hanging drop method. A loopful of 2 day old bacterial culture was suspended in 1 mL of nigrosin solution. A drop of suspension was taken on a cover slip. The cover slip was hanged on a hollow slide with vaseline. The slide was then observed under microscope to test the motility of bacteria. Step-3: Growth under different temperature conditions The culture of 10 isolates were streaked on LB agar plates and incubated at 10, 20, 28, 37 and 45°C. The change in growth and color was observed and recorded after 3 days of incubation. IAA production Plant hormones can be natural or synthetic. There are several phytohormone groups and the best known is the auxin group. Diverse soil microorganisms including bacteria, fungi and algae are also capable of producing physiologically active quantities of auxin (IAA). The culture of 10 isolates was incubated in the pepton broth enriched with tryptophan broth to check for the production of indole acetic acid, a precursor of auxin which is an important plant hormone. The quantitative estimation of IAA is performed by using Salkowski method by using the reagent, 1 ml of FeCl<sub>3</sub> Phosphate solubilization, 0.5 mM in 35% HClO<sub>4</sub>. Mixtures were incubated at room temperature for 25 min and observed for pink colour production and read colorimetrically. Phosphorus is only second to nitrogen in mineral nutrients which is most commonly limiting in the growth of plants. Many soil microorganisms are able to solubilize unavailable forms of bound P. The plates were prepared with Pikovskya's medium (comprise of yeast extract, dextrose, calcium phosphate, ammonium sulphate, potassium chloride, magnesium sulphate, manganese sulphate and ferrous sulphate). The culture of ten isolates were streaked on the plates and incubated in an incubator at 28°C for 7 days. The plates were then examined and data were recorded. Visual detection and semi quantitative estimation of phosphate solubilizing ability of microorganisms is possible by plate screening methods that show clear zone around the microbial colonies in media containing insoluble mineral phosphates (tricalcium phosphate or hydroxyapatite) as sole P source. Siderophore production Siderophore production was tested qualitatively using chrome azurol S medium (CAS-medium) Antagonism assay against phytopathogenic fungi The culture of 10 isolates were streaked on the surface of CAS agar medium and incubated at room temperature for 1 to 3 days. Siderophore production was indicated by orange halos around the colonies after the incubation and this test was done in two replications. All the 10 isolates were assayed for antifungal activities against *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* by using Potato Dextrose Agar (PDA) medium. The isolates were streaked on PDA medium 3 cm in distance opposite to pathogenic fungi inoculated at the center of the medium. The barrier between isolates and fungi indicated antagonist interaction between them. Antagonist activity was investigated for 4 to 7 days after incubation at room temperature. Step-4: Incubation and Recovery Effective and Attractive PGPR Liquid Biofertilizer Formulation for both Soil & Foliar Applications Fermentation: > After getting maximum turbidity in seed flasks, transfer the culture in to sterilized 5 litre . bottles, aseptically in laminar air flow.> Ready with all the 3 types of cultures for 3 fermenters.> Prepare the 400 litres of medium in the fermenters (3 no's) and kept for sterilization at 121°C for 30 minutes at 15 lbs pressure.> After

3 fermenters> Prepare the 400 litres of medium in the fermenters (3 no's) and kept for sterilization at 121°C for 30 minutes at 15 lbs pressure.> After sterilization, get it cooled by passing the water in to the fermenters jacket.> Then inoculate the 5 litres of inoculum into the 400 litres of medium aseptically into the 500 litres capacity fermenter.o Peptone - 2.4 kgo Beef extract - 600 go Yeast extract - 600 go K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> -600go MgSO<sub>4</sub> -600go CaCl<sub>2</sub> -40go Tryptophan - 400 go Defoamer - 50 ml Distilled water - 400 literso pH - 6.8 - 7.2 (adjust with HCL and NaOH)> Keep the 80-120 rpm in the fermenter by maintaining 30 -32°C for 24- 48 hours.> After checking the count and pH, the culture is ready to transfer in to the large fermenter.> Meanwhile prepare the medium with preservatives for 4.4 KL in 3.2 liters of water in 5 KL fermenter.o Glycerol - 67.5 kgo CMC -31.5kgo Rose Bengal - 110 go Distilled water - 3200 literso pH -6.8 -7.2 (adjust with HCL and KOH) > Then kept for sterilization at 121 C for 30 minutes at 15 lb's pressure.> After sterilization, get it cooled by passing the cold water in to the fermenter jacket.> Then pass the 400 litres of culture into the large fermenter aseptically with positive pressure one by one from all the three fermenters.> Keep the 60 - 80 rpm in the 5000 litres fermenter by maintaining 30-32°C for 1 week.(total output from 5 kl is 4.4 KL)Step-5: Direct Commercial Aseptic Packaging Bottling:a. Then directly fill the 1 litre bottles with microbial culture aseptically in sterilized room for avoiding the contamination.b. Keep the bottles clean and seal the bottles with capsc. Keep 2-3 reference bottles from every batchPrecursor role in the medium:it is one of the member of amino acid groupIt is the key ingredient for the manufacturing of the plant growth hormonesGrowth promoting nature of the medium will increase 10 times by using this precursor without effecting the bacterial growth parametersPreservative role in the medium:The proposed preservatives concentrations and selective preservatives from the broad range gave the stabilityThese preservatives obviously increasing the self-life of the microorganisms without effecting the pH levelisThey are giving the viscous nature to the culture with uniform distribution of bacterial cells all over the medium Rose Bengal role in the mediumit will give effective rich color to the culture for increasing the acceptability of the farmer without effecting the microbial growth and count. PGPR compatibility study with Rose BengalData indicates its significant role in the stability of composition and microbial culture. FCI (Fertilizer Corporation of India) prescribed 10<sup>7</sup> CFU were found to be well retained up to its shelf Ufe of a year. Inventors of present invention also noticed surprisingly that other coloring agents like food grade green dye, bromothymol blue dye, Methyl red under same duration of stability term resulted in obtaining the prescribed range for PGPR culture. This provided a better for the potent liquid biofertilizer composition according to the present invention.Certain specific aspects and embodiments of the present application as explained in more detail with reference to the aforementioned examples, which are provided by way of illustration only and should not be construed as limiting the scope of the invention in any manner.