**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**Інститут (факультет )** біотехнології та екологічного контролю
**Кафедра** біотехнології і мікробіології

| **«До захисту в ЕК»** | **«До захисту допущено»** |
|---|---|
| Директор інституту (декан факультету) | Завідувач кафедри |
| _____ Наталія ГРЕГІРЧАК | _____ Віктор СТАБНІКОВ |
| (підпис) (прізвище та ініціали) | (підпис) (прізвище та ініціали) |
| «___» лютого 2024 р. | «___» лютого 2024 р. |

# КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
# НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»
на тему: Культивування *Pseudomonas fluorescens* для одержання біопрепарату для захисту рослин

Виконала: здобувачка V курсу, групи 1
КОПИШИНСЬКА Марія Петрівна _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник БУЦЕНКО Людмила Миколаївна _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Олена ГУДЗЕНКО
(прізвище та ініціали) (підпис)

Я, як здобувачка Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержувала недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 р.

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 СТАБНІКОВ_
"_30_" ___жовтня___2023 року

**ЗАВДАННЯ**
**НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

_____КОПИШИНСЬКОЇ Марії Петрівни_____
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи __Культивування *Pseudomonas fluorescens* для одержання біопрепарату для захисту рослин_____
_____
керівник роботи ___БУЦЕНКО Людмила Миколаївна, д.б.н., доц._____,
( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 6 листопада 2023 року № 915-кс
2. Строк подання здобувачем роботи___29.01.2024_____
3. Вихідні дані до роботи _біологічний агент: *Pseudomonas fluorescens*, цільовий продукт: біопрепарат для захисту рослин, геометричний об'єм ферментера 2 м$^3$.
_____
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) зробити характеристику цільового продукту, обґрунтувати вибір біологічного агента та охарактеризувати схему біотрансформації ростового субстрату, зробити техніко-економічне обґрунтування, обґрунтувати допоміжні стадії виробництва, розробити апаратурну та технологічні схеми виробництва, скласти специфікацію обладнання, описати технологічну схему, розробити заходи із контролю виробництва та охорони довкілля._____

5. Перелік графічного матеріалу
апаратурна схема, технологічна схема_____

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання____30 жовтня 2023 року_____

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

| № | Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи | Строк виконання етапів роботи | Примітка |
|---|---|---|---|
| 1 | Скласти характеристику цільового продукту | 30.10.2023 - 05.11.2023 | |
| 2 | Обґрунтувати вибір та здійснити характеристику біологічного агента | 06.11.2023 - 19.11.2023 | |
| 3 | Виконати техніко-економічне обґрунтування | 20.11.2023 - 03.12.2023 | |
| 4 | Скласти схему біотрансформації ростового субстрату у біологічного агента | 04.12.2023 - 10.12.2023 | |
| 5 | Обґрунтувати вибір допоміжних стадій виробництва | 11.12.2023 - 17.12.2023 | |
| 6 | Розробити апаратурну схему виробництва | 18.12.2023 - 21.12.2023 | |
| 7 | Розробити технологічну схему виробництва | 22.12.2023 - 26.12.2023 | |
| 8 | Скласти специфікацію обладнання | 27.12.2023 - 28.12.2023 | |
| 9 | Описати технологічну схему | 29.12.2023 - 07.01.2024 | |
| 10 | Здійснити вибір заходів із контролю виробництва | 08.01.2024 - 14.01.2024 | |
| 11 | Здійснити вибір заходів із охорони довкілля | 15.01.2024 - 17.01.2024 | |
| 12 | Оформити кваліфікаційну роботу та всю супровідну документацію згідно вимог | 18.01.2024 - 22.01.2024 | |

**Здобувач** _____ __Марія КОПИШИНСЬКА____
(підпис) (ім'я та прізвище)

**Керівник роботи** _____ __Людмила БУЦЕНКО___
(підпис) (ім'я та прізвище)

# РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці ділянки культивування *Pseudomonas fluorescens*, що використовуватиметься як бактеріальний біопрепарат для захисту рослин. Робота складається зі вступу, 9 розділів, висновків, графічної частини (технологічної та апаратурної схем), списку використаної літератури з 39 найменувань та додатків. Загальний обсяг роботи – 84 сторінки, 6 рисунків, 13 таблиць, 3 креслення формату А1.

У першому розділі кваліфікаційної роботи наводиться характеристика готової продукції — біопрепарату для захисту рослин на основі *Pseudomonas fluorescens*. У другому та третьому розділах обґрунтовується вибір штаму *Pseudomonas fluorescens* та наводиться схема біотрансформації ростового субстрату. У четвертому розділі проводиться техніко-економічне обґрунтування виробництва з точки зору потреб у біопрепараті. У п’ятому розділі обґрунтовується проведення допоміжних стадій, зокрема підготовки повітря, поживного середовища та вибір мийних засобів. Шостий розділ містить специфікацію виробничого обладнання. У сьомому розділі проводиться постадійний опис технологічної схеми виробництва. У восьмому розділі визначаються основні методи контролю виробництва та складається карта контролю, яка включає критичні точки та параметри, які мають контролюватися. Дев’ятий розділ визначає заходи із охорони довкілля та поводження із відходами.

**Ключові слова:** *Pseudomonas fluorescens*, біопрепарат, захист рослин, ризосфера, біотехнологія.

**ЗМІСТ**

ВСТУП……7
1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ……...9
1.1. Біологічна активність *Pseudomonas fluorescens* у захисті рослин……..……9
1.2. Захист різних груп рослин з використанням біопрепарату *Pseudomonas fluorescen*……..10
1.3. Стандартизація біопрепарату……13
1.4. Способи застосування біопрепаратів на основі *Pseudomonas fluorescens* для обробки рослин……..14
2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА……...18
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування……..….18
2.2. Визначення складу поживного середовища……..22
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента……..23
2.4. Таксономічний статус біологічного агента……27
РОЗДІЛ 3. БІОТРАНСФОРМАЦІЯ ТА ШЛЯХИ КАТАБОЛІЗМУ РОСТОВОГО СУБСТРАТУ У БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА……..28
4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ……30
4.1. Потреба у цільовому продукті……30
4.2. Розрахунок потужності виробництва……...33
4.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і геометричного об’єму ферментера……35
4.4. Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу..36
5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА..38
5.1. Обгрунтування способу культивування і типу ферментера……...38
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря……..40

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів……..42
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища……..44
6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ……45
7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ……..48
8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА……..61
8.1. Карта постадійного контролю……61
8.2. Мікробіологічний контроль……67
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту……..69
РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ……72
9.1. Актуальність знешкодження відходів на виробництві……72
9.2. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів……73
9.3. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва……..…75
ВИСНОВКИ……..79
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ……..…80
ДОДАТКИ……..…85

# ВСТУП

**Актуальність.** Застосування хімікатів у сільському господарстві впливає на ґрунтове середовище, родючість ґрунту та виникнення стійкості патогенів до пестицидів. Тому існує необхідність пошуку альтернативи хімічному захисту в сільському господарстві. Біологічний контроль є потенційним нехімічним засобом боротьби з хворобами рослин, який зменшує шкідливі наслідки паразитів або патогенів шляхом використання інших організмів. Захисні механізми рослини можуть бути систематично активовані під впливом штамів ризобактерій, що стимулюють ріст рослин інгібування рослинних патогенів. Серед таких бактерій *Pseudomonas fluorescens* є найбільш використовуваними бактеріями для захисту рослин та підвищення їх врожайності шляхом забезпечення доступності поживних речовин для рослин та антагонізм із шкідливим бактеріями. В Україні використання біодобрив як альтернативи пестицидам зараз починає активно розвиватися, але доступність біопрепаратів для захисту рослин залишається обмеженою, що обумовлює актуальність розробки нових засобів. Створення біопрепаратів на основі бактерій *Pseudomonas fluorescens*, які можна буде використовувати для захисту рослин від патогенів та шкідників, зможе зробити свій внесок у вирішення проблеми використання пестицидів на національному рівні.

**Метою** кваліфікаційної роботи є розробка технології культивування бактерій *Pseudomonas fluorescens* для їх подальшого використання у складі біопрепаратів для захисту рослин.

**Об'єктом** кваліфікаційної роботи є біопрепарат на основі *Pseudomonas fluorescens.*

**Предметом** кваліфікаційної роботи є технологія виробничого культивування бактерій для отримання відповідного біопрепарату.

**Завдання дослідження.** Для досягнення мети роботи були поставлені та виконувались наступні завдання:

- проводився аналіз останніх досліджень за темою роботи;
- проводився аналіз ринку та визначалась потреба у цільовому продукті;
- розраховувався необхідний обсяг виробництва за культуральною рідиною, здійснювався підбір основного обладнання;
- визначались потреби у компонентах поживного середовища;
- складався опис технологічної схеми виробництва, включаючи стадії підготовки повітря, поживного середовища, посівного матеріалу та власне проведення виробничого культивування;
- визначалась критичні точки та параметри контролю виробництва;
- розроблювалась технологічна та апаратурна схеми у складі графічної частини проекту.

**Методи дослідження.** Під час виконання кваліфікаційної роботи були використані наступні методи наукового пізнання: аналіз, синтез, порівняння, планування, проектування, розрахунковий та графічний методи.

**Наукова новизна та практичне значення.** У кваліфікаційній роботі було розроблено біотехнологію виробництва нового препарату для захисту рослин на основі *Pseudomonas fluorescens*, яка може бути реалізована на практиці. Розроблені проєктні рішення можуть лягти в основу при створення майбутнього діючого виробництва цього біопрепарату.

# РОЗДІЛ 1
# ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

## 1.1. Біологічна активність *Pseudomonas fluorescens* у захисті рослинн

Бактерії, які вступають у симбіоз з рослинами, покращуючи доступність для рослин мінеральних компонентів та стимулюючи їх ріст, є надзвичайно важливими для забезпечення високою урожайності. Крім того, біологічний контроль за допомогою природних непатогенних антагоністичних мікроорганізмів вважається екологічно безпечною та стійкою альтернативою використанню синтетичних хімічних фунгіцидів, особливо для боротьби з хворобами, що передаються через ґрунт [1-3].

Використовують різні ризосферні бактерії-стимулятори росту рослин, серед яких найбільш відомою є *Pseudomonas fluorescens.* Ця бактерія колонізує коріння багатьох видів рослин, сприяють росту рослин або зменшують шкоду від комах/патогенів. Було запропоновано три можливі механізми для пояснення сприятливих ефектів *Pseudomonas fluorescens* на рослини. Це конкуренція за виключення субстрату та ніші для патогенних мікроорганізмів, а також виробництво сидерофорів та антибіотиків [1, 2].

*Pseudomonas fluorescens* збирають поживні речовини в ризосфері через їх універсальність у рості та поглинанні поживних речовин. Ці бактерії синтезують біостимулятори та фітогормони, які включають індолоцтову кислоту, цитокініни, гібереліни та інгібітори продукції етилену [2]. *Pseudomonas fluorescens* забезпечують різні механізми для пригнічення патогенів рослин. Вони включають:

- конкуренцію за поживні речовини та простір; антибіоз шл яхом утворення антибіотиків (піррольнітрину, піоціаніну та 2,4-діацетилфлороглюцинолу);

- виробництво сидерофорів (флуоресцентного жовто-зеленого пігменту), а саме псевдобактину, який обмежує доступність заліза, необхідного для росту патогенів;
- виробництво літичних ферментів, таких як хітинази та β-1,3-глюканази, які руйнують хітин і глюкан, присутні в клітинній стінці грибів;
- деградація токсинів, що виробляється патогенами [1, 2, 4].

*Pseudomonas fluorescens* включається у складну систему ризосферних взаємодій з іншими бактеріями та рослиною, що наочно представлена на рис. 1.1.

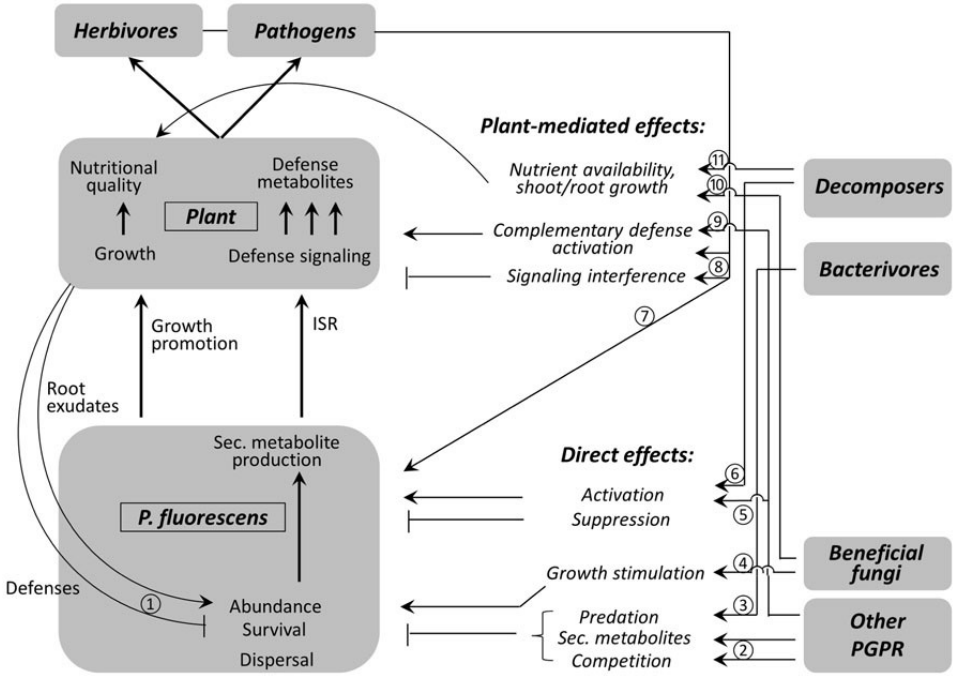


*Рис. 1.1. Система взаємодії Pseudomonas fluorescens з рослиною та іншими мікроорганізмами у ризосфері [2]*

## 1.2. Захист різних груп рослин з використанням біопрепарату *Pseudomonas fluorescens*

### 1.2.1 Зернові культури

Кількість хвороб звичайної вівсянки (*Tilletia laevis*) знижуються на 65% і 50% протягом послідовних сезонів, коли насіння пшениці та 2-тижневі проростки обробляють *P. fluorescens* 2-79r. Обробка насіння сортів рису CO 43, ADT 36 і ADT 38 за допомогою препарату *P. fluorescens* (штам Pf-1) у кількості

10 г/кг показало, що даний біопрепарат є кращим за всі інші обробки проти хвороб, викликаних *H. gracilis*. Спостерігалося максимальне заселення бактеріями та пригнічення нематод разом із збільшенням урожаю рису (13%). При обробці насіння рису препаратом *P. fluorescens* Pf1 перед посівом, після посіву та через 30 днів, також показана стійкість проростків до *X. oryzae pv. oryzae* (захворюваність знизилася з 6,8% до 1,2%). *P. fluorescens* біоваріант успішно знижує захворюваність (*Helminthosporium sativum*) на пшениці та збільшує висоту рослин і суху вагу. Показано, що *P. fluorescens* був ефективним проти *P. ultimum*, збудника кореневої гнилі сорго [1].

### 1.2.2. Бобові культури

Використання *P. fluorescens* окремо або в поєднанні з пестицидами для боротьби з комплексом хвороб в'янення голубого гороху, *H. cajani*., штам *P. fluorescens* Pf1 ефективно пригнічує ріст міцелію M. phaseolina, патогена, що викликає суху кореневу гниль. Також застосування штаму Pf1 (10 г/кг насіння) з подальшим внесенням у ґрунт (2,5 кг/га) проти кореневої гнилі ефективно підтримує більш високий ріст рослин і кращу утворення бульбочок *Rhizobium* та врожайність зерна. Проводились польові випробування у *Vigna mungo* для контролю комплексу хвороб кореневої гнилі, спричиненої *M. phaseolina* та цистоподібною нематодою *H. cajani*: в дослідженні *P. fluorescens* застосовували як обробку насіння (2 г/кг насіння), і результати показали меншу захворюваність кореневою гниллю та популяцію нематод разом із збільшенням урожаю стручків [1].

### 1.2.3. Фруктові культури

*P. fluorescens* забезпечує 60% боротьби з хворобами абрикоса (*Prunus armeniaca*) і персика (*P. persica*), інокульованих *Leucostoma cinctum*, а обробка зрізів бактеріями перед інокуляцією забезпечує кращий контроль. Застосування штамів *P. fluorescens* 558 значно зменшує антракноз у манго, викликаний *C. gloeosporioides* У солодкому апельсині (*Citrus sinensis*) і лимоні (*C. limon*) застосування препарату на основі штаму *P. fluorescens Pf1* 40 г/дерево значно сповільнює розмноження T. semipenetrans у польових випробуваннях.

Комбінація штамів *P. fluorescens* пропонується як засіб біоконтролю для боротьби з *Venturia inaequalis*, випадковим збудником парші яблунь [1].

### 1.2.4. Овочеві культури

*P. fluorescens* має високий ступінь пригнічення росту проти *A. solani* і *R. solani* томатів. *P. fluorescens* значно знижує ріст міцелію та склероціальну продукцію *S. rolfsii* (*in vitro*), збудника стеблової гнилі в томатах. Внесення в ґрунт препарату P. fluorescens ефективно контролює хворобу в'янення цвітної капусти, спричинену *F. moniliforme*. Також *P. fluorescens* WCS 365 є ефективним колонізатором коренів, коли насіння томатів інокульовано цим штамом для боротьби з кореневою гниллю, F. oxysporum f. sp. radicis-lycopersici. Виявилено, що P. fluorescens Pf 5-014 і його мутантний штам 5-214 суттєво зменшують популяцію грибів у культурах in vitro, що містять як високий, так і низький рівень інокулятів. Обприскування *P. fluorescens* на томаті сорту РКМ-1 через 48 годин після інокуляції *A. solani* зменшує ураження листя в томатах на 15–38 %. Обробка ризопланом (*P. fluorescens*), розведеним водою у співвідношенні 1:50, покращила стійкість до фузаріозної кореневої гнилі у огірків і збільшує врожайність на 8,5–16,2%. Було оцінено чотири штами *P. fluorescens* проти *P. ultimum* у гороху та виявили зниження захворюваності. Занурення коренів розсади томатів у суспензію клітин штаму B16 (109 КУО/мл) і пересадка є достатніми для пригніченням бактеріального в'янення до плодоношення. *P. fluorescens* було визнано ефективним у зниженні (54,30%) захворювання плодової гнилі чилі. Найбільшого ефекту пригнічення хвороб на картоплі має штам *P. fluorescens* B1 (37%), потім B2 (33%), тоді як урожай товарних бульб збільшився до 12% (*P. fluorescens* B1) та 6% (*P. fluorescens* B2). Також *P. fluorescens* ефективно контролює суху гниль картоплі, спричинену *Fusarium sp.*

### 1.2.5. Квіти

Рослини гвоздики, вирощені в гідропонному розчині, інокульовані *P. fluorescens*, демонструють значне зменшення кількості рослин, заражених *F.*

*oxysporum*, тоді як штам M24 забезпечує значний захист коренів *Jacaranda acutifolia* від зараження *Phytophthora cinnamomi*.

### 1.2.6. Олійні культури

Позакореневе внесення штаму *P. fluorescens* Pf1 при вирощуванні арахісу значно контролює пізню плямистість листя та іржу (*Puccinia arachidis*) в тепличних умовах. Проведено дослідження, для перевірки впливу *P. fluorescens* Pf1 на спільну інокуляцію арахісу (арахісу) для боротьби з кореневою гниллю, важким ґрунтовим захворюванням, спричиненим *M. phaseolina*. Найнижча захворюваність (23,33%) була виявлена в інокулянтах торф'яного ґрунту, за якими йшли інокуляти з фермового гною та газів гобару – 30% проти 85% у контролі. У посіві кунжуту, штам Pf1, ефективно інгібує ріст міцелію *M. phaseolina*, збудника, що викликає суху кореневу гниль у кунжуту [1].

### 1.2.7. Бавовна

У бавовнику штами *P. fluorescens* CRb 26 і CRb 39 захищають рослини від бактеріального опіку, викликаного *X. campestris pv. malvacearum*. Застосування штаму *P. fluorescens* EG 1053 забезпечує збільшення посадок рослин і зменшення симптомів хвороби розсади (спричиненої *P. ultimum* і *R. solani*) на рослинах бавовнику як у горщиковій суміші зі зміненими патогенами, так і на природно заражених бавовняних ґрунтах [1].

### 1.2.8. Гриби

Ріст патогенного для грибів *P. tolaasii* був значно зменшується при попередній колонізації препаратом *P. fluorescens.* В той же час, *P. fluorescens* M15 контролює 86,6% хвороби грибів, пов'язаної з коричневим нальотом. *Pseudomonas tolaasii* є основною причиною псування грибів. *P. fluorescens* є ефективним у зниженні захворюваності *Phyllanthus niruri R. solani* в тепличних умовах.

## 1.3. Стандартизація біопрепарату

Бактеріальний біопрепарат для захисту рослин на основі *P. fluorescens.*

Зовнішній вигляд: ліофільно висушений порошок бактеріальної маси *P. fluorescens* білого кольору у пакетах

Склад:

- Бактеріальні клітини: 0,5% мас./мас. (>9•$10^8$ КУО/г)
- Носій (тальк) 99,5% мас

Пакування готового продукту здійснюється у поліетиленові пакети, місткістю 1 кг за допомогою автоматичної машини для фасування.

Маркування упаковки передбачає позначення:

- «Україна»;
- назву підприємства, його товарний знак та адресу;
- назву препарату українською мовою та англійською (міжнародною);
- біохімічні параметри (активність, pH, температура)
- заходи безпеки
- термін зберігання
- номер серії та термін придатності;
- умови зберігання;
- маса нетто

Транспортне маркування здійснюється за ГОСТ 141-92 з нанесенням маніпуляційного знаку «Оберігати від вологи» і наступних позначень:

- товарний знак, назва підприємства-виробника, його адреса і місце виготовлення;
- назва продукту;
- дата виготовлення;
- номер партії (серії);
- умови зберігання;
- термін придатності;
- кількість пакувальних одиниць
- ферментативна активність;

- маса нетто кожної пакувальної одиниці в г або кг;
- позначення технічних умов.

Транспортування відбувається згідно з ДСТУ 4457:2005 у закритих транспортних засобах згідно до санітарних вимог і правил, що діють для даного виду транспорту.

Зберігання відбувається згідно з ДСТУ 4457:2005 у сухих чистих і добре вентильованих, захищених від прямих сонячних променів складських приміщеннях при температурі від +2°С до +15°С. Термін придатності – 6 місяців від дати виготовлення.

## 1.4. Способи застосування біопрепаратів на основі *Pseudomonas fluorescens* для обробки рослин

### 1.4.1. Препарат *P. fluorescens* 0,5% порошок (Штам TNAU)

*Плямистість листя земляного горіха (Cercospora arachidicola та Cercospora personata)*

Обробка насіння: змішують 10 г/кг насіння з необхідною кількістю порошку *P. fluorescens* 0,5% і забезпечують рівномірне покриття. Просушують в тіні і сіють насіння.

Обробка грунту: рівномірно розподіляють 1 кг порошку *P. fluorescens* 0,5% на 1 га.

Позакореневе обприскування: обприскують порошком *P. fluorescens* 0,5% 1 кг/га.

*Листя рису (Magnaporthe grisea (T.T. Hebert) M.E. Barr (=Pyricularia oryzae)*

Обробка насіння: змішують 10 г/кг насіння з необхідною кількістю порошку *P. fluorescens* 0,5%.

Обробка грунту: розкидають 1 кг порошку *P. fluorescens* 0,5% шляхом змішування з 2,5 кг органічного гною на 1 га площі.

Позакореневе обприскування: обприскують порошком *P. fluorescens* 0,5% 1 кг/га.

*Розсада чилі (Pythium aphanidermatum)*

Обробка насіння: змішують 10 г/кг насіння з необхідною кількістю порошку *P. fluorescens* 0,5% і забезпечують рівномірне покриття. Притінюють і сіять.

*В'янення томатів (Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici)*

Обробка насіння: змішують 10 г/кг насіння з необхідною кількістю порошку *P. fluorescens* 0,5% і забезпечують рівномірне покриття; притінюють підсушують і сіять.

Обробка грунту: рівномірно розподіляють 2,5 кг порошку *P. fluorescens* 0,5% на 1 га.

### 1.4.2. Препарат *P. fluorescens* 1,0% порошок (IPL/PS-01)

*В'янення томатів (Fusarium oxyporum f. sp. lycopersici)*

Обробка насіння: роблять тонку пасту з необхідної кількості порошку *P. fluorescens* 1,0% при 5 г/кг насіння з мінімальним об'ємом води та рівномірно покривають насіння. Перед посівом підсушують в тіні.

*Зникнення томатів (Pythium aphandidermatum)*

Обробка насіння: змішують 2,5 кг порошку *P. fluorescens* 1,0% з 62,5 кг FYM і рівномірно розсипають на 1 га.

*Коренева гниль томатів (Rhizoctonia spp.)*

Коренева обробка розсади: змішують 10 г порошку *P. fluorescens* 1,0% в 1 л води та занурте коріння розсади томатів мінімум на 30 хв.

### 1.4.3. Препарат *P. fluorescens* 1,0% порошок (штам № IIHR-PF-2)

*В'янення томатів (Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici)*

Обробка насіння та ґрунту: обробляють насіння порошком *P. fluorescens* 1% у дозі 20 г/кг насіння або обробляють грядки порошком *P. fluorescens* 1% у дозі 50 г/м$^2$ та застосовують порошок *P. fluorescens* 1% у дозі 5 кг/га, збагачений FYM у кількості 5 т /га в грунт перед висадкою

*Коренева гниль моркви (Sclerotium rolfsi)*

Обробка насіння та ґрунту: обробляють насіння порошком *P. fluorescens* 1% у дозі 20 г/кг насіння або вносять у ґрунт порошок *P. fluorescens* 1% у дозі 5 кг/га збагаченого FYM у дозі 5 т/га перед посівом.

*Окра Вілт (Fusarium oxysporum)*

Обробка насіння та ґрунту: обробляють насіння порошком *P. fluorescens* 1% у дозі 20 г/кг насіння або вносять у ґрунт порошок *P. fluorescens* 1% у дозі 5 кг/га збагачений FYM у дозі 5 т/га перед посівом.

### 1.4.4. Препарат *P. fluorescens* 1,5% порошок (BIL-33)

*Бактеріальний опік листя (Xanthomonas campestris pv. oryzae)*

Обробка насіння: зробити пасту з необхідної кількості порошку *P. fluorescence* 1,5% при 5 г/кг насіння з мінімальним об'ємом води та рівномірно покрийте насіння та висушіть насіння в тіні безпосередньо перед показом.

*Вибух (Magnaporthe grisea) і плямистість листя (Helminthosporium oryzae)*

Обробка грунту: змішують 2,5 кг порошку *P. fluorescens* 1,5% з 50 кг FYM і рівномірно розсипають по 1 га землі через 30 днів після посадки.

### 1.4.5. Препарат *P. fluorescens* 1,75% порошок

*Сажка пшенична (Ustilago tritici)*

Обробка насіння: змішують 5 г/кг насіння з порошком *P. fluorescens* 1,75% забезпечують рівномірне покриття. Просушують в тіні і сіять насіння.

Позакореневе обприскування: змішують 5 кг порошку *P. fluorescens* 1,75% у 1000 л води та розпилюють.

# РОЗДІЛ 2
# ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

## 2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

У науковій літературі під *Pseudomonas fluorescens* часто розуміють не окремих вид бактерій, а комплекс видів псевдомонад, найбільш подібних за своїми морфологічними, фізіологічними та генетичними ознаками до *Pseudomonas fluorescens* і об'єднані у відповідний комплекс. Комплекс видів *P. fluorescens* є однією з найрізноманітніших груп у межах роду *Pseudomonas*, що складається з понад п'ятдесяти ідентифікованих видів і багатьох некласифікованих ізолятів. Члени цієї групи були ізольовані з різноманітних середовищ існування, включаючи воду, ґрунт, рослинні тканини, гриби, тварин і людей. Багато штамів *P. fluorescens*, які були виділені з рослинного середовища, описані як ризобактерії, що стимулюють ріст рослин, через їх здатність впливати на гормональний баланс рослин і покращувати придатність рослин шляхом мінімізації ефектів фітопатогенів, для яких вони становлять великий біотехнологічний інтерес. Псевдомонади також відомі тим, що використовують різноманітні органічні сполуки як джерела енергії та вуглецю, що робить їх також придатними для біоремедіації забрудненого середовища. Комплекс видів *P. fluorescens* в даний час поділяється на вісім основних підкомплексів, в яких корисні властивості та багато інших екофізіологічних ознак філогенетично розподілені [5].

На сьогоднішній день проведено чимало досліджень у напрямку оптимізації умов культивування та складу позивного середовища для різних штамів *P. fluorescens*. Таким чином, різними авторами було незалежно один від одного досягнуто високої продуктивності за біомасою бактерій. Від складу поживних середовищ, визначення їх вартості і обрахунок на цій основі економічної ефективності культивування того, чи іншого штаму дозволяє обгрунтувати вибір певного штаму.

Так, штам *P. fluorescens* Pf1 при вирощуванні на середовищі із сахарози з дріжджовим екстрактом утворює біомасу концентрацією 3,28 г/л [6]. Інший штам *P. fluorescens* UPBM при культивуванні на середовищі з мелясою у якості джерела карбону та солями амонію у якості джерел нітрогену досягає концентрації біомаси концентрацією 2,83 г/л [7]. Найбільш просте за складом поживне середовище описане у роботі [8] використовується для культивування штаму *P. fluorescens* Pf1. Середовище включає крохмаль та сульфат амонію у якості джерел карбону та нітрогену, результуюча концентрація біомаси становить 1,75 г/л.

Узагальнено інформацію про штами продуцентів, склад поживних середовищ та концентрацію біомаси подано у таблиці 2.1.

*Таблиця 2.1*

**Поживні середовища для культивування *P. fluorescens***

| Біологічний агент | Склад поживного середовища | | Тривалість культивування, год | Концентрація біомаси, г/л | Особливості процесу біосинтезу | Джерело |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Компонент | Концентрація г/л | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| *P. fluorescens Pf1* | Сахароза | 8,0 | 24 год | 3,28 | pH = 7,2, глибинне культивування в біореакторі | [6] |
| | Дріжджовий екстракт | 3,0 | | | | |
| | K2HPO4 | 2,0 | | | | |
| | MgSO4*7H2O | 1,5 | | | | |

*Продовження табл. 2.1*

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *P. fluorescens UPBM* | Меляса | 10,0 | 24 год | 2,83 | 30 С аерація = 1,5 л/хв, обертання мішалки 500 об/хв | [7] |
| | K2HPO4 | 8,3 | | | | |
| | KH2PO4 | 8,0 | | | | |
| | Na2HPO4 | 4,2 | | | | |
| | (NH4)2SO4 | 0,8 | | | | |
| | NH4Cl | 0,1 | | | | |
| | MgSO4*7H2O | 0,02 | | | | |
| | CaCl2*2H2O | 0,02 | | | | |
| *P.fluorescens Pf1* | Крохмаль | 8,0 | 84 | 1,75 | 30 С pH=7,0 | [8] |
| | (NH4)2SO4 | 1,5 | | | | |
| | K2HPO4 | 5,8 | | | | |
| | KH2PO4 | 3,7 | | | | |
| | MgSO4*7H2O | 0,4 | | | | |

Проведемо економічні розрахунки вартості одного літру поживних середовищ (табл. 2.2), щоб дійти до висновку культивування якого із бактеріальних штамів є найдешевшим.

*Таблиця 2.2*

**Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів**

| Біологічний агент | Компонент ПС | Концентрація компоненту в ПС, г/л | Ціна компоненту грн/кг | Вартість компоненту на 1 л ПС | Джерело |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| *P. fluorescens Pf1* | Сахароза | 8,0 | 33,5 | 0,268 | 1 |
| | Дріжджовий екстракт | 3,0 | 304 | 0,912 | 2 |
| | K2HPO4 | 2,0 | 150 | 0,300 | 3 |
| | MgSO4*7H2O | 1,5 | 24 | 0,036 | 4 |
| | Вартість літра поживного середовища | | | 1,52 | |

*Продовження табл. 2.2*

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| *P. fluorescens UPBM* | Меляса | 10,0 | 25 | 0,2500 | 1 |
| | K2HPO4 | 8,3 | 150 | 1,2450 | 3 |
| | KH2PO4 | 8,0 | 96 | 0,7680 | 3 |
| | Na2HPO4 | 4,2 | 123 | 0,5166 | 1 |
| | (NH4)2SO4 | 0,8 | 31 | 0,0248 | 1 |
| | NH4Cl | 0,1 | 32 | 0,0032 | 1 |
| | MgSO4*7H2O | 0,02 | 24 | 0,0005 | 4 |
| | CaCl2*2H2O | 0,02 | 62 | 0,0012 | 1 |
| | Вартість літра поживного середовища | | | 2,81 | |
| *P.fluorescens Pf1* | Крохмаль | 8,0 | 51 | 0,41 | 1 |
| | (NH4)2SO4 | 1,5 | 31 | 0,05 | 1 |
| | K2HPO4 | 5,8 | 150 | 0,87 | 3 |
| | KH2PO4 | 3,7 | 96 | 0,36 | 3 |
| | MgSO4*7H2O | 0,4 | 24 | 0,01 | 4 |
| | Вартість літра поживного середовища | | | 1,69 | |

**Примітка**: 1 — http://prom.ua, 2 — https://www.made-in-china.com, 3 — http://agar.com.ua, 4 — https://chemtest.com.ua/

Найбільша вартість поживного середовища 2,81 грн/л для культивування штаму *P. fluorescens* UPBM, але при культивування на відповідному середовищі продуктивність за біомасою становить 3,28 г/л, що є достатньо високим показником. З іншого боку, дешевшими є два різних за складом середовища для культивування штаму *P. fluorescens* Pf1. Щоб остаточно зробити вибір на користь того чи іншого штаму необхідно також розрахувати, яка ціна припадає на одиницю біомаси, яка утворюється під час культивування (табл. 2.3).

*Таблиця 2.3*

**Умовна вартість 1 г біомаси *P. fluorescens* при культивуванні на різних середовищах**

| Біологічний агент | Концентрація біомаси, г/л | Вартість 1 л ПС | Умовна вартість 1 г біомаси |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 5 | 6 |
| *P. fluorescens Pf1* | 1,52 | 3,57 | 0,4258 |
| *P. fluorescens UPBM* | 2,83 | 2,81 | 0,9900 |
| *P. fluorescens Pf1* | 1,75 | 1,69 | 0,9700 |

Можна зробити висновок, що найменша вартість за одиницю біомаси припадає на штам *P. fluorescens* Pf1 за умови його культивування на середовищі із сахарози, дріжджового екстракту та мінеральних солей. Варто зазначити, що за даних умов культивування досягається одночасно максимальна продуктивність та найнижча вартість культивування. Цей штам та відповідний склад поживного середовища [2] вважатимемо обґрунтованим для проведення виробничого культивування.

### 2.2. Визначення складу поживного середовища

Вибір складу поживного середовища обумовлений вибором штаму продуцента *P. fluorescens* Pf1, та відповідного культурального середовища.

*Таблиця 2.4*

**Склад поживного середовища**

| № з/п | Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л |
|---|---|---|
| 1 | Сахароза | 8,0 |
| 2 | Дріжджовий екстракт | 3,0 |
| 3 | $K_2HPO_4$ | 2,0 |
| 4 | $MgSO_4*7H_2O$ | 1,5 |

У наведеному поживному середовищі сахароза є основним джерелом карбону та забезпечує енергетичний обмін; амоній сульфат є основним джерелом азоту; також присутні мінеральні солі.

### 2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

*Pseudomonas fluorescens* — облігатно аеробна бактерія [9], яка мешкає у водоймах, ґрунті, деяких продуктах, рослинах і т.д. Мікроскопічні характеристики після забарвлення фіолетовим показують, що *P. fluorescens* має пряму або радше вигнуту форму стрижня з 3 або 4 джгутиками. Бактерія відноситься до лофотрих, полярні короткі або довгі джгутики забезпечують її рухливість. При обробці 3% KOH бактерія характеризується як грамнегативна.

Рис. 2.1. Морфологія *Pseudomonas fluorescens*

Досліджені культуральні характеристики, включаючи ріст, колір, форму та зовнішній вигляд колонії. Зовнішній вигляд колонії, вирощеної на поживному агарі та середовищі Кінга В протягом 3 днів при кімнатній температурі відрізняються. На поживному агарі утворювалася колонія *P. fluorescens* білого кольору з рівним краєм і опуклою поверхнею. Молоді колонії на поживному агарі були круглими, опуклими, цілими, маслянистими, блискучими, майже непрозорими та блідо-жовтими з затемненими центрами. Коли колонію спостерігають під сонячним світлом, навколо зростання колонії з'являвся невеликий флуоресцентний зеленувато-жовтий колір. Зеленувато-жовтий розчинний пігмент дифундує у середовище. На середовищі Кінга В

зеленувато-жовте забарвлення помітно навколо кремової колонії з гладким краєм, опуклою, блискучою, цілою, круглою та флуоресцентною під сонячним світлом, яка була ширшою, ніж колонія на живильному агарі [9-10].

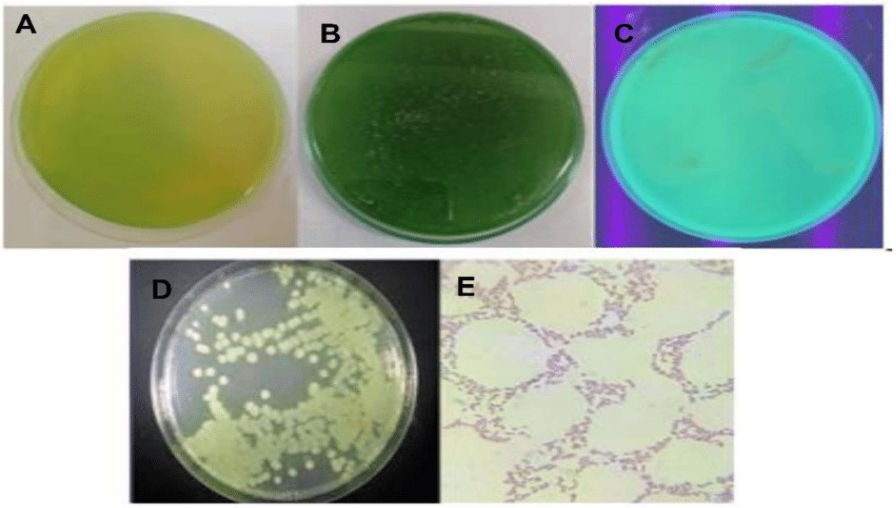


Рис. 2.2. Морфологія колонії *Pseudomonas fluorescens*, після росту на: (A) агаризованому середовищі, (B) середовищі Кінша B, (C) під ультрафіолетовим світлом, (D) штрихова культура на агаризованому середовищі (E) зображення під мікроскопом (100×) на пластині з поживним агаром [11]

Основі фізіологічні ознаки *P. fluorescens* зведено у таблиці 2.5

*Таблиця 2.5*

**Фізіологічні ознаки *Pseudomonas fluorescens* [9]**

| Фізіологічний параметр | Значення |
|---|---|
| 1. Діапазон температур для зростання | 15-35°C |
| 2. Оптимальна температура | 30-35°C |
| 3. Діапазон pH для росту | 5-8 |
| 4. Оптимальний pH | 7-8 |
| 5. Солюбілізація фосфату | + |
| 6. Денітрифікація | + |
| 7. Нітрифікація | + |
| 8. Амоніфікація | + |
| 9. Засвоєння джерела вуглецю: | |
| a. Гістидин | *** |
| b. Глюкоза | * |
| c. β-аланін | *** |
| d. сорбіт | ** |

Примітка: + позитивний тест; * помірно, ** добре, *** дуже добре

Діапазон як температури (15-35°C), так і pH (5-8) для росту *P. fluorescens* є достатньо широким, хоча спостерігається різниця в рості, зумовлена каламутністю та щільністю бактеріальної суспензії. Швидкий ріст при високих рівнях pH пояснюється толерантністю мікроорганізму до лужності, Ріст бактерії повністю інгібується при температурі 10 і 41 °C або pH=4,5 і є знижений при температурі 20 °C і pH=5,0.

*P. fluorescens* може добре рости як у нітритному середовищі, так і в амонійному середовищі зі зміною кольору на рожевий і запахом аміаку після додавання в середовище реактиву Несслера. Зростання колонії спостерігалося також на середовищі, доповненому різними компонентами: гістидином, глюкозою, сорбітом, β-аланіном, L-аргініном, L-гістидином, L-валіном, бетаїном, саркозином. Ацетамід не використовує.

Біохімічні ознаки *P. fluorescens* зведено у таблицю 2.6.

*Таблиця 2.6*

**Біохімічні ознаки *Pseudomonas fluorescens* [12]**

| Фізіологічний параметр | Значення |
|---|---|
| 1. Гідроліз крохмалю | + |
| 2. Ліполіз | - |
| 3. Продукція | - |
| 4. ДНКази | + |
| 5. Хітіназа | + |
| 6. Протеаза | + |
| 7. Гідроліз желатину | + |
| 8. Сидерофор | + |
| 9. Антибіотик | + |
| 10. Целюлаза | + |

Про позитивний результат тесту на гідроліз крохмалю свідчить прозора зона навколо колонії бактерій. Зона показала, що крохмаль у середовищі може бути гідролізований через ферментативну реакцію, тобто амілазу, що виділяється бактерією. Здатність *P. fluorescens* гідролізувати крохмаль є специфічною ознакою більшості грамнегативних бактерій.

Тест на активність ліполізу є негативним. Чіткої зони навколо росту бактеріальної колонії не має. *P. fluorescens* не може накопичувати Tween 80 і утворювати фермент ліпазу.

Результат тесту на ДНК-азу негативний. Це означає, що *P. fluorescens* не може продукувати ДНКазу, тобто ця бактерія не може розщепити ДНК.

Результат хітиназної проби є позитивним. *P. fluorescens* може виробляти хітиназу, про що свідчить чітка зона навколо росту бактеріальної колонії. Хітиназа відіграє роль у боротьбі зі шкідниками та хворобами рослин, які в основному складаються з хітинового компонента їхньої клітинної стінки, наприклад грибів і ракоподібних

Позитивний результат тесту на протеазу після 24-годинного спостереження вказує на те, що *P. fluorescens* може продукувати протеазу. Протеаза *P. fluorescens* відіграє важливу роль у колонізації коренів утворення ризосфери.

Результат тесту на целулазу є позитивним, що продемонструвало чітко зону навколо росту колонії бактерій, хоча вона була меншою, ніж протеаза та хітиназа. Активність целюлази є меншою, ніж хітинази та протеази. *P. fluorescens* за рахунок цього фермента має здатність розщеплювати целюлозу. Сидерофор

Результат тесту на сидерофор є позитивним, про що свідчить флуоресцентне забарвлення в результаті зв’язування іона Fe. *P. fluorescens* може утворювати сидерохроми (залізозв’язуючі пігмени), тобто ферибактин і піовердин із середовищ, доповнених цитратом та ЕДТА. Здатність *P. fluorescens* може не тільки зв'язувати іон Fe, але й інші іони, коли виникають несприятливі умови.

*P. fluorescens* може виробляти антибіотичні речовини, які пригнічують патогенний грибок *Fusarium sp*. Дані спостережень показали, що *Fusarium sp.* у всіх чашках Петри, вирощених разом з *P. fluorescens* не зростав. Речовиною антибіотика є фенольна сполука 2,4-діацетилфлороглюцинол.

*P. fluorescens* може утворювати індол-3-оцтову кислоту за наявності триптофану і $FeCl_3$ у поживному середовищі. Індол-3-оцтова кислота є важливим ауксином, що стимулює ріст рослин.

Тест на гідроліз желатину є позитивним. Ізолят *P. fluorescens* міг продукувати желатиназний енксім у агаризованому середовищі з додаванням желатинового субстрату в кількості 1%, що вказує на здатність *P. fluorescens* проявляти антагоністичну властивість по відношенню до нематод.

### 2.5. Таксономічний статус біологічного агента

Таксономічний статус *P. fluorescens* визначено відповідно до даних GBIF (Global Biodiversity Information Facility) [13]:

Царство: Бактерії

Тип: Протеобактерії

Клас: Гаммапротеобактерії

Порядок: *Pseudomonadales*

Родина: *Pseudomonadaceae*

Рід: *Pseudomonas*

Вид: *Pseudomonas fluorescens*

Штам: *Pseudomonas fluorescens* Pf1

# РОЗДІЛ 4
# БІОТРАНСФОРМАЦІЯ ТА ШЛЯХИ КАТАБОЛІЗМУ РОСТОВОГО СУБСТРАТУ У БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

*Pseudomonas fluorescens* має гнучкий метаболізм і здатна використовувати широкий спектр субстратів у якості джерел вуглецю та азоту. Катаболізм ростових субстратів відбувається за участю різних метаболічних шляхів, включаючи гліколіз, пентозофосфаьний шлях, цитратний цикл тощо. Схема біотрансформації ростового субстрату визначена на основі даних Kegg Pathway Maps [14].

Спочатку ростовий субстрат (у даному випадку сахароза) гідролізується до D-глюкози, яка далі фосфорилюється гексокіназою (2.7.1.1) до глюкозо-1-фосфату. Глюкозо-1-фосфат перетворюється на глюкозо-6-фосфат ферментом фосфоглюкомутазою (5.4.2.2). Далі відбувається ізомерне перетворення глюкозо-6-фосфату на фруктозо-6-фосфат під дією ферменту глюкозофосфатізомерази (5.3.1.9).

На наступному етапі фруктозо-6-фосфат знову фосфорилюється під дією фосфофруктокінази-1 (2.7.1.11) з утворенням фруктозо-1,6-дифосфату. Пізніше фермент альдолаза (4.1.2.13) розщеплює фруктозо-6-фосфат на два тріозофосфати: дигідроксіацетонфосфат і гліцеральдегід-3-фосфат. Ця реакція виробляє набагато більшу частку дигідроксіацетонфосфату (96%), який швидко перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат за допомогою тріозофосфатізомерази (5.3.1.1). Після цього фермент гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (1.2.1.12) перетворює гліцеральдегід-3-фосфат в 1,3-дифосфогліцерат.

Наступний етап полягає в перетворенні 1,3-дифосфогліцерату на 3-фосфогліцерат, що каталізується фосфогліцераткіназою (2.7.2.3). Після цього фосфогліцеромутаза перетворює 3-фосфогліцерат у 2-фосфогліцерат (5.4.2.12), який потім дегідратується у фосфоенолпіруваті за допомогою ферменту енолази (4.2.1.11). Фосфоенолпіруват піддається перетворенню до пірувату за допомогою піруваткінази (2.7.1.40).

Одержаний гліколітичним шляхом піруват перетворюється піруватдегідрогенащним комплексом (піруват дегідрогеназа (1.2.4.1) та дигідроліпоїл трансацетилаза (2.3.1.12)) до ацетил-КоА, що надзодить у цитратний цикл (цикл Кребса), що разом із ланцюгом перенесення електронів забезпечує генерацію більшої частини АТФ для бактерії. Енергія використовується бактерією для росту, і таким чином збільшується кількість біомаси, що у даному випадку є цільовим продуктом.

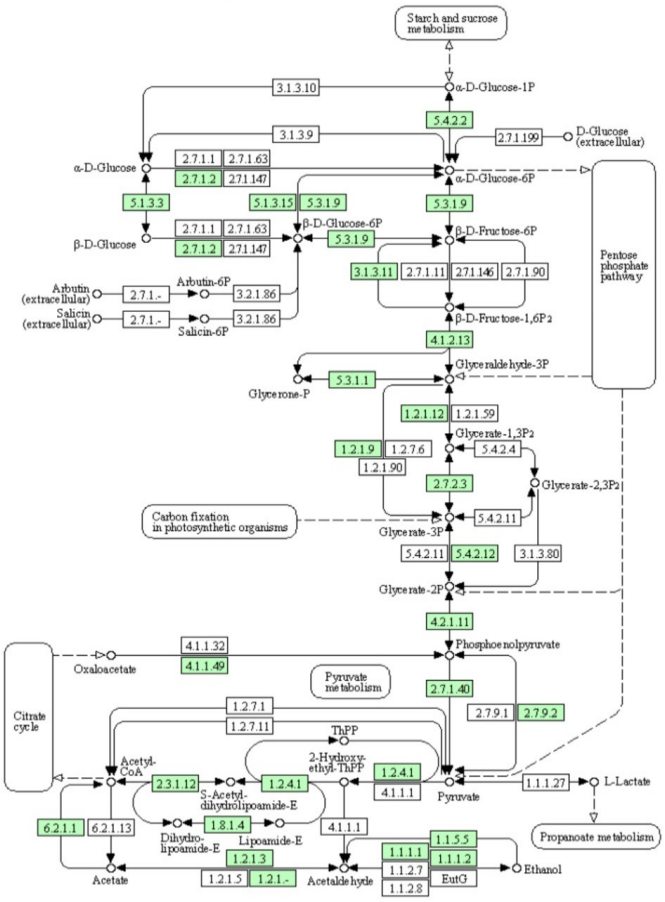


*Рис. 3.1. Схема катаболічних шляхів у P. fluorescens*

# РОЗДІЛ 4
# ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

## 4.1. Потреба у цільовому продукті

Галузь мікробних біопрепаратів для захисту рослин зростає завдяки тенденції до розширення органічного землеробства, яке спрямоване на зменшення негативного впливу на навколишнє середовище та сприяння сталому розвитку. Передбачається, що потреба в біопрепаратх буде підкріплена зростаючим потенціалом технологій органічного землеробства. Очікується, що в найближчі роки цей фактор збільшить попит на засоби захисту рослин і природні регулятори росту рослин. Прогнозується, що світовий ринок мікробних препаратів для рослин зросте з 6,00 мільярдів доларів США у 2022 році до 15,71 мільярда доларів США до 2029 року, при середньорічному темпі зростання 14,74% у прогнозований період [15].

Встановлено, що синтетичні пестициди та добрива шкідливо впливають на довкілля та здоров'я людей. Через значну екологічну шкоду, яку завдають синтетичні добрива, робиться багато ініціатив щодо вдосконалення методів управління фермами. За даними ООН та Продовольчої та сільськогосподарської організації, синтетичні добрива спричиняють 13% усіх викидів парникових газів (ПГ) у сільському господарстві. Відомі компанії та інші урядові та неурядові організації сприяють сталим сільськогосподарським методам, пропонуючи фінансову допомогу та субсидії для сільськогосподарських мікробів, які є важливими для таких методів. Таким чином, цей фактор сприяє росту ринку мікробних біопрепаратів [16, 17].

Використання бактерій для захисту рослин має певні переваги, включаючи покращену врожайність, поглинання поживних речовин і органічне землеробство.

Потреба в сталому сільському господарстві зростає, і в усьому світі збільшення населення підживлює цю тенденцію. До 2050 року, за прогнозами FAO, на планеті буде 9 мільярдів людей, що збільшуватиме потребу в продуктах харчування для підтримки зростаючого населення. Крім того, використання мікробних продуктів обумовлено громадськими занепокоєннями щодо безпеки харчових продуктів і навколишнього середовища. Необхідність інтенсифікації сільськогосподарських культур, здатність підвищувати врожайність, дотримуючись все більш стійких практик, пошук біологічних замінників для збільшення виробництва при меншому навантаженні на навколишнє середовище, або додавання інтегрованих практик для усунення розриву врожайності є деякими додатковими факторами підвищення попиту на мікроорганізми. Таким чином, очікується, що цей аспект прискорить прибуток ринку сільськогосподарських бактеріальних біопрепаратів [15].

Залежно від груп мікроорганізмів, світовий ринок біопрепаратів поділяється на бактеріальні та грибкові. Очікується, що серед них сегмент бактеріальних біопрепаратів займатиме найбільшу частку світового ринку протягом наступних років. Причина збільшення пов’язана з численними перевагами, які надають бактеріальні препарат їт, які включають підвищену доступність поживних речовин, покращену структуру ґрунту та покращення росту та здоров’я рослин. Іншою причиною зростання є легкість виробництва та розповсюдження. Бактеріальні біопрепарати містять корисні бактерії, такі як азотфіксуючі бактерії, бактерії, що солюбілізують фосфат, бактерії, що стимулюють ріст рослин, бактерії, які пригнічують рослинні патогени. Вони можуть вноситься безпосередньо в ґрунт або використовуватись для обробки насіння для покращення родючості ґрунту та росту рослин [16, 17].

Галузі із біотехнологічного виробництва біопрерараатів сегментована залежно від типу культур (зернові, олійні та бобові, фрукти, овочі та інше). Біопрепарати для обробки фруктів та овочі займали найбільшу частку сегмента у 2022 році. Через високу грошову вартість таких товарів зростає попит на високоцінні культури, зокрема фрукти та овочі. Бактеріальні біопрепарати

допомагають забезпечувати захист цих культур і покращувати засвоєння найважливіших поживних речовин. Очікується, що зростання попиту на органічні фрукти та овочі стимулюватиме використання бактерій у сільському господарстві. Мікробні препарати також є значно більш економічно ефективними, якщо їх використовувати для вирощування фруктів і овочів. Очікується, що протягом прогнозованого періоду цей фактор збільшить попит [16].

За регіонами дослідження ринків Північної Америки, Європи, Азіатсько-Тихоокеанського регіону та решти світу вказує на те, що серед країн із найбільшим попитом на біопрепарати для захисту рослин є США, Канада, Німеччина, Франція, Великобританія, Італія, Іспанія, Китай, Японія, Індія, Австралія, Південна Корея та Бразилія. Північноамериканський ринок біопрепаратів у 2022 році становив 2,65 мільярда доларів США, і очікується, що протягом досліджуваного періоду спостерігатиметься значний темп приросту. Це пояснюється тим, що фермери Північної Америки все більше усвідомлюють переваги бактерій для навколишнього середовища, а також тому, що методи органічного землеробства стають все більш популярними [15].

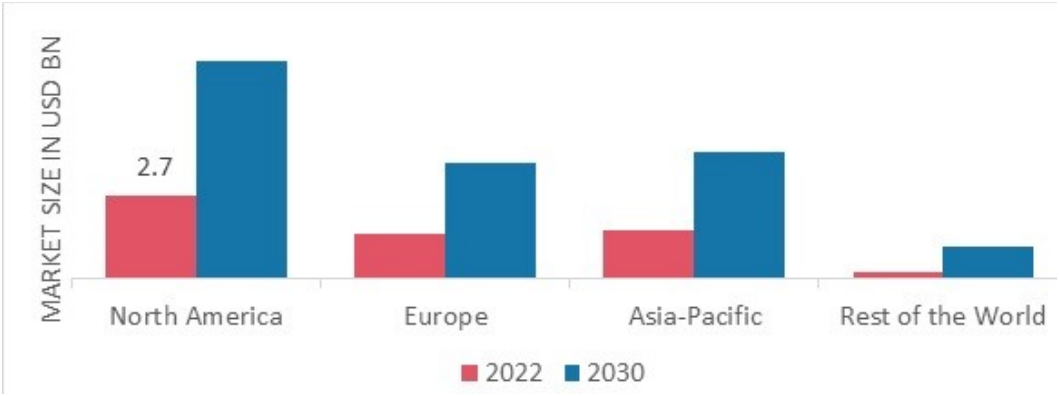


Рис. 4.1. Розмір ринку біопрепаратів у різних регіонах світу [15]

Очікується, що протягом прогнозованого періоду європейський ринок біопрепаратів займатиме друге місце за величиною частки ринку. Мікробні препарати зараз у центрі уваги через суворі обмеження та негативний вплив синтетичних хімікатів, які, за прогнозами, сприятимуть розвитку ринку. Використання біопестицидів і біодобрив зросло, оскільки органічне землеробство швидко поширилося в Німеччині, Італії, Данії та Іспанії. Крім

того, ринок сільськогосподарських мікробів у Німеччині займає найбільшу частку ринку, а ринок біопрепаратів у Великобританії був ринком, що найшвидше зростав у Європейському регіоні [15].

Загальне розширення ринку сільськогосподарських мікроорганізмів в Азіатсько-Тихоокеанському регіоні підтримується зростаючими знаннями регіону про переваги засобів захисту рослин на основі мікроорганізмів та їхню здатність підвищувати родючість ґрунту. Індія та Китай значною мірою покладаються на сільське господарство, на яке припадає значна частина їхнього ВВП. Ці країни також почали приділяти більший пріоритет збереженню та відновленню навколишнього середовища, що спонукало до використання сільськогосподарських мікробів. Ринок біопрепаратів Китаю займає найбільшу частку ринку, а ринок сільськогосподарських мікробів Індії є ринком, що найшвидше розвивався в Азіатсько-Тихоокеанському регіоні [15].

Таким чином, на сьогоднішній день існують сприятливі умови для розвитку біотехнологічних підприємств із виробництва бактеріальних біопрепаратів для захисту рослин. Враховуючи переваги від переходу на органічне рослинництво, існують перспективи впровадження біологічних заходів захисту рослин на всіх зацікавлених суб'єктах виробництва сільськогосподарської продукції.

### 4.2. Розрахунок потужності виробництва

В Україні аграрний сектор є одним із основоположних для розвитку економіки. Використання біопрепаратів для захисту рослин в той же час не є настільки поширеним як закордоном. Задачею даного дослідження є розробка біопрепарату на основі бактерій *Pseudomonas*. Аналіз літератури показує, що біопрепарати цих бактерій найкраще показали себе при обробці овочевих культур [1-5]. В Україні виробництво цих овочевих культур є достатньо поширеним. Щоб розрахувати необхідну потужність виробництва біопрепарату, було використано дані із відкритих джерел, щодо посівних площ цих культур за попередній 2022 рік [18].

*Таблиця 4.1*

**Посівні площі окремих овочевих культур в Україні в 2022 році**

| Культура | Посівна поща |
|---|---|
| | тис. га |
| томати | 55,18 |
| капуста | 53,69 |
| огірки | 41,76 |
| морква та буряки | 70,1 |
| баклажани, перець, часник | 35,79 |
| цибуля | 46,23 |
| Сумарно | 302,75 |

Таким чином, сукупні посівні площі під овочеві культури, для використання біопрепарату на основі *Pseudomonas* є ефективним становлять 302,75 тис. га. Існує декілька шляхів використання біопрепаратів на основі *Pseudomonas*: внесення препарату у ґрунт, обробка насіння і обробка рослин. З метою одночасного повноцінного захисту рослин та створення сприятливого для росту рослин складу консорціуму бактерій у ризосфері, пропонується [1] використовувати внесення препарату шляхом обробки рослин.

За даними незалежного аналізу частка агровиробників, які використовують біопрепарати для захисту рослин постійно в Україні. Якщо у 2010 році вони складали 5 %, в той час як решта виробників віддавали переваги агрохімікатам, то у період з 2022 по 2025 рік потреба прогнозується на рівні 10% [19]. Отже, посівні площі під овочевими культурами, які потенційно будуть оброблятися біопрепаратами складатимуть:

$$302\ 750 \cdot 0{,}1 = 30\ 275 \text{ га}$$

Враховуючи можливу конкуренцію на ринку цільове покриття ринку може складати до 35 % від ринку біопрепаратів (вищі значення розглядаються вже як монополія згідно Закону України «Про захист економічної конкуренції»

[20]). Отже, максимальна площа, на якій потенційно може використовуватись розроблюваний біопрепарат становить:

$$30\ 275 \bullet 0{,}35 = 10\ 596 \text{ га}$$

Провівши аналіз наукової літератури на основі та іноземних препаратів-аналогів на основі *Pseudomonas*, було прийнято наступний склад біопрепарату: висушена бактеріальна культура – 1,0 %; карбоксиметилцелюлоза – 1,0 %; порошок тальку – 98 %. При обробці рослин у період вегетації біопрепаратом із концентрацією 1% *Pseudomonas*, середня норма внесення (у перерахунку на суху речовину) становить 2,5 кг/га. Отже, всього необхідно виробляти щонайменше біопрепарату [4-7]:

$$2{,}5 \bullet 10\ 596 = 26\ 490 \text{ кг /рік}$$

Розрахуємо, необхідну кількість культуральної рідини, яку має за рік отримувати біотехнологічне підприємство, щоб покривати потребу у біопрепараті. Приймемо наступні вихідні дані для розрахунку: концентрація бактеріальної маси (суха речовина) у біопрепараті - 1 %; вміст вологи, що видалятиметься під час сушіння біомаси - 70 %, відсоток технологічних втрат - 30 %, продуктивність утворення біомаси штаму *P. flourescens* Pf1 3,28 г/л. Розрахуємо необхідний об’єм культуральної рідини [9]:

$$V_{культ} = \frac{26490 \times 0{,}01 \times 10^3}{(1-0{,}7)(1-0{,}3) \times 3{,}28} = 384{,}6 \times 10^3 \text{ л/рік} =$$

$$= 384{,}6 \text{ м}^3\text{/рік}$$

## 4.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і геометричного об’єму ферментера

Приймемо ефективний робочий час рівним 351 днів на рік (14 днів планові технічні роботи):

Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_ц = T_ф + T_{др} = 24 + 6{,}5 = 30{,}5 \text{ (год)},$$

де $T_ф$ – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

$T_{др}$ – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів (0,5 год),

стерилізація (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (0,5 год).

Кількість циклів на рік:

$$N = \frac{351 \times 24}{30{,}5} = 276$$

Необхідний об'єм культуральної рідини на цикл становить:

$$V_{ц} = \frac{V_{культ}}{N} = \frac{384{,}6}{276} = 1{,}39 \text{ м}^3$$

Прийнявши коефіцієнт заповнення ферментера рівним 0,7, розрахуємо об'єм ферментера:

$$V = \frac{V_{ц}}{K} = \frac{1{,}39}{0{,}7} = 1{,}99 \text{ м}^3$$

Приймаємо стандартний об'єм ферментера 2,0 м$^3$ .

### 4.4. Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу

Проведемо розрахунки спираючись на наступні дані: заданий об'єм ферментера для культивування становить 2,0 м$^3$. З метою раціонального використання робочого об'єму ферментеру приймемо коефіцієнт заповнення $K_{зап}$ приймемо на рівні 0,7. При цьому для попередження піноутворення передбачається використання піногасника типу SILFOAM. Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища (робочого об'єму ферментера).

Робочий об'єм ферментера становить:

$$V_{роб} = 2 \bullet 0{,}7 = 1.4 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 1,4 м$^3$ культуральної рідини потрібно:

$$V_{роб.1} = 1{,}4 \bullet 0{,}1 = 0{,}14 \text{ м}^3 = 140 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті об'ємом 200 л з коефіцієнтом заповнення 0,7.

Для засіву посівного апарату (одержання 140 л культуральної рідини) необхідно:

$$V_{роб.2} = 140 \cdot 0,1 = 14 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування бактерій у інокуляторі об'ємом 20 л з коефіцієнтом заповнення 0,7.

14 л культуральної рідини можна одержати з використанням:

$$V_{роб.3} = 14 \cdot 0,1 = 1,4 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного одержують культивуванням бактерій у колбах на качалці.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2 $м^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,7 буде відбуватися у три етапи. Перший етап здійснюватиметься у колбах на качалці, другий — в інокуляторі 20 л, третій — в посівному апараті 200 л.

# РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

## 5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Аналіз літературних джерел показує [21-24], що різні штами *Pseudomonas fluorescens* мають найкращі показники росту за наступних умов:

- pH стерилізованого середовища 7,0-8,0.
- температура культивування 25-35 °С;
- швидкості перемішування до 500 об/хв;
- аерації ≈1,5 л/хв.

Таким чином, *P. fluorescens* найкраще зростає за умов аерації, у лужному середовищі при мезофільній температурі. Існують різні дані, щодо оптимальної тривалості культивування (від 12 до 84 год).

Виходячи із наведених даних приймемо наступні усереднині умови виробничого культивування:

час, τ=24 год;

температура, t = 39 °С;

водневий показник, pH = 7,0;

аерація, а = 1,5 л/хв;

частота обертання мішалки, ω = 300 об/хв.

У промисловій біотехнології для виробництва біомаси періодичне культивування бактерій є універсальним і вигідним підходом. З одного боку, цей підхід дозволяє повноцінно контролювати всі параметри робочого середовища (температуру, рівень pH, оксигенацію, доступність поживних речовин).

З іншого боку, періодичне культивування зменшує ризик поширення забруднення по всій виробничій системі, зберігаючи чистоту та стабільність виробленої біомаси, оскільки ферментер періодично розвантажується, що дозволяє проводити повноцінні санітарно-гігієнічні заходи. Крім того, у даному випадку необхідне забезпечити культивування в умовах великого ферментеру об’ємом 2 м$^3$, тому краща маштабованість періодичного культивування *P. fluorescens* відіграє неостаннє значення.

Виходячи з наведених вище міркувань необхідно обрати ферментер, що буде підходити для періодичного культивування і водночас дозволить підтримувати всі перелічені параметри робочого середовища для культивування бактерій *P. fluorescens*. Оптимальним вибором може бути ферментер виробництва BXBIO [25] на 2 м$^3$.

Рис. 5.1. Ферментер BXBIO на 2 м$^3$ [25]

Основні параметри ферментера [25]:

*Співвідношення діаметра та висоти:* 1: 2-3

*Метод змішування:* магнітне перемішування або механічне перемішування.

*Система контролю:* система контролю ферментації з ліцензійним програмим забезпеченням. Параметри можна налаштувати на автоматичне керування та зручно зберігати, дистанційне підключення до комп'ютера необов'язкове.

*Автономна система стерилізації:* ферментер обладнаний автоклавом.

*Система перемішування:*

- Механічна система перемішування: безступінчасте регулювання швидкості, обертів за хвилину в ферментері: 50~1000 об/хв+-0,5%.

- Магнітна система перемішування: з нижнім або верхнім приводом. Непрямий спосіб гарантувати чисте культуральне середовище для мікроорганізмів. Стабільна робота

*Виявлення та контроль температури:* ПІД-регулювання; електричне опалення водяне охолодження; діапазон: температура охолоджуючої води + 5 ~ 60 ℃;

*Виявлення та контроль pH:* 2,00~12,00+-0,02, автоматичний контроль для додавання кислоти та лугу за допомогою перистальтичного насоса, з автоматичною сигналізацією.

*Контроль подачі:* Оснащений високоякісними перистальтичними насосами для додавання матеріалів (кислот, лугів, антипіноутворювачів, культурального середовища), а подача може бути кількісною за часом.

*Антипінний контроль:* перевірено деформуючим електродом і доданим антипінним агентом за допомогою перистальтичного насоса. Автоматичне керування ПІД.

Контроль забору повітря: високоякісний роторний лічильник з ручним керуванням.

### 5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

На ефективність стерилізації повітря методом фільтрування впливає рівень забрудненості повітря, оскільки самі мікроорганізми мають розміри від 0,01 до 25 мкм, але вони осідають на частинки пилу, і ступінь уловлювання залежить від розмірів цих частинок. Вміст бактеріальних забруднень у повітрі в середньому становить 1000 - 1500 клітин в 1 $м^3$, але воно може підніматися до

104. Крім мікроорганізмів в повітрі є пил органічної та неорганічної природи, пари води.

Вибір і розрахунок системи очищення повітря проводимо з урахуванням максимальної засміченості для даної місцевості і з урахуванням того, що розміри частинок у повітрі, на яких адсорбуються мікроорганізми, коливаються від 0,5-2,0 мкм по ширині до 2-15 мкм по довжині.

Підготовка повітря складається з наступних послідовних операцій: очищення повітря від грубих механічних суспензій; видалення надлишкової вологи та мастил; тонке очищення повітря на індивідуальному фільтрі.

На стадії попереднього очищення та знепилення повітря з повітря видаляється переважна більшість великих частинок пилу розміром 5-10 мкм. Як фільтруючі матеріали у фільтрах попереднього очищення використовують багатошарові дротяні сітки, набивка зі стружок металів, з полімерних матеріалів, з грубих мінеральних і синтетичних волокон. До фільтрів цього класу відносяться масляні або вісцинові з промасленими металевими сітками. Олія сприяє осіданню частинок пилу на фільтрі та їх утримуванню. Змочуючі засоби, що використовуються у вісцинових фільтрах, можуть бути бактерицидними, і тоді мікроорганізми, що осаджуються разом з пилом, втрачають здатність розмножуватися або гинуть.

У якості фільтруючого матеріалу для грубої очистки у головних фільтрах застосовуємо волокнисті матеріали. Волокнисті фільтри є фільтрами об'ємної дії, оскільки вони розраховані на уловлювання та накопичення частинок не тільки на поверхні матеріалу, що фільтрує, але і в глибині шару. Для фільтруючого матеріалу з певним діаметром волокна характеристики очищення можна змінювати, збільшуючи щільність упаковки волокна у фільтрі або товщину шару матеріалу.

Використовуємо волокнистий повітряний фільтр класу фільтрації G3; клас очищення EN 779; робоча температура від -40° С до +70° С; ефективність очищення 54% зі стартовим опором 35-55 Па; рекомендований кінцевий опір 130 Па; товщина 4-20 мм; фільтроматеріал - поліестр [26].

Повітря потім проходить через компресор де піддається стисненню з подальшим охолодженням до точки роси, в результаті чого волога та мастильні матеріали конденсуються та видаляються з повітря. Далі повітря надходить у ресивер та теплообмінник нагрівач.

На наступних етапах повітря надходить на тонке очищення і далі на індивідуальні фільтри CFh GREENEX ECO [27], які встановлюються перед кожним ферментером для забезпечення очищення повітря від частинок діаметром 0,3 мкм на 99,999%. Специфічною вимогою, що висуваються до фільтруючих матеріалів, що застосовуються на даній стадії очищення, є необхідність їх періодичної стерилізації гострим паром разом з усім обладнанням технологічної лінії.

Фільтруючі матеріали, що використовуються на стадії тонкого очищення: тонковолокнисті матеріали у вигляді матів-пластин з об'ємною часткою волокон близько 0,1; малим гідравлічним опором (0,01-0,03 МПа).

### 5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Щоб унеможливити розвиток стійких мікроорганізмах на поверхнях приміщення та обладнання пропонується використовувати почергово різні миючі та дезінфікуючі засоби.

*Хлоргекседин біглюконат.* Утворює з водою прозорі розчини, не має запаху, стабільний. Хлоргексидину біглюконат є катіонним бігуанідом. Хлоргексидин має аміногрупи клітинних білків. Проникає у внутрішньоклітинні мембрани бактеріальних клітин, осідає на цитоплазмі і змінює функцію мембрани, перешкоджаючи споживанню кисню, що спричиняє зниження рівня аденозинтрифосфату і загибель клітин. Руйнує ДНК і порушує синтез ДНК у мікроорганізмів. Забезпечує тривалу персистентну антимікробну активність, що перешкоджає розмноженню мікроорганізмів як мінімум протягом 6 годин після застосування препарату [28].

*Перекис водню.* Завдяки своїм сильним окислювальним властивостям пероксид водню знайшов широке застосування в медицині та промисловості, де

використовується, наприклад, як дезінфікуючий та засіб та каталізатор. У біотехнологічній промисловості розчини пероксиду водню застосовуються, зокрема, для дезінфекції технологічних поверхонь обладнання [29].

*Дезінфікуючий засіб «Дезосепт Форте».* Володіє специфічним запахом оцтової кислоти. Засіб «Дезосепт Форте» добре розчиняється у воді. Водні робочі розчини засобу прозорі, безбарвні, із помірним запахом оцтової кислоти [30].

Робочі розчини засобу ефективні при холодній дезінфекції (0-20°С) і значно збільшують свою біоцидну дію при підвищенні температури до 50°С.

Розчини «Дезосепт Форте» мають мийні властивості, видаляють механічні, білкові та жирові забруднення; не фіксують органічні забруднення, швидко і добре змиваються водою, не піняться.

При дотриманні рекомендацій по використанню робочі розчини засобу «Дезосепт Форте» не пошкоджують об’єкти, які виготовлені з нержавіючої сталі, луженого заліза, алюмінію, скла, кахлю, порцеляни, фаянсу, кислотостійких полімерних матеріалів (поліетилен, поліпропілен, полівінілфторид), фторопласту (тефлон, вірон), гуми (у тому числі силіконової), скла, емалі, органічного скла, текстильних матеріалів (сирних та кремових мішочків, фільтрів та інших текстильних матеріалів, що мають контакт з харчовими продуктами), пофарбованих та деревяних поверхонь [30].

Засіб екологічно безпечний, не забруднює навколишнє середовище. Складові компоненти засобу розкладаються на воду, кисень та оцтову кислоту, сліди якої з поверхонь легко змиваються водою. Допускається скидування відпрацьованого розчину в каналізацію після розбавлення.

Засіб підходить для потреб дезінфекції на підприємствах фармацевтичної, біотехнологічної, мікробіологічної, парфюмерно-косметичної промисловості, комунального господарства, торгівлі, холодокомбінатах, холодильниках, складах, транспорті тощо.

### 5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

У обраному в пункті 2.2 поживному середовищі сахароза є основним джерелом карбону та забезпечує енергетичний обмін; дріжджовий екстракт є основним джерелом азоту; також присутні мінеральні солі.

Обране поживне середовище складається з 4 компонентів, які можна розділити на три композиції з різними умовами приготування та стерилізації:

Композиція І: сахарозу та дріжджовий екстракт розчиняють, після чого нагрівають до температури стерилізації; режим стерилізації: 112°С (0,05 МПа) впродовж 30 хв.

Композиція ІІ: мінеральну сіль - калію гідрофосфату розчиняють у воді і передають на стерилізацію; режим стерилізації: 131°С (0,15 МПа) впродовж 40–60 хв.

Композиція ІІІ: сіль магнію (магній сульфат гептагідрат) розчиняють у воді і передають на стерилізацію; режим стерилізації: 131°С (0,15 МПа) впродовж 40–60 хв.

Магній сульфат було виділено в окрему композицію, щоб уникнути утворення нерозчинних солей магній фосфату.

Після стерилізації композиції передають у ферментер для здійснення виробничого культивування.

Отже, було обґрунтовано склад поживного середовища (8,0 г/л сахарози, 3,0 г/л дріжджового екстракту, 2,0 г/л $K_2HPO_4$; 1,5 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Умови культивування: $\tau$=24 год; t = 30 °С; pH = 7,0; а = 1,5 л/хв; $\omega$ = 300 об/хв. При цьому підготовка посівного матеріалу проводиться у чотири стадії (колби на качалці, інокулятор 20 л, посівні апарати 200 л та 2 $м^3$). Підготовка поживного середовища для кожної стадії вирощування культури передбачає його розділення на три композиції з різними умовами стерилізації.

# РОЗДІЛ 6
# СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

*Таблиця 6.1*

| Позиція | Найменування | Кількість | Технічна характеристика |
|---|---|---|---|
| ПЗ-1 | Повітрязабірник | 1 | Обладнаний сіткою для видалення механічних забруднень |
| Ф-2 | Фільтр грубої очистки | 1 | G3; клас очищення EN 779; робоча температура від -40° С до +70° С; ефективність очищення 54% зі стартовим опором 35-55 Па; рекомендований кінцевий опір 130 Па; [26] |
| К-3 | Компресор | 1 | Поршневий компресор ABAC B5900B/500 FT5.5. Максимальний тиск 11 бар. Продуктивність 653 л/хв, 4 кВт [31] |
| Т-4 | Теплообмінник-охолоджувач | 1 | Теплообмінник WHE2050, тиск 25 бар, 46,5 кВт, 190 л/хв [32] |
| Р-5 | Ресивер | 1 | Ресивер РВ2000, 2 м$^3$, 10 бар [33] |
| Т-6 | Теплообмінник-нагрівач | 1 | Теплообмінник WHE2050, тиск 25 бар, 46,5 кВт, 190 л/хв [32] |
| Ф-7 | Фільтр тонкої очистки | 1 | Фільтри тонкої очистки Е=99,0 % |
| Ф-8 | Індивідуальний фільтр | 3 | Індивідуальні фільтри CFh GREENEX ECO, 0,3 мкм, Е=99,9999 % [27] |
| З-9 | Збірник для миючих та дезінфікуючих засобів | 1 | Циліндричний вертикальний збірник з плоским дном, об'єм 50 л, стійкий до корозії |
| З-10 | Збірник для змішування компонентів поживного середовища | 1 | Циліндричний вертикальний збірник з плоским дном, об'єм 15 л, нержавіюча сталі AISI 304 |
| Н-11 | Насос | 1 | Насос відцентровий. Продуктивність 10 м$^3$ год, 2,6 кВт. |

*Продовження табл. 6.1*

| | | | |
|---|---|---|---|
| І-12 | Інокулятор | 1 | Ферментер, 20 л, мішалка магнітна, з автоматичним керуванням, 2 бар, сталь AISI 310 [25] |
| Н-13 | Насос | 1 | Насос відцентровий. Продуктивність 10 $м^3$ год, 2,6 кВт. |
| З-14 | Збірник для змішування компонентів поживного середовища | 1 | Циліндричний вертикальний збірник з плоским дном, об'єм 150 л, нержавіюча сталі AISI 304 |
| Н-15 | Насос | 1 | Насос відцентровий. Продуктивність 10 $м^3$ год, 2,6 кВт. |
| З-16 | Збірник для змішування компонентів поживного середовища | 1 | Циліндричний вертикальний збірник з плоским дном, об'єм 30 л, нержавіюча сталі AISI 304 |
| Н-17 | Насос | 1 | Насос відцентровий. Продуктивність 10 $м^3$ год, 2,6 кВт. |
| З-18 | Збірник для змішування компонентів поживного середовища | 1 | Циліндричний вертикальний збірник з плоским дном, об'єм 15 л, нержавіюча сталі AISI 304 |
| Н-19 | Насос | 1 | Насос відцентровий. Продуктивність 10 $м^3$ год, 2,6 кВт. |
| ПА-20 | Посівний апарат | 1 | Ферментер, 200 л, мішалка магнітна, з автоматичним керуванням, 2 бар, сталь AISI 310 [25] |
| Н-21 | Насос | 1 | Насос відцентровий. Продуктивність 10 $м^3$ год, 2,6 кВт. |
| З-22 | Збірник для змішування компонентів поживного середовища | 2 | Циліндричний вертикальний збірник з плоским дном, об'єм 1500 л, нержавіюча сталі AISI 304 |
| Н-23 | Насос | 1 | Насос відцентровий. Продуктивність 10 $м^3$ год, 2,6 кВт. |

*Продовження табл. 6.1*

| | | | |
|---|---|---|---|
| З-24 | Збірник для змішування компонентів поживного середовища | 1 | Циліндричний вертикальний збірник з плоским дном, об'єм 300 л, нержавіюча сталі AISI 304 |
| Н-25 | Насос | 1 | Насос відцентровий. Продуктивність 10 $м^3$ год, 2,6 кВт. |
| З-26 | Збірник для змішування компонентів поживного середовища | 1 | Циліндричний вертикальний збірник з плоским дном, об'єм 150 л, нержавіюча сталі AISI 304 |
| Н-27 | Насос | 1 | Насос відцентровий. Продуктивність 10 $м^3$ год, 2,6 кВт. |
| ФР-28 | Ферментер | 1 | Ферментер, 2 000 л, мішалка магнітна, з автоматичним керуванням, 2 бар, сталь AISI 310 [25] |
| Н-29 | Насос | 1 | Насос відцентровий. Продуктивність 10 $м^3$ год, 2,6 кВт. |

# РОЗДІЛ 7
# ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема передбачає проведення допоміжних робіт (підготовка і стерилізація позивного середовища) та технологічних робіт (вирощування посівного матеріалу, виробничих біосинтез).

***ДР. 1. Санітарна підготовка виробництва***

Санітарна підготовка виробництва включає приготування миючих та дезінфікуючих засобів, підготовку приміщень та підготовку обладнання.

***ДР.1.1. Приготування миючих та дезінфікуючих засобів***

Миючі і дезінфікуючі засоби необхідно контролювати щодо мікробіологічної чистоти. Їх розчини слід тримати в попередньо очищених контейнерах й зберігати лише протягом установлених термінів.

***ДР. 1.1.1. Приготування розчину хлоргексидину біглюконату***

Для приготування розчину хлоргексидину біглюконату хлоргексидин біглюконат, масовою долею 20%, необхідно розвести в розчині етилового спирту, об'ємною долею 70%, у співвідношенні 1:40 і профільтрувати в стерильну ємність через мембранний фільтр з порами розміром 0,45 мкм. Приготований розчин хлоргексидину біглюконату можна зберігати в герметично закритій скляній ємності впродовж 1 місяцю.

***ДР. 1.1.2. Приготування розчину пероксиду водню***

Розчин готують у скляному посуді шляхом додавання пероксиду водню у воду питну. Для приготування 6%-го розчину до 820 мл води питної додають 180 мл пероксиду водню. Готовий розчин можна зберігати впродовж 5 діб.

### *ДР. 1.1.2. Приготування засобу «Дезосепт Форте»*

Для ручного та циркуляційного миття технологічного обладнання і комунікацій, скляної і полімерної тари та інвентарю використовують 0,5 % розчин миючого засобу з температурою 40±5 °С.

Для приготування 1 л 0,5%-го розчину у емальовану ємність з 995,0 $см^3$ питної води додають 0,5 г засобу. Приготований робочий розчин має бути використаний впродовж доби.

### *ДР. 1.2. Санітарна підготовка виробничих приміщень*

Підготовка виробничих приміщень – одне з найважливіших заходів щодо забезпечення чистоти і зведення до мінімуму механічних і мікробних забруднень.

Під санітарною підготовкою виробничих приміщень до роботи мається на увазі комплекс заходів, який складається з вологого прибирання, дезінфекції і УФ-опромінення стін, підлог та іншої поверхні, і досягнення відповідного класу чистоти. Підготовка виробничих приміщень поділяється на щоденну і генеральну. Прибирання виробничих приміщень слід проводити щозміни, а генеральне прибирання – один раз у 5–6 днів або негайно, на вимогу бактеріолога.

### *ДР. 1.2.1. Щоденне прибирання*

Під час прибирання застосовується 6%-вий розчин водню пероксиду, 0,5 %-вий розчин хлорогексидину біглюконату, оскільки тривале використання одного дезінфекційного засобу призводить до утворення стійких штамів мікроорганізмів. Зміна дезінфекційного засобу відбувається кожні 10–14 днів.

Щоденну санітарну обробку чистих виробничих приміщень виконують розчином перекису водню 6% або іншими дезінфектантами. Щоденна обробка проводиться після кожної зміни вологим засобом. Стіни, двері та інші поверхні приміщення протирають поролоновою губкою, змоченою робочим розчином з розрахунку 100-150 мл на 1 $м^2$ стелі. Цим же розчином миють підлогу.

### *ДР. 1.2.2. Генеральне прибирання*

При генеральній обробці виробничих чистих приміщень так само використовуються дезінфектанти з миючим засобом. Генеральну обробку проводять вологим засобом один раз у 5-6 днів. Стіни, двері. стелі, та інші поверхні зрошують з гідропульту робочим розчином з розрахунку 150–200 мл/л. Після закінчення зрошення приміщення закривають на 30–40 хвилин, після цього вилучають надлишок розчину за допомогою губки. Особливо забруднені місця додатково миють цим же розчином. Стіни, двері та інші поверхні приміщення протирають поролоновою губкою, змоченою робочим розчином, після цього цим же розчином миють підлогу.

Дезінфекція приміщень і поверхонь обладнання призводить, як правило, до зниження мікроорганізмів на 40–60 % від їх початкового вмісту.

### *ДР 1.3. Підготовка обладнання та комунікацій*

### *ДР 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій*

Під підготовкою технологічного обладнання мається на увазі миття і стерилізація з'ємних частин (вузлів) або обробка внутрішніх і зовнішніх частин дезінфікуючими засобами. З'ємні частини (вузли) обладнання, що безпосередньо контактують з поживним середовищем, посівною масою та культуральною рідиною необхідно зняти, розібрати і ретельно вимити в розчині миючого засобу 0,5% від при температурі 60 °С, після цього декілька разів обполоснути водою очищеною. Розбирання та знімання вузлів виконується спеціальним персоналом.

Внутрішні частини обладнання обробляють розчином миючого засобу при температур 60 °С, після цього декілька разів обполіскують водою очищеною. Внутрішні поверхні обладнання, що находиться у приміщеннях С, D класів чистоти обробляють водою питною, при необхідності – розчином миючого засобу 0,5% при температурі 60 °С. Фільтри, які піддаються регенерації, промивають у мильній воді з дезінфекційним засобом.

***ДР 1.3.2. Перевірка герметичності***

Після миття проводяться візуальні огляди та перевірки на наявність витоків у з'єднаннях та обладнанні. Для усунення будь-яких виявлених витоків негайно виконується підтяжка з'єднань або ремонт.

***ДР 1.3.3. Стерилізація обладнання та комунікацій***

Стерилізація виконується при температурі 120°С та тиску 0,2 МПа протягом 30 хвилин шляхом подачі гарячої пари на ферментери, фільтри та комунікації. Після закінчення стерилізації припиняють подачу пари, поступово знижують тиск в апараті шляхом відкриття патрубку відпрацьованого повітря. Знижують температуру шляхом подачі холодної води в сорочку апарату. Апарат продувають стерильним повітрям.

***ДР. 1.3. Підготовка персоналу***

***ДР.1.3.1. Навчання персоналу***

Персонал проходить комплексний інструктаж під час найму та безперервні сесії, необхідні для дотримання виробничих протоколів. Технологічний інструктаж проводиться не рідше одного разу на місяць і ретельно оформлюється в журналі. Проводяться регулярні оцінки знань персоналу, щоб забезпечити розуміння та дотримання вимог.

***ДР. 1.3.2. Санітарна підготовка персоналу***

Весь виробничий персонал перед прийняттям на роботу повинен пройти попередні медичні та бактеріологічні огляди згідно з встановленими рекомендаціями щодо обов'язкових профілактичних та медичних оглядів. Ці огляди проводяться не рідше одного разу на рік для дотримання стандартів здоров'я.

Під час участі у виробничих процесів персонал дотримується суворого режиму гігієни. За потреби руки обробляють дезінфікуючими гелями або 76 % етиловим спиртом. Верхній одяг знімають у відведених гардеробах, а персонал після миття рук переодягається у спеціальний виробничий одяг, що забезпечує гігієнічний перехід у виробниче середовище.

***ДР 2. Підготовка очищеного аераційного повітря***

***ДР. 2.1. Забір атмосферного повітря***

Атмосферне повітря збирається з висоти 10 метрів, забезпечуючи чисте джерело подалі від технологічних викидів.

***ДР. 2.2 Грубе очищення повітря***

Повітря проходить попередню очистку через фільтри грубої очистки, панельного типу з класом чистоти G3. Ці фільтри усувають великі частки, досягаючи ефективності очищення до 90%.

***ДР 2.3 Компресування***

Тиск повітря доводять до рівня від 0,4 до 0,5 МПа, викликаючи підвищення температури.

***ДР 2.4. Охолодження та видалення вологи***

Далі стиснене повітря охолоджується в теплообміннику до температури від 25°C за допомогою холодної води. Повітря надходить у ресивер для видалення вологи, стабілізуючи рівень вологості на рівні 60%.

***ДР 2.5 Підігрів повітря***

Нагрівання для запобігання утворенню конденсату: подальше нагрівання повітря до температури від 40°C допомагає запобігти утворенню конденсату на поверхнях фільтрів.

***ДР. 2.6. Тонке очищення***

Очищення продовжується через фільтри тонкої очистки CFh GREENEX ECO, діаметром 0,3 мкм. Перед ферментерами ступінь очищення повітря становить 99,9999%.

***ДР 3.1. Підготовка поживного середовища для вирощуванні інокуляту в колбах на качалках***

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 1,4 л поживного середовища. Джерелом вуглецю та азоту є сахароза та дріджовий екстракт відповідно (Композиція I), джерелом мінеральних солей є Композиція II і III. Розчинник (вода) розподілений між компонентами.

*Таблиця 7.1*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,4 л середовища**

| Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Вміст (г) у 1,4 л поживного середовища | Композиція | Об'єм композиції, л |
|---|---|---|---|---|
| Сахароза | 8,0 | 16,0 | I | 1,1 |
| Дріжджовий екстракт | 3,0 | 6,0 | | |
| $K_2HPO_4$ | 2,0 | 4,0 | II | 0,2 |
| $MgSO_4*7H_2O$ | 1,5 | 3,0 | III | 0,1 |

***ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції I***

На технічних вагах зважують 16,0 г сахарози та 6,0 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1,5 л, доливають 1,1 л дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою, підігрівають і потім стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С (тиск 0,05 МПа) упродовж 30 хв. (Кт, Км 3.1.1).

***ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції II***

На технічних вагах зважують 4,0 г калію гідрофосфату, переносять у колбу об'ємом 0,3 л, доливають 0,2 л води питної. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°С (0,15 МПа) упродовж 60 хв. (Кт, Км 3.1.2).

***ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції III***

На технічних вагах зважують 3,0 г магнію сульфату. Наважки переносять у колбу об'ємом 0,2 л, доливають 0,1 л води питної. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°С (0,15 МПа) упродовж 60 хв. (Кт, Км 3.1.3).

***ДР 3.2. Підготовка поживного середовища для вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л.***

Вміст компонентів для для отримання 14 л поживного середовища аналогічного складу наведено в табл. 7.2.

*Таблиця 7.2*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 14 л середовища**

| Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Вміст (г) у 14 л поживного середовища | Композиція | Об'єм композиції, л |
|---|---|---|---|---|
| Сахароза | 8,0 | 160,0 | I | 11,0 |
| Дріжджовий екстракт | 3,0 | 60,0 | | |
| $K_2HPO_4$ | 2,0 | 40,0 | II | 2,0 |
| $MgSO_4*7H_2O$ | 1,5 | 30,0 | III | 1,0 |

***ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції I***

На технічних вагах зважують 160 г сахарози та 60 г дріжджового екстракту. Наважку завантажують у збірник об'ємом 15 л. Відкривають вентиль подачі води питної і подають у збірник 11,0 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом 10±1 хвилин паралельно підігріваючи розчин. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,05 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 30 хв при температурі 112 °С. У рубашку апарату для зменшення енерговтрат подається глуха пара (Кт, Км 3.2.1).

***ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції II***

На технічних вагах зважують 40 г калію гідрофосфату, переносять у колбу об'ємом 3 л, доливають 2 л води питної. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°С (0,15 МПа) упродовж 60 хв. (Кт, Км 3.1.2).

### *ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції III*

На технічних вагах зважують 30 г магнію сульфату. Наважку переносять у колбу об’ємом 1,5 л, доливають 1 л води питної. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°С (0,15 МПа) упродовж 60 хв. (Кт, Км 3.2.3).

### *ДР 3.3. Підготовка поживного середовища для вирощуванні посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 200 л.*

Вміст компонентів для отримання 140 л поживного середовища аналогічного складу наведено в табл. 7.3.

*Таблиця 7.3*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 140 л середовища**

| Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Вміст (кг) у 140 л поживного середовища | Композиція | Об’єм композиції, л |
|---|---|---|---|---|
| Сахароза | 8,0 | 1,6 | I | 110 |
| Дріжджовий екстракт | 3,0 | 0,6 | | |
| $K_2HPO_4$ | 2,0 | 0,4 | II | 20 |
| $MgSO_4*7H_2O$ | 1,5 | 0,3 | III | 10 |

### *ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції I*

1,6 кг сахарози та 0,6 кг дріжджового екстракту через об'ємно-ваговий дозатор завантажують у збірник об'ємом 150 л. Відкривають вентиль подачі води питної і подають у збірник 110 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом 10±1 хвилин паралельно підігріваючи. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,05 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 30 хв

при температурі 112 °С. У рубашку апарату для зменшення енерговтрат подається глуха пара (Кт, Км 3.3.1).

***ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції II***

0,4 кг калію гідрофосфату через об'ємно-ваговий дозатор (або зваживши на технічних вагах) завантажують у збірник об'ємом 30 л. Відкривають вентиль подачі води питної і подають у збірник 20 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом 10±1 хвилин. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,15 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 60 хв при температурі 131 °С. У рубашку апарату для зменшення енерговтрат подається глуха пара (Кт, Км 3.3.2).

***ДР 3.3.3. Приготування і стерилізація композиції III***

На технічних вагах зважують 0,3 кг магній сульфату. Наважки завантажують у збірник об'ємом 15 л. Відкривають вентиль подачі води питної і подають у збірник 10 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом 10±1 хвилин паралельно підігріваючи розчин. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,15 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 60 хв при температурі 131 °С. У рубашку апарату для зменшення енерговтрат подається глуха пара (Кт, Км 3.3.3).

***ДР 3.4. Підготовка поживного середовища для виробничого культивування в ферментері об'ємом 2 м$^3$***

Вміст компонентів для для отримання 1,4 м$^3$ поживного середовища аналогічного складу наведено в табл. 7.4.

*Таблиця 7.4*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,4 м$^3$ л середовища**

| Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Вміст (кг) у 1,4 м$^3$ поживного середовища | Композиція | Об'єм композиції, м$^3$ |
|---|---|---|---|---|
| Сахароза | 8,0 | 16 | I | 1,1 |
| Дріжджовий екстракт | 3,0 | 6 | | |
| $K_2HPO_4$ | 2,0 | 4 | II | 0,2 |
| $MgSO_4*7H_2O$ | 1,5 | 3 | III | 0,1 |

***ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції I***

16 кг сахарози та 6 кг дріжджового екстракту через об'ємно-ваговий дозатор завантажують у збірник об'ємом 1,5 м$^3$. Відкривають вентиль подачі води питної і подають у збірник 1,1 м$^3$ води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом 10±1 хвилин паралельно підігріваючи розчин. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,05 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 30 хв при температурі 112 °С. У рубашку апарату для зменшення енерговтрат подається глуха пара (Кт, Км 3.4.1).

***ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції II***

4 кг калію гідрофосфату через об'ємно-ваговий дозатор (або зваживши на технічних вагах) завантажують у збірник об'ємом 300 л. Відкривають вентиль подачі води питної і подають у збірник 200 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом 10±1 хвилин. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,15 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 60 хв при

температурі 131 °С. У рубашку апарату для зменшення енерговтрат подається глуха пара (Кт, Км 3.4.2).

***ДР 3.4.3. Приготування і стерилізація композиції ІІІ***

На технічних вагах зважують 3 кг магній сульфату. Наважки завантажують у збірник об'ємом 150 л. Відкривають вентиль подачі води питної і подають у збірник 100 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом 10±1 хвилин паралельно підігріваючи розчин. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,15 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 60 хв при температурі 131 °С. У рубашку апарату для зменшення енерговтрат подається глуха пара (Кт, Км 3.4.3).

***ТП.4. Підготовка посівного матеріалу***

***ТП 4.1. Підтримання колекційної культури***

Колекційну культуру *Pseudomonas fluorescens* Pf1 зберігають у пробірках. Пересіви здійснюють кожні 2–3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять у суворо асептичних умовах (Кт, Км 4.1).

***ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах***

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з МПА, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із МПА і вирощують при температурі 30 °С упродовж 24 год (Кт, Км 4.2).

***ТП. 4.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках***

Отримані ізольовані колонії (від ТП 4.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 24 год. Засіяні пробірки ставлять у термостат з температурою 30 °С та витримують впродовж 24 год. Контроль за чистотою культури здійснюють мікроскопіюванням (Кт, Км 4.3)

***ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках***

У колбу об'ємом 2 л в асептичних умовах вносят 1,1 л розчину композиції I (від ДР 3.1.1), 0,2 л розчину композиції II (від ДР 3.1.2) та 0,1 л розчину композиції III (від ДР 3.1.3). Перемішують і розливають по 140 мл в десять стерильних качалочних колб об'ємом 200 мл.

У пробірку з робочою культурою *Pseudomonas fluorescens* Pf1, вирощеною на МПА, вносять 5 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), стерильною піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках проводять за наступних умов: температура – 30 °С, частота обертання – 300 об/хв, час вирощування – 12 год. Після вирощування культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 2 л (Кт, Км 4.4).

***ТП 4.5. Вирощування культури у інокуляторі 20 л***

В інокулятор об'ємом 20 л в асептичних умовах передають охолоджені до кімнатної температури стерильних розчинів: 1,1 л композиції I (від ДР 3.2.1), 0,2 л композиції II (від ДР 3.2.2) та 0,1 л композиції III (від ДР 3.2.3). Доводять рівень pH до 7,0 стерильним розчином гідроксиду натрію контролюючи за показами pH-метра.

Посівний матеріал із засівної колби дотримуючись правил асептики, переносять в інокулятор.

Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 300 об/хв, час вирощування – 12 год., аерація – 1,5 л/л*хв, при pH=7,0, стерильним стисненим повітрям підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа. (Кт, Км 4.5)

***ТП 4.6. Вирощування культури у посівному апараті 200 л***

В посівний апарат об'ємом 200 л в асептичних умовах передають охолоджені до кімнатної температури стерильних розчинів: 110 л композиції I

(від ДР 3.3.1), 20 л композиції II (від ДР 3.3.2) та 10 л композиції III (від ДР 3.3.3). Доводять рівень pH до 7,0 стерильним розчином гідроксиду натрію контролюючи за показами pH-метра.

Засів проводиться перетискуванням стерильним стисненим повітрям посівного матеріалу з інокулятора (від ТП 4.5) через трубу перетискання до посівного апарату. Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 150 об/хв, час вирощування – 12 год., витрати повітря – 1,5 л/л*хв, при pH=7,0, під час вирощування у посівному апараті стерильним стисненим повітрям підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа (Кт, Км 4.6).

***ТП 5. Виробниче культивування у ферментері 2 м$^3$***

В ферментер об'ємом 2 м$^3$ в асептичних умовах передають охолоджені до кімнатної температури стерильних розчинів: 1,1 м$^3$ композиції I (від ДР 3.4.1), 0,2 м$^3$ композиції II (від ДР 3.4.2) та 0,1 м$^3$ композиції III (від ДР 3.4.3). Доводять рівень pH до 7,0 стерильним розчином гідроксиду натрію контролюючи за показами pH-метра.

Засів проводиться перетискуванням стерильним стисненим повітрям посівного матеріалу з попереднього посівного апарату (від ТП 4.6) через трубу перетискання до посівного апарату.

Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 50 °С, швидкість перемішування – 300 об/хв, час вирощування – 24 год., витрати повітря – 1,5 л/л*хв, pH=7, у ферментері стерильним стисненим повітрям підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа (Кт, Км 5.1).

# РОЗДІЛ 8
# КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Відповідно до обґрунтованої технологічної схеми виробництва та враховуючи усі вищепроведені розрахунки, розроблюємо карту постадійного контролю виробництва.

## 8.1. Карта постадійного контролю

*Таблиця 8.1*

**Карта постадійного контролю виробництва**

| Номер контрольної точки та назва стадії | Об'єкт контролю та показник, що визначається | Засоби та методи контролю | Періодичність перевірки та відбору проб | Нормативні значення показника |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Кх 1.1.1. Приготування розчину хлоргексидину біглюконату | **Розчин хлоргексидину біглюконату** Концентрація | Хімічний метод | Після приготування розчину | С = 0,5 % |
| Кх 1.1.2. Приготування розчину перекису водню | **Розчин перекису водню** Концентрація | Хімічний метод | Після приготування розчину | С = 6 % |
| Кх 1.1.3. Приготування розчину «Дезосепт Форте | **Розчин «Дезосепт Форте»** Концентрація | Хімічний метод | Після приготування розчину | С = 0,5 % |

*Продовження табл. 8.1*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| Кх 1.2.1, Кх 1.2.2 Санітарна підготовка виробничих приміщень | **Підлога та стіни** Чистота поверхні | Візуальний, мікробіологічний | Після прибирання | Чисте приміщення, відсутність пилу, бруду і сторонніх мікроорганізмів |
| Кт 1.3.1 Миття та ополіскування обладнання та комунікацій | **З'ємні частини обладнання та мийний розчин** Температура мийного розчину, чистота | Термометр технічний, годинник. | Під час кожної перевірки | t=50 °С τ=15 хв |
| Кт 1.3.2 Перевірка герметичності | **Обладнання** Герметичність роботи | Візуально | Під час кожної перевірки | Відсутність протікання обладнання |
| Кт 1.3.3 Стерилізація обладнання та комунікацій | **Обладнання** Температура стерилізації, час стерилізації, тиск | Термометр технічний, манометр | Температура визначається під час стерилізації | t = 120 °С, τ = 30 хв, р = 0,2 МПа |
| Кт 2.2 Грубе очищення повітря | **Повітря на виході з фільтра грубого очищення** Ступінь очищення, перепад тисків | Ступінь очищенні згідно специфікації фільтра | Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення | Е = 90 % |
| Кт 2.3 Компресуваня | **Стиснене повітря** Тиск | Манометр технічний | Після компресування повітря | р = 0,5 МПа |
| Кт 2.4 Охолодження та видалення вологи | **Повітря** Температура та вологість | Термометр технічний, психометр | Після охолодження | t = 120 °С, W = 60 % |
| Кт 2.5 Підігрів повітря | **Повітря** Температура повітря | Термометр технічний | Після підігріву | t = 40 °С, |

*Продовження табл. 8.1*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| Кт 2.6 Тонке очищення | **Повітря після фільтру** Ступінь чистоти | Ступінь очищенні згідно специфікації фільтра | Після проходження повітря через фільтри | E=99,9999 % |
| Кт, Км 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції I | **Композиція I** Температура, тиск, час витримки, стерильність | Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | t=112 °C P=0,05 МПа τ=30 хв Відсутність мікрофлори |
| Кт, Км 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції II | **Композиція II** Температура, тиск, час витримки, стерильність | Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | t=120 °C P=0,08 МПа τ=30 хв Відсутність мікрофлори |
| Кт, Км 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції III | **Композиція III** Температура, тиск, час витримки, стерильність | Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | t=131 °C P=0,15 МПа τ=60 хв Відсутність мікрофлори |
| Кт, Км 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції I | **Композиція I** Температура, тиск, час витримки, стерильність | Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | t=112 °C P=0,05 МПа τ=30 хв Відсутність мікрофлори |
| Кт, Км 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції II | **Композиція II** Температура, тиск, час витримки, стерильність | Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | t=120 °C P=0,08 МПа τ=30 хв Відсутність мікрофлори |

*Продовження табл. 8.1*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| Кт, Км 3.2.3 Приготування та стерилізація композиції ІІІ | **Композиція ІІІ** Температура, тиск, час витримки, стерильність | Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | t=131 °С Р=0,15 МПа τ=60 хв Відсутність мікрофлори |
| Кт, Км 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції І | **Композиція І** Температура, тиск, час витримки, стерильність | Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | t=112 °С Р=0,05 МПа τ=30 хв Відсутність мікрофлори |
| Кт, Км 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції ІІ | **Композиція ІІ** Температура, тиск, час витримки, стерильність | Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | t=120 °С Р=0,08 МПа τ=30 хв Відсутність мікрофлори |
| Кт, Км 3.3.3 Приготування та стерилізація композиції ІІІ | **Композиція ІІІ** Температура, тиск, час витримки, стерильність | Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | t=131 °С Р=0,15 МПа τ=60 хв Відсутність мікрофлори |
| Кт, Км 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції І | **Композиція І** Температура, тиск, час витримки, стерильність | Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | t=112 °С Р=0,05 МПа τ=30 хв Відсутність мікрофлори |
| Кт, Км 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції ІІ | **Композиція ІІ** Температура, тиск, час витримки, стерильність | Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | t=120 °С Р=0,08 МПа τ=30 хв Відсутність мікрофлори |

*Продовження табл. 8.1*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| Кт, Км 3.4.3 Приготування та стерилізація композиції ІІІ | **Композиція ІІІ** Температура, тиск, час витримки, стерильність | Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | t=131 °С Р=0,15 МПа τ=60 хв Відсутність мікрофлори |
| Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури | **Колекційна культура** температура збереження, мікробіологічна чистота, тривалість між пересівами | Термометр, мікробіологічний контроль, журнал контролю | Температура контролюється постійно, мікробіологічна чистота при кожному пересіві | t = 30°С τ=3-4 міс. відсутність сторонньої мікрофлори |
| Кт, Км 4.2 Одержання робочої культури на агаризованих середовищах | **Робоча культура** тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури | Годинник термометр, мікробіологічний контроль | Температура контролюються і підтримуються весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури | t = 30°С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікрофлори |
| Кт, Км 4.3 Вирощування посівного матеріалу в пробірках | **Посівний матеріал** тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури | Годинник термометр, мікробіологічний контроль | Температура контролюються і підтримуються весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури | t = 30°С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікрофлори |

*Продовження табл. 8.1*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| Кт, Км 4.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках | **Посівний матеріал** тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури | Годинник термометр, тахометр, мікробіологічний контроль | Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури | t = 30°С, τ = 24 год, ω = 300 об/хв відсутність сторонньої мікрофлори |
| Кт, Км 4.5 Вирощування культури у інокуляторі 20 л | **Поживне середовище pH Посівний матеріал** тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури | Датчик pH<br><br>Годинник термометр, тахометр, витратомір, манометр мікробіологічний контроль | pH після змішування компонентів середовища, температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури | pH=7.0 t = 30°С, τ = 24 год, ω = 300 об/хв 1,5 л*л/хв, $P_{надл.}$= 0,02 МПа відсутність сторонньої мікрофлори |
| Кт, Км 4.6 Вирощування культури у посівному апараті 200 л | **Поживне середовище pH Посівний матеріал** тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, тиск, мікробіологічна чистота | Датчик pH<br><br>Годинник термометр, тахометр, витратомір, манометр мікробіологічний контроль | pH після змішування компонентів середовища, температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури | pH=7.0 t = 30°С, τ = 24 год, ω = 300 об/хв 1,5 л*л/хв, $P_{надл.}$= 0,02 МПа відсутність сторонньої мікрофлори |

*Продовження табл. 8.1*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| Кт, Км 5.1 Виробниче культивування | **Поживне середовище pH Посівний матеріал** тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, концентрація клітин культури | Датчик pH<br><br>Годинник термометр, тахометр, витратомір, манометр мікроскоп, ФЕК | pH після змішування компонентів середовища, температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год | pH=7.0 t = 30°C, τ = 24 год, ω = 300 об/хв 1,5 л*л/хв, $P_{надл.}$= 0,02 МПа відсутність сторонньої мікрофлори |

### 8.2. Мікробіологічний контроль

*Мікробіологічний контроль стерильності аераційного повітря.* Для контролю мікробіологічної чистоти аераційного повітря здійснюється активний пробовідбір за допомогою спеціальних пристроїв – імпакторів. Імпакторні пробовідбірники використовують тверде або клейке середовище, наприклад агар, для збирання частинок. Повітря втягується в пробовідбірну головку насосом або вентилятором і прискорюєтьсяичерез перфоровану пластину. Це створює ламінарний потік повітря на поверхню збору – стандартну агарову пластину, заповнену відповідним середовищем. Швидкість повітря визначається діаметром отворів ситових пробовідбірників. Коли повітря стикається з поверхнею збору, воно тангенціально змінює напрямок, і будь-які зважені частинки викидаються за інерцією, вдаряючись на поверхню збору. Коли потрібний об’єм повітря пройде через головку для відбору проб, пластину з агаром виймають та інкубують безпосередньо без подальшої обробки. Після

інкубації підрахунок кількості видимих колоній дає пряму кількісну оцінку кількості колонієутворюючих одиниць у зразку повітря.

*Мікробіологічний контроль поживного середовища.* Стерильність позивного середовища перед використанням у біосинтезі є важливою для попередження розвитку на ньому конкурентної сторонньої мікрофлори. Періодично після стерилізації (в автоклаві, збірнику або УБС) зразки поживного середовища відбираються, щоб перевірити повноту стерилізації та відсутність у ньому мікроорганізмів. Для цього зразки додають до іншого еталонно стерильного середовища та інкубують. За умови відсутності розвитку мікроорганізмів, приготовлене середовище можна вважати стерильним.

*Мікробіологічний контроль обладнання.* Використовуючи стерильний тампон або серветку із стерильним фізіологічним розчином, протираютьабо внутрішні поверхні обладнання та переносять тампон або серветку в стерильний контейнер до проведення випробування. Асептично перемносять тампон або серветку в пробірку, що містить стерильний фізіологічний розчин. Збовтують пробірку, щоб суспендувати мікробні забруднювачі з тампона в рідке середовище.

Виконують послідовні розведення суспензії зразка, щоб отримати підраховані колонієутворюючі одиниці (КУО) на чашках з агаром. Поміщають відповідні розведення на чашки з відповідним поживним середовищем (з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) — для виявлення дріжджів і грибів), інкубують чашки та спостерігають за ростом мікробів у чашках протягом інкубації, підраховують кількість колоній на кожній чашці та обчислюють мікробне навантаження на площу обладнання.

*Мікробіологічний контроль під час культивування.* Контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопуванням. Попередньо відібрану культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з МПА для виявлення бактерій,

з СА або ГКА — для виявлення дріжджів і грибів. Видовий склад мікроорганізмів, які виявляють ріст визначають візуально.

Для мікроскопування використовують метод мікроскопування імерсійною системою. Препарат готують на предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, висушують над полум'ям пальника, фіксують, забарвлюють за Грамом і розглядають з об'єктивом 90х. Мікроорганізми ідентифікують за морфологічними ознаками.

### 8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

*Визначення концентрації бактеріальної маси у культурі*

Висушують порожню алюмінієву ємність для зважування або лист фільтрувальної мембрани з ацетату целюлози діаметром 47 мм і розміром пор 0,45 мкм. Зважують їх і зберігають в ексикаторі, покритому дрієритом (безводний $CaSO_4$) [34].

У колбу відбирають культуру. Перемішують вміст колби, щоб рівномірно суспендувати культуру. Виливають 100 мл культури в градуйований циліндр.

Відокремлюють клітини від культурального бульйону центрифугуванням при 10 000 g протягом 5 хвилин або фільтрацією. У разі центрифугування обережно видаляють прозорий бульйон і зішкрібають клітинну пасту з центрифужної пробірки в чашку для зважування. Промивають центрифужну пробірку кількома мл води. Також наливають воду для полоскання у чашу для ваг. У разі фільтрації культуру виливають у резервуар для зберігання, встановлений на фільтрувальній мембрані. Для протягування рідини через мембрану застосовується вакуум. Промивають резервуар декількома мл води та видаляють пасту, що прилипла до скляного посуду. Вага сирої культури вимірюється відразу після того, як вся вода витягнута. Розраховують вміст культури (вологої) у культуральній рідині.

Висушують клітинну пасту в духовці, встановленій на 100ºС. Клітини обвуглиться, а мембрана фільтра згорить, якщо температуру печі встановлено занадто високо. Періодично вимірюють вагу каструлі/фільтра плюс пасти для

клітин, доки суха вага не зменшиться. Для повного висихання зразка знадобиться 6-24 години, залежно від температури духовки та товщини пасти. Обчислюють різницю у вазі та знаходять вміст бактеріальних клітин (суха біомаса) в г/л культуральної рідини [34].

Для визначення концентрації бактеріальних клітин методом вимірювання оптичної густини [34] розводять зразок до відповідної концентрації та вимірюють абсорбцію зразка за допомогою спектрофотометра при 550 нм. Створюють калібрувальну криву, щоб зв'язати абсорбцію з сухою вагою клітини. В даному випадку також діють звичайні правила експлуатації спектрофотометра. Так, точність методу найвища, коли абсорбція становить від 0,1 до 0,5. Для даного зразка культури хороший спектрофотометр повинен виявляти лінійну залежність між кількістю клітин і абсорбцією. Однак оптична густина також є функцією морфології клітини, такої як розмір і форма, оскільки кількість пропущеного або розсіяного світла сильно залежить від цих факторів. Отже, незалежна калібрувальна крива необхідна для кожної умови в точній дослідницькій роботі, оскільки розмір і форма клітини залежать від конкретної швидкості росту та складу поживних речовин. Як правило, оптична густина у розмірі 1 одиниці відповідає приблизно 1 г/л сухої клітини.

*Визначення концентрації карбону*

Пробу культуральної рідини 50 мл центрифугують при 3000 об/хв протягом 20 хв. Для подальшого дослідження беруть супернатант. Джерелом карбону є сахароза, яку визначають шляхом гідролізу. У реакційну конічну колбу місткістю 100-150 мл відміряють піпеткою 10 мл культуральної рідини та 4 мл 1М розчину хлоридної кислоти. Колбу ставлять на плитку, рідину доводять до кипіння і кип'ятять 1 хв, охолоджують до кімнатної температури, потім в колбу вносять 2 мл 2М розчину гідроксиду натрію (або калію) для нейтралізації кислоти і 25 мл лужного розчину гексаціаноферату (III) калію. Вміст колби доводять до кипіння та кип'ятять 1 хв. Після охолодження заповнюють отриманим розчином кювету та визначають оптичну густину. Так як при значенні оптичної густини в інтервалі 0,3-0,6 виходять більш точні

результати, то при інших значеннях оптичної густини аналіз повторюють, змінивши об’єм культуральної рідини, додавши таку кількість води, щоб загальний об’єм становив 10 мл. Вміст сахарози у відсотках, виражений через глюкозу, обчислюють за градуювальним графіком.

# 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

## 9.1. Актуальність знешкодження відходів на виробництві

Утилізація відходів є надзвичайно важливою складовою у будь-якому промисловому середовищі, і це має особливе значення у випадку біотехнологічного підприємства, які виробляює біопрепарат для захисту рослин на основі *Pseudomonas fluorescens*. Дане підприємства використовує бактеріальну культуру як цільових продукт. Хоча *Pseudomonas fluorescens* є корисною бактерією, яка у навколишньому середовищі позитивно впливає на ріст рослин та захищає від патогенних мікроорганізмів, виробництво біопрепарату на її основі не є безвідходним. До відходів виробництва належать поживне середовище, залишки біомаси, газові відходи тощо. Скидання відходів, які не пройшли відповідного циклу обробки у водойми, повітря або ґрунт може призвести до забруднення, завдати шкоди екосистемам і потенційно загрожувати здоров'ю людей і тварин. Правильне поводження спрямоване на мінімізацію їх негативного впливу регламентується державними та міжнародними нормативними актами [35, 36, 37]. Крім того, наявність системи утилізації відходів підприємства забезпечує відповідний рівень санітарії на підприємстві, безпеки праці, що опосередковано впливає на якість виготовленої продукції.

Щоб вирішити окреслені проблеми, біотехнологічне підприємство повинно розробити комплексні стратегії управління відходами. Ці стратегії можуть включати як переробку відходів з метою використання так і їх повну утилізацію.

Виявлення можливостей переробки або повторного використання відходів може мінімізувати загальну кількість відходів. Так, залежно від групи відходи, вони можуть бути повернуті у технологічний цикл після належної обробки або ж використання для отримання інших корисних біотехнологічних продуктів, зменшуючи вплив на навколишнє середовище. Використання відповідних технологій очищення, що поєднують фізико-хімічні та біологічні методи може ефективно нейтралізувати або видалити забруднення з потоку відходів, після чого рідкі та газоподібні потоки можуть надходити до навколишнього середовища.

Віддаючи пріоритет запровадженню ефективним методам утилізації та обробки відходів, біотехнологічне підприємство, що здійснює виробництво біопрепарату для захисту рослин на основі *Pseudomonas fluorescens*, зможе відповідати державним нормам, екологічним стандартам ЄС та забезпечить підтримку своєї репутації як всередині країни, так і за кордоном.

### 9.2. Аналіз технологічної схеми та постадійно утворюваних відходів

На стадіях, пов’язаних із підготовкою поживного середовища, утворюються тверді відходи (залишки компонентів ПС) та рідкі відходи (технологічна вода, розчини композицій ПС).

На стадіях пов’язаних із підготовкою посівного матеріалу утворюються газоподібні відходи (повітря, що відходить із інокулятора, посівного апарату) та рідкі відходи (технологічна вода та культуральна рідина).

На стадії виробничого культивування аналогічно утворюються газоподібні відходи (повітря, що відходить із ферментер) та рідкі відходи (технологічна вода та культуральна рідина).

Під час післяферментаційного очищення утворюються рідкі відходи (культуральна рідина, що відділяється), тверді відходи (залишки біомаси).

Під час сушіння утворюються газоподібні відходи (пари рідини, що утворюються при сушінні) та тверді відходи (біопрепарат *Pseudomonas fluorescens*).

Під час пакування утворюються тверді відходи (некондиційні пакувальні матеріали, біопрепарат).

*Таблиця 9.1*

**Групи відходів підприємства (постадійно)**

| Стадія | Відходи | Група відходів | Класи небезпеки |
|---|---|---|---|
| **Підготовка поживного середовища** | | | |
| Підготовка поживного середовища об'ємом 1,4 л | Залишки компонентів ПС, Технологічна вода, Розчини композицій ПС | Тверді Рідкі | IV малонебезпечні |
| Підготовка поживного середовища об'ємом 14 л | Залишки компонентів ПС, Технологічна вода, Розчини композицій ПС | Тверді Рідкі | IV малонебезпечні |
| Підготовка поживного середовища об'ємом 140 л | Залишки компонентів ПС, Технологічна вода, Розчини композицій ПС | Тверді Рідкі | IV малонебезпечні |
| Підготовка поживного середовища об'ємом 1,4 $м^3$ | Залишки компонентів ПС, Технологічна вода, Розчини композицій ПС | Тверді Рідкі | IV малонебезпечні |
| **Підготовка посівного матеріалу** | | | |
| Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці | Повітря, технологічна вода, культуральна рідина | Газоподібні Рідкі | III помірно небезпечні |
| Вирощування посівного матеріалу у інокуляторі 20 л | Повітря, технологічна вода, культуральна рідина | Газоподібні Рідкі | III помірно небезпечні |
| Вирощування посівного матеріалу у посівному апараті 200 л | Повітря, технологічна вода, культуральна рідина | Газоподібні Рідкі | III помірно небезпечні |
| **Виробниче культивування** | Повітря, технологічна вода, культуральна рідина | Газоподібні Рідкі | III помірно небезпечні |
| **Післяферментаційне очищення** | Культуральна, рідина, залишки біомаси | Рідкі Тверді | III помірно небезпечні |

*Продовження табл. 9.1*

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Сушіння препарату** | Пари розчинника, біопрепарат | Газоподібні<br>Тверді | III помірно небезпечні |
| **Пакування і маркування готової продукції** | Некондиційні пакувальні матеріали, біопрепарат | Тверді | IV малонебезпечні |

### 9.3. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

***Знешкодження газоподібних відходів.*** Утилізація газоподібних відходів на підприємстві передбачає очищення газових викидів, що утворюються на різних стадіях виробництва (зокрема відпрацьоване повітря з ферментера, посівного апарату, інокулятора, систем вентиляції, а також під час таких процесів, як продування обладнання та трубопроводів). Очищення газоподібних відходів має вирішальне значення через наявність живої мікрофлори *Pseudomonas fluorescens*, що захоплюватись потоками повітря з апаратів для культивування та біологічно активних сполук, які синтезуються цією бактерією.

Газові викиди з ферментеру, посівного апарату та інокулятору спочатку піддають попередньому очищенню в циклонах. Циклони — це пристрої, які використовують відцентрову силу для відділення твердих частинок від газового потоку.

Потім частково очищені газові викиди проходять через рукавні фільтри. Рукавні фільтри призначені для вловлювання дрібних твердих частинок і подальшого видалення твердих частинок із газового потоку.

Далі газові викиди піддаються очищенню за допомогою пристроїв вологого очищення. У цих пристроях відбувається видалення решти забруднень, мікроорганізмів і летких органічних сполук (ЛОС). Цей комбінований процес очищення забезпечує комплексне очищення газоподібних відходів.

Вентиляційні викиди, до складу яких в основному входить повітря вентиляційної системи приміщення, очищаються за допомогою фільтрів, що

вловлюють тверді частинки та інші забруднювачі, присутні у вентиляційних викидах. Після очищення вентиляційних викидів оброблене повітря викидається в атмосферу через розсіювальну (дисперсійну) трубу. Дисперсійна труба забезпечує безпечний і рівномірний розподіл очищеного повітря в навколишнє середовище.

***Знешкодження рідких відходів.*** До рідких відходів відносять культуральна рідину з апаратів для культивування (ферментер, посівний апарат, інокулчтор), відпрацьовану воду, що використовувалась для дезінфекції та промивання обладнання, технологічну воду (теплоносій). Склад рідких відходів здебільшого представлений неорганічними сполуками, органічними сполуками, залишками мікрофлори.

Рідкі відходи, які використовувались для дезінфекції та промивання обладнання та які відповідають санітарно-гігієнічним нормам, скидаються безпосередньо в загальну каналізацію після проведення їх нейтралізації та розбавлення. Умовно чистою вважається незабруднена питна вода, використовувана як тепло- і холодоносій, яка не контактує з джерелами забруднення. Вона повторно використовується у технологічному процесі.

Рідкі відходи з апаратів для культивування, зокрема культуральна рідина піддається більш глибокому процесу очищення. Важливою також є проведення попередньої стерилізації таких рідких відходів, адже вони можуть містити живу мікрофлору та шкідливі продукти життєдіяльності мікроорганізмів.

Спосіб очистки обирається на основі аналізу складу стічних вод.

Забрудненість стічних вод оцінюється зазвичай двома показниками:

- хімічним поглинанням кисню (ХПК) — кількістю кисню (мг), якої досить для повного хімічного окислення всіх забруднень в 1 л стоку;

- біологічним поглинанням кисню (БПК) — кількістю кисню (мг), яке споживається мікроорганізмами для окислення органічних речовин в 1 л стоку.

В промислових умовах спочатку стічні води механічно очищують, після цього проціджують крізь стоки, відфільтровують, відстоюють, обробляють у гідроциклонах, проводять флотацію. В кінці до води в залежності від

показників ХПК та БПК застосовують одну із можливих схем окиснення які поєднують біологічне окиснення та хімічне окиснення. Можливе застосування ультрафільтрації, зворотнього осмосу і дистиляції.

***Знешкодження твердих відходів.*** Оскільки на підприємстві біомаса *Pseudomonas fluorescens* використовується як цільовий продукт, то вона використовується повною мірою. Утилізації підлягають тільки залишки біомаси, які як технологічні втрати осідають на стінках обладнання. Утилізація проводиться шляхом інактивації.

До інших твердих відходів підприємства належать тверді залишки компонентів поживного середовища, що не були використані та пакувальні матеріали.

Залишки поживних речовин у твердому стані збираються у ємності, після чого піддаються очищенню та використовуються у наступних циклах виробництва. У разі неможливості розділення залишків речовин та їхнього очищення з метою повторного використання проводять утилізують згідно специфікацій виробника.

Некондиційні пакувальні матеріали збираються на підприємстві в окремі ящики або картонні коробки, комбінуються за групами пакувальних матеріалів разом з іншими цехами підприємства та періодично направляються на підприємства, які займаються їх переробкою або утилізацією.

***Використання іноваційних методів знешкодження відходів на підприємстві.*** Після механічного очищення рідкі відходи з ферментера направляють у резервуар первинного біологічного окислення [38], що знаходиться на підприємстві, додають дріжджі або цвіль для біохімічного окислення, залишаються у воді від 6 до 72 годин, потім піддаються сепарації та передаються в резервуар хімічного окислення, де умови окислення такі:

- pH стічної води регулюється між 3 і 4,5; для окислення додають перекис водню і реактив двовалентного заліза; час окислення від 1 до 10 годин; молярне співвідношення пероксиду водню $H_2O_2$ до двовалентного

заліза $Fe^{2+}$ становить 1 до 50; а перекис водню в 1-10 разів перевищує концентрацію антибіотиків у стічних водах;

- pH стічної води регулюється між 7 і 11; на окислення подається озон; дозування озону від 30 до 120 мг/л; а час окислення від 1 до 10 годин.

Далі стічні води, піддаються розділенню твердої та рідинної фази, надходять у резервуар вторинного біологічного окислення, де вони окислюються для видалення речовин, які легко біологічно розкладаються. Стічні води, оброблені у такий спосіб, передають на осадженння, а потім скидають супернатант [38].

Для зменшення кількості газоподібних відходів використовується пристрій для виловлювання газоподібних CO та $CO_2$ на виході з ферментера, які утворюються як результат культивування [39]. Після вловлення гази перетворюються на один або більше продуктів, включаючи спирти та/або кислоти. Дана технологія дозволяє отримувати спирти, зокрема етанолу, з газових відходів з ферментера [39].

# ВИСНОВКИ

Бактерії *Pseudomonas fluorescens* є перспективним біологічним аналогом пестицидам, оскільки вони здатні інгібувати широкий перелік патогенів рослин у їх ризосфері. Їх внесення у ґрунт як безпечна альтернатива хімічним сполукам дозволить підвищити якість сільськогосподарських рослин, не завдаючи шкоди навколишньому середовищу.

Під час виконання кваліфікаційної роботи розроблювалась технологія виробничого культивування бактерій *Pseudomonas fluorescens*, для їх подальшого використання у складі біопрепарату доя захисту рослин. Для досягенння мети роботи було проаналізовано спектр біологічної активності бактерій *Pseudomonas fluorescens* та захисні механізми, які вони активують у ґрунті для інгібування патогенів рослин. Було здійснено характеристику біопрепарату цих бактерій як кінцевої продукції виробництва за основними показниками та визначено конкретні способи застосування цього біопрепарату.

Для розробки технології виробництва біопрепарату було обґрунтовано обсяг його виробництва, склад поживного середовища, визначено заходи із підготовки приміщень та очистки повітря, умови культивування, спосіб підготовки та стерилізації компонентів поживного середовища. Також було здійснено постадійний опис технологічної схеми виробництва із зазначенням критичних точок. На цій основі розроблено карту контролю виробництва, що містить критичні точки параметри, що контролюються та відповідні способи здійснення контролю.

Як окрема складова кваліфікаційної роботи було виконано її графічну частину — технологічну та апаратурну схеми виробництва у вигляді креслень.

Розроблена технологія може бути використана під час подальшого проектування завершеного циклу виробництва біопрепарату *Pseudomonas fluorescens* для захисту рослин.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ


1. David B. V., Chandrasehar G., Selvam P. N., Pseudomonas fluorescens: A Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium (PGPR) With Potential Role in Biocontrol of Pests of Crops. Crop Improvement Through Microbial Biotechnology. Elsevier, 2018. P. 221-243.

2. Hol W. H., Bezemer T. M., Biere A. Getting the ecology into interactions between plants and the plant growth-promoting bacterium Pseudomonas fluorescens. *Frontiers in plant science.* 2013. Vol. 4. P. 81. DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00081.

3. Sah S., Krishnani S., Singh R. Pseudomonas mediated nutritional and growth promotional activities for sustainable food security. *Current research in microbial sciences.* 2021. Vol. 2. 100084. DOI: https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100084

4. Rainey P. B. Adaptation of Pseudomonas fluorescens to the plant rhizosphere. *Environmental microbiology.* 1999. Vol. 1, no 3. P. 243–257. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.1999.00040.x.

5. Microbiology, genomics, and clinical significance of the Pseudomonas fluorescens species complex, an unappreciated colonizer of humans / Scales B. S. et al. *Clinical microbiology reviews*. 2014. Vol. 27, no 4. P. 927–948. DOI: https://doi.org/10.1128/CMR.00044-14.

6. Latin A. Optimization of biomass production of Pseudomonas fluorescens in a stirred tank bioreactor. University technologi Malaysia, 2015. URL: http://eprints.utm.my/id/eprint/79257/1/AzuanAbdulLatifPFChE2015.pdf.

7. Ocampo-López C., Colorado-Arias S., Ramírez-Carmona M. Modeling of microbial growth and ammonia consumption at differenttemperatures in the production of a polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymer. *Journal of Applied Research and Technology*. 2015. Vol. 13, no 5. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jart.2015.10.001.

8. Growth of Pseudomonas fluorescens on Cassava Starch hydrolysate for Polyhydroxybutyrate production / Aremu M. O. AJOL. 2010. Vol. 14, no 4. DOI: https://doi.org/10.4314/jasem.v14i4.63259.

9. Soesanto L., Mugiastuti E., Rahayuniati R. F. Morphological and physiological features of *Pseudomonas fluorescens* P60. 2011. URL: https://www.researchgate.net/publication/215522236_MORPHOLOGICAL_AND_PHYSIOLOGICAL_FEATURES_OF_Pseudomonas_fluorescens_P60.

10. Impact of Growth Conditions on *Pseudomonas fluorescens* Morphology Characterized by Atomic Force Microscopy / H. Kahli et al. *International journal of molecular sciences*. 2022. Vol. 23, no 17. 9579. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms23179579.

11. Development of Chitosan-Based Nanoemulsion Gel Containing Microbial Secondary Metabolite with Effective Antifungal Activity: In vitro and in vivo Characterizations / M. K. Khan et al. *Int J Nanomedicine*. 2021. Vol. 2016. P. 8203-8219. DOI: https://doi.org/10.2147/IJN.S338064.

12. Soesanto L., Mugiastuti E., Rahayuniati R. F. Biochemicsl features of *Pseudomonas fluorescens* P60. URL: https://www.researchgate.net/publication/215873674_Biochemical_characteristic_of_Pseudomonas_fluorescens_P60.

13. *Pseudomonas fluorescens* Migula, 1895. *GBIF*: веб-сайт. URL: https://www.gbif.org/species/3223199.

14. Pathway Maps. *Kegg*: веб-сайт. URL: https://www.kegg.jp/entry/pathway+pfo00010.

15. Agricultural microbials market. *Marker research fortune.* URL: https://www.marketresearchfuture.com/reports/agricultural-microbials-market-5410.

16. Argicultural microbials market size. *Fortune Business insights.* URL: https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/agricultural-microbial-market-100412.

17. Global Inoculants market size. *Spherical insights.* URL: https://www.sphericalinsights.com/reports/inoculants-market.

18. Оприлюднено прогноз виробництва овочевих культур в Україні в агросезоні 2022. *SuperAgronom*. URL: https://superagronom.com/news/15148-oprilyudneno-prognoz-virobnitstva-ovochevih-kultur-v-ukrayini-v-agrosezoni-2022.

19. Болоховська А. Ринок біопрепаратів розвивається і багато факторів сприяють його збільшенню. *SuperAgronom*. 2020. URL: https://superagronom.com/articles/339-anna-bolohovska-rinok-biopreparativ-rozvivayetsya-i-bagato-faktoriv-spriyayut-yogo-zbilshennyu.

20. Закон України «Про захист економічної конкуренції» № 2210-III від 11 січня 2001 року. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2210-14/find?text=%F1%F2%E0%F2%F2%FF+52#w114/.

21. Latin A. Optimization of biomass production of Pseudomonas fluorescens in a stirred tank bioreactor. University technologi Malaysia, 2015. URL: http://eprints.utm.my/id/eprint/79257/1/AzuanAbdulLatifPFChE2015.pdf.

22. Ocampo-López C., Colorado-Arias S., Ramírez-Carmona M. Modeling of microbial growth and ammonia consumption at differenttemperatures in the production of a polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymer. *Journal of Applied Research and Technology*. 2015. Vol. 13, no 5. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jart.2015.10.001.

23. Growth of Pseudomonas fluorescens on Cassava Starch hydrolysate for Polyhydroxybutyrate production / Aremu M. O. AJOL. 2010. Vol. 14, no 4. DOI: https://doi.org/10.4314/jasem.v14i4.63259.

24. Onken U. Batch and continuous cultivation of Pseudomonas fluorescens at increased pressure. *Biotechnology and bioengineering*. 1990. Vol. 35, no. 10. P. 983–989. https://doi.org/10.1002/bit.260351005.

25. 2m³ fermentation system. *Baoxing BIO*. URL: https://china-fermenter.com/product/2m_fermentation_system.

26. Фільтруючі матеріали грубої очистки G3-G4. URL: http://tehnograd.kiev.ua/ru/filtri_dlja_sistem_ventiljacii/filtruyushchie-materialy-gruboy-ochistki-g3-g4.html.

27. Картриджний фільтр. *GREENEX ECO*. URL: https://greenex-eco.com/services/aspiration/cartridge-filter/.

28. Хлоргексидину біглюконат 20% розчин. *Хімпостачання*. URL: https://snabhim.com.ua/uk-ua/hlorgeksidin-digljukonat-20.

29. Перекис водню медичний 35% (пергідроль), 5000мл. *Clean-ua*. URL: https://clean-ua.com.ua/perekis-vodnu-medichniy-35-pergidrol-5000ml/.

30. Дезінфікуючий засіб «Дезосепт Форте». *Biovet*. URL: https://biovet.ua/ua/dezinfitsiruushchee-sredstvo-dezosept-forte/.

31. Компресор ABAC B5900B/500 FT5.5. *Storgom*. URL: https://storgom.ua/ua/product/kompressor-ceccato-b5900b-500-ft55.html.

32. Теплообмінник WHE 2050. *Paskal*. URL: https://www.paskal.ua/ua/product/teploobmenik-whe-2050_172.html.

33. Повітрозбірник, ресивер для стисненого повітря 2000 л, 2,0 м3 (РВ2000, РВ2000.1200). *Ентех Україна*. URL: https://entech-ukraine.dp.ua/ua/p1192183045-vozduhosbornik-resiver-dlya.html.

34. Wang N. S. Measurement of cell biomass concentration. URL: https://user.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab9c.htm.

35. Про відходи та про скасування деяких директив: Директива Європейського парламенту і Ради 2008/98/ЄС від 19 листопада 2008 року. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/984_029-08#Text.

36. ДСТУ 3911-99 (ГОСТ 17.9.0.1-99) Охорона природи. Поводження з відходами. виявлення відходів та подання інформаційних даних про відходи. Загальні вимоги. К.: Держстандарт, 2000.

37. ДСанПіН 2.2.7.029-99. Державні санітарні правила та норми. 2. Комунальна гігієна. 2.7. Грунт, очистка населених місць, побутові та

промислові відходи, санітарна охорона грунту. "Гігієнічні вимоги щодо поводження з промисловими відходами та визначення їх класу небезпеки для здоров'я населення": від 01.07.1999 № 29. URL: https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0029588-99#Text.

38. Process for treating antibiotic pharmaceutical wastewaterпат: пат. CN101570378B; Китай; заявл. 30.04.2008; опубл. 04.11.2009. 7 с.

39. Improved carbon capture in fermentation: пат. CN101918567A; Китай; заявл. 23.10.2008; опубл. 15.12.2010. 46 с.

# ДОДАТКИ

## Інформація про обраний штам продуцента, склад поживного середовища та накопичення біомаси

OPTIMIZATION OF BIOMASS PRODUCTION OF *Pseudomonas fluorescens* IN A STIRRED TANK BIOREACTOR

AZUAN BIN ABDUL LATIF

UNIVERSITI TEKNOLOGI MALAYSIA

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.08. КР ПЗ | | | |
| Зм. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата | | | | |
| Розробила | | Копишинська М. | | | Додатки | Літ. | Аркуш | Аркушів |
| Перевірила | | Буценко Л. М. | | | | | 85 | 86 |
| | | | | | | Кафедра БТМ | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затвердив | | Стабніков В.П. | | | | | | |

## ABSTRACT

*Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*) is a denitrification bacterium that able to convert nitrate compounds into nitrogen gas. This process is always slow due to limitation of organic sources that are present in wastewater treatment plant. The efficiency of *P. fluorescens* as a nitrate removal strongly depends on the physiological status of cells and the amount of microorganism added to the treatment plant. Therefore, the objectives of this study are to optimize the culture medium in shake flask and to develop cultivation strategy for the biomass production of *P. fluorescens* in a pilot scale 16-L bioreactor. The medium composition was first optimized using one factor at time (OFAT) and response surface methodology (RSM) methods, which the Box-Behnken experimental design was employed. Analysis of variance (ANOVA) showed significance of findings for each factors with high coefficient of determination ($R^2$) of 95.58 %. The optimum medium composition of biomass production was composed of: sucrose, 8.0 g $L^{-1}$; yeast extract, 3.0 g $L^{-1}$; di-potassium phosphate, 2.0 g $L^{-1}$; and magnesium sulfate heptahydrate, 1.5 g $L^{-1}$. This medium gave biomass of 3.28 g $L^{-1}$ (about 57.6 % higher compared to un-optimized medium). After this step, the optimized medium was used to cultivate the cells in batch mode with and without pH control in a 16-L stirred tank bioreactor. It was found that controlling the culture pH at 7.2 during cultivation increased biomass by 39.56 %. In addition, a series of constant feeding strategy in combination with a control pH 7.2 was carried out to increase the biomass production. Both sucrose and full medium feeding were applied, and both yielded biomass of 8.46 g $L^{-1}$ and 14.98 g $L^{-1}$, respectively. Under constant feeding strategy of full medium, nutrients were consumed after 10 hours of feeding. Therefore, a gradual increase of medium feeding rate was applied to increase the biomass. The highest biomass obtained using increased rate feeding strategy was 33.5 g $L^{-1}$. In conclusion, the medium optimization accompanied by bioprocess optimizations in terms of pH control and applying fed batch cultivation strategy in the 16-L bioreactor enhanced the growth rate and biomass production of *P. fluorescens.*