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
_____ Грегірчак Н.М.	_____ Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)	(підпис) (прізвище та ініціали)
«____» червень 2021 р.	«____» червень 2021 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнологія»
на тему: Культивування *Azotobacter chroococcum* для одержання Азотобактерину

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 2

Джерелейко Діана Русланівна _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Слободян Ольга Петрівна _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти Клименко О.М. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Тимчук А.В. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) __Біотехнології та екологічного контролю_____
Кафедра _____біотехнології і мікробіології_____
Освітній ступінь____**бакалавр**_____
Спеціальність _____162 «Біотехнології та біотехнологія»_____
(код і назва)
Освітньо-професійна програма _____«Біотехнологія»_____
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри _біотехнології і_____
мікробіології_____

_____Пирог Т.П._
“_01_**”** ___квітня___2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

_____Джерелейко Діани Русланівни_____
(прізвище, ім’я, по батькові)

1. Тема роботи__ Культивування *Azotobacter chroococcum* для одержання Азотобактерину_____
керівник роботи_____Слободян Ольга Петрівна, к.т.н., доц._____,
(прізвище, ім’я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року № 228-кс
2. Строк подання здобувачем роботи___3 червня 2021 р._____
3. Вихідні дані до роботи _біологічний агент: *Azotobacter chroococcum*,_____
цільовий_продукт: Азотобактерин_____
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)_____
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукта. РОЗДІЛ 2. Обгрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обгрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту РОЗДІЛ 5. Обгрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікаціяя обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва. РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля_____
5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна схема виробництва Азотобактерину – 2 аркуші А1. Апаратурна схема виробництва Азотобактерину – 2 аркуші формату А1 та А2. Схема автоматизації__ ділянки відділення біомаси 1 аркуш формату А2_____

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 9. Автоматизація	Клименко О.М., доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання____01 квітня 2021 року_____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукта	01.04.21-04.04.21	
2	Обгрунтування вибору та характеристика біологічного агента	05.04.21-11.04.21	
3	Техніко-економічне обгрунтування	12.04.21-18.04.21	
4	Біосинтез цільового продукту	19.04.21-22.04.21	
5	Обгрунтування вибору технологічної схеми	23.04.21-27.05.21	
6	Специфікація обладнання	28.04.21-31.04.21	
7	Опис технологічної схем	01.05.21-08.05.21	
8	Контроль виробництва	09.05.21-13.05.21	
9	Автоматизація ділянки виробництва	14.05.21-18.05.21	
10	Охорона довкілля	19.05.21-23.05.21	
11	Оформлення пояснювальної записки	24.05.21-28.05.21	
12	Виконання графічної частини проекту	01.05.21-25.05.21	

Здобувач _____ Джерелейко Д.Р.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ Слободян О.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Представлено проект виробництва Азотобактерину у вигляді сухої біомаси з наповнювачем (каолін) штаму *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д, який синтезує за 48 год на середовищі з мелясою 12 г/л біомаси. Азотобактерин – бактеріальне добриво, яке використовує аграрне господарство для сільськогосподарських земель, з метою збільшення продуктивності овочевих, технічних або злакових культур, забезпечувати їх біологічно активними речовинами, збільшувати стійкість рослин до захворювань, підвищувати врожай і якість рослинної продукції. Розрахована потужність його виробництва становить 183 кг біомаси за 85 робочих трудоднів.

Технологія виробництва добрива складається з допоміжних робіт (приготування мийних засобів, підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища, приготування розчину соляної кислоти, приготування та стерилізація розчину гідроксиду натрію) та основних процесів (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторі посівному апараті, виробничого біосинтезу, сепарування культуральної рідини, висушування та змішування сухої біомаси з наповнювачем), що наведені в технологічній та апаратурній схемах.

Дипломний проект викладений на 130 стор. друкованого тексту, містить 21 таблиці, 13 рисунків і складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (60 джерел), додатків та графічної частини (3 кресленя формату А1 та 2 креслення формату А2).

Ключові слова: бактеріальне добриво, сільське господарство, *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д, суха біомаса, Азотобактерин, меляса, наповнювач, біосинтез, виділення.

ЗМІСТ

ВСТУП..... 7

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ 9

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА..... 13

2.1. Обгрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування..... 13

2.2. Розрахунок складу поживного середовища 15

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента19

2.4. Таксономічний статус біологічного агента..... 20

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ 21

3.1. Потреба у цільовому продукті..... 21

3.2. Розрахунок потужності виробництва..... 24

3.3. Розрахунок об’єму ферментера та кількості виробничих циклів 26

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу..... 27

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ 31

4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента 31

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт 34

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ..... 37

5.1 Обгрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу 37

5.1.1. Обгрунтування способу культивування і типу ферментера……..……..37

5.1.2. Обгрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря……41

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів……...43
5.1.4.Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища…….50
5.2. Обгрунтування стадій виділення цільового продукт 53
5.3. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях 66
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ 69
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ 76
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА 97
8.1. Мікробіологічний контроль 97
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукта 99
8.2.1. Концентрація біомаси 99
8.2.2. Концентрація цільового продукту 99
8.2.3. Концентрація джерела вуглецю 100
8.3. Показники якості готового продукту 102
8.3.1. Визначення масової частки вологи 102
8.3.2. Визначення числа життєздатних клітин азотфіксуючих бактерій 103
8.3.3. Визначення числа клітин сторонніх мікроорганізмів 105
8.3.4. Визначення зовнішнього вигляду і кольору 105
8.4. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів 106
РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА 113
РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ 118
10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів 118
10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва 120

10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів 120
10.2.2. Сиситема знешкодження та утилізації твердих відходів..... 122
10.2.3. Сиситема знешкодження та утилізації газоподібних викидів 122
10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів 123
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ..... 124
ДОДАТКИ..... 131

ВСТУП

Бактеріальні добрива – цей напрямок є одним з найбільш динамічно розвинутим серед мікробних препаратів на світовому ринку. Протягом багатьох років в землеробстві застосовували виключно мінеральні добрива і негативні наслідки цього очевидні: зміна біоценозу грунту, зниження активності грунту, зміна кислотності середовища і т.д. У зв'язку з цим бактеріальні добрива можуть стати реальною альтернативою мінеральним, як мінімум в перехідний період від звичайного землеробства до органічного [1].

Біологічна фіксація молекулярного азоту з атмосфери – один з можливих і екологічно чистих джерел поповнення азотного фонду орних грунтів. У зв'язку з цим, питання дефіциту мінерального азоту можна, в певною мірою, вирішити за допомогою «біологічного» азоту, фіксованого грунтовими мікроорганізмами. Використання мікробіологічної азотфіксації дозволить скоротити енергетичні витрати, пов'язані з виробництвом мінеральних азотних добрив, і скоротити їх внесення в грунт, що, в свою чергу, знизить негативний вплив мінерального азоту на навколишнє середовище.

Таким чином, система удобрювання сільськогосподарських культур повинна передбачати застосування таких добрив, здатних фіксувати азот і часткову заміну мінерального азоту біологічним за рахунок симбіотичного або асоціативної азотфіксації шляхом застосування бактеріальних препаратів [2].

В агровиробництві широко використовуються корисні властивості азотобактера для культивації грунту з метою підвищення врожайності. Біотехнологічні підходи дозволяють сучасним селекціонерам виділяти штами азотобактера, які не тільки активно фіксують азот, а й здатні синтезувати велику кількість біологічно активних речовин.

Агрономічне значення азотобактера пояснюється завдяки своїм можливостям фіксації азоту, синтезу антибіотиків, гормонів росту рослин, вітамінім, екзополісахаридів та пігменту, а також його протигрибкову активність. Прищеплення насіння або обробка коріння культурами азотобактера, підвищують родючість грунту і помітно збільшують врожайність овочевих, злакових, квіткових, ягідних або технічних культур [3].

Метою даної роботи є проектування ділянки виробництва (апаратурна і технологічна схеми) бактеріального добрива Азотобактерину вільноживучіми бактеріями *Azotobacter chroococcum* d 10 ВКМ У-2272 Д у вигляді сухої біомаси з наповнювачем для подальшого їх виділення та пакування в поліетиленові пакети.

Актуальність теми. Азотобактерин є екологічно чистим добривом, на основі вільноживучих бактерій, які беруть участь в азотфиксації і покращують умови живлення рослин. Висушена біомаса азотобактера викликає інтерес для вирішування таких проблем, як забезпечення економії енерговитрат і матеріальних ресурсів, зменшення забруднення навколишнього середовища, сприяння природньому протіканню грунтоутворювального процесу в посівах сільськогосподарських культур, підвищення грунтової родючості, врожайності і якості продукції, збільшення стійкості рослин до захворювань, що є назрілим питанням в сільському господарстві багатьох країн і зокрема в Україні [2].

Новизною дипломного проекту є використання штаму бактерій *Azotobacter chroococcum* d 10 ВКМ У-2272 Д, концентрація біомаси якого становить 12 г/л, який культивується на дешевому поживному середовищі; володіє фунгістатичним ефектом та продукує біологічно активні речовини: фітогормони, антибіотичні речовини проти фітопатогенів, амінокислоти, вітаміни; накопичення життездатних клітин, збереження їх життездатності на всіх стадіях виділення; використання висушених клітин азотобактера в агропромислових комплексах [4].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Азотобактерин – препарат на основі азотфіксуючих мікроорганізмів *Azotobacter chroococcum*, постачає амонійну форму азоту, який споживають рослини. Внесення цього препарату в грунт разом з висіваючим насінням підсилює розвиток азотобактера в зоні кореня (ризосфері), що сприяє поліпшенню росту посіву. Препарат здатний продукувати біологічно активні речовини (вітаміни і стимулятори росту), а також виробляє фунгістатичні речовини, що пригнічують розвиток мікроскопічних грибів, які затримують ріст рослин [5].

Азотфіксація здійснюється ферментним комплексом – нітрогеназою і у загальному вигляді описується рівнянням:

$$N_2 + 8H^+ + 8e + 16\ АТФ \rightarrow 2\ NH_3 + H_2 + 16\ АДФ + 16\ ФН$$

Азотфіксуюча здатність культури пригнічується аміаком (взагалі вміст в середовищі зв'язаного азоту пригнічує азотфіксацію). Стимулює процес фіксації азоту сполуки молібдену.

Встановлено, що при фіксації азоту процес його відновлення протікає на одному і тому ж ферментному комплексі, синтезованому азотобактером і лише кінцевий продукт (аміак) відділяється від ферменту. Нітрогеназна азотфіксуюча система являє собою мультиферментний комплекс, що містить негемове залізо, молібден і SH-групи [6].

У разі внесення *Azotobacter chroococcum* у грунт на поверхні коренів в суворо визначених місцях формуються колонії ризосферних бактерій, які здатні забезпечити для рослин цілий ряд корисних функцій. Серед них:

- азотфіксація в розмірі до 50 кг азоту на гектар на рік;
- вироблення рослинних гормонів, які дозволяють прискорити ріст кореневої системи і тим самим забезпечити рослині успіх в захопленні необхідної площі живлення, а також регулювати розвиток рослин;
- оптимізація засвоєння фосфорних важкодоступних сполук;
- індукція системної реакції щодо захисту від фітопатогенів;
- обмеження (біоконтроль) зростання фітопатогенів на коренях рослин за допомогою таких механізмів, як виділення антибіотичних з'єднань, розчинення гіфпатогенних грибів, конкуренція за місця заселення на коренях, перехоплення поживних речовин, необхідних для розвитку водоростей і ін.;
- припинення у рослини стресових реакцій;
- регулювання надходження в рослину забруднювачів навколишнього середовища [7].

Форма випуску. Основна маса препаратів на основі *Azotobacter chroococcum* виробляють у рідкій або у вигляді сухого препарату – висушених клітин бактерій в упаковках («*Azotobacter*» рис 1.1.). Рідкий препарат являє собою активну культуру азотобактера, вирощену на твердому поживному середовищі та розливу культуральної рідини, в 1 мл препарату повинно міститися не менше $1*10^9$ життєздатних клітин. Суху товарну форму Азотобактерину отримують методом глибинної ферментації на середовищі з мелясою з подальшим змішуванням суспензії із захисним середовищем. Суха форма містить > 0,5 млрд життєздатних клітин на 1 г препарату [5].

Дозування та спосіб використання. Використовувати Азотобактерин рекомендується тільки на грунтах, що містять фосфор і мікроелементи. Найбільш ефективний спосіб використання Азотобактерину – обробка насіння, розсади або компостів. Норма витрати сухого препарату сановить 100-300 млрд клітин на одну

гектарну порцію насіння. Позитивну дію на рослини надають лише культури азотобактера, що виробляють біологічно активні речовини, які стимулюють ріст рослин і пригнічують розвиток фітопатогенних грибів [5]. Картоплю і кореневу систему розсади рівномірно змочують водною суспензією бактерій. Для отримання суспензії 1 гектарну норму (300 млрд. клітин) розводять в 15 літрах води. Кореневу систему розсади змочують приготовленою суспензією.

Рис.1.1. «*Azotobacter*» у сухій формі

Умови і термін зберігання. Суху форму зберігають при температурі не вище +15 ℃ протягом не більше 3 місяці [7].

Особливі вказівки. Проблеми, що виникають при використанні Азотобактерину, обумовлені в основному тим, що *Azotobacter* дуже вимогливий до умов середовища. Так, наприклад, він погано переносить відхилення від нейтральної реакції ґрунтового розчину, а температурний оптимум лежить в межах 25 - 30 ℃ та pH 7-7,5. Крім того, азотобактер потребує достатньої кількості органічної речовини. Тому застосування Азотобактерина як правило дає позитивний ефект тільки при його внесення до фону органічних добрив, таких як гній, солод або різноманітні компости. При цьому бактеріалізація насіння овочевих культур збільшує урожай на 20 – 30 % і прискорює його дозрівання.

На сьогодні встановлено, що позитивний ефект від застосування азотобактерій в основному обумовлено продукуванням азотобактером великої кількості біологічно активних речовин, таких як вітамінні групи В, пантотенова та нікотинова кислоти, біотин, піридоксин, гетероауксин та гібриди, які придають препарату властивості стимулювати ріст рослин [8].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обгрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Розвиток біотехнології позитивно позначився на отриманні бактеріального препарату Азотобактерину, виробленого на основі вільноживучих мікроорганізмів роду *Azotobacter*. У дослідах з кукурудзою було встановлено, що обробка насіння Азотобактерином збільшує врожай на 14-18 ц/га [9]. Вода та азот вважаються найважливішими факторами розвитку рослини. Рослини здатні засвоювати азот лише у вигляді нітратів та аміаку, тоді як молекулярна форма з повітря залишається їм недоступною. Коли рівень азоту в рослинах низький, це призводить до зниження продуктивності [10]. Тому доцільно використовувати біодобрива для підвищення врожаю рослин.

Серед біодобрив велике значення для плодових культур мають *Azotobacter*, *Azospirillium* та *Pseudomonas*. *A. chroococcum* та *A. vinilandii* вважаються найпоширенішим видом *Azotobacter*, які здатні перетворювати азот в аміак, який, у свою чергу, приймається рослинами. Родина *Azotobacter* також можуть утворювати протигрибкові сполуки для боротьби з багатьма рослинними збудниками. Рослини, прищеплені азотобактером, отримують позитивну користь у плані посилення поглинання $N0_3^-$, NH_4^+, H_2PO_4, K^+ та Fe_2^+, підвищуючи активність відновлення нітратів у рослинах [11].

При опрацюванні літературних даних, на практиці для отримання біодобрива виділяють наступні штами:

Azotobacter chroococcum AC1 [12], *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д [4] та *Azotobacter vinelandii* ВКПМ В-5933 [13].

На першому етапі вибору різні штами продуцентів порівнюються за показниками синтезу культивування. Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей синтезу з використанням бактерій роду *Azotobacter* як продуцентів екзометаболітів наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів Азотобактерину

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Конц. біомаси*, г/л	Умови культивування	Література
Azotobacter chroococcum d10 ВКМ В-2272Д	Меляса - 30,0; K_2HPO_4 - 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,3; NaCl -0,3; K_2SO_4 - 0,1; $FeSO_4$ 0,005; $MnSO_4$ - 0,005; $(NH_4)_2MoO_4$ - 0,005; $CaCO_3$ - 3,5;	12	pH 7,0 - 7,5, 28° С , 48 год	Патент №2231546C2 RU Штамм бактерий az d10 вкм в-2272 д, обладающий ростостимулирующими свойствами и устойчивый к дельтаметрину / Вайшля О.Б., Бондаренко А.А. Опубл. 27.06.2004 [4]
Azotobacter chroococcum AC1	Маніт - 10,0; K_2HPO_4 - 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; NaCl - 0,2; $CaSO_4$ - 0,1; $CaCO_3$ - 5,0	4	pH 7,5, 30 °C, 48 год	Romero-Perdomo F., Abril J., Camelo M., Moreno-GalvánIván A., Pastrana I., Rojas-Tapias D., Bonilla R. *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*). *Revista Argentina de Microbiología*. 2017, 49:4.

				doi:10.1016/j.ram.2017.04.006 [11]
Azotobacter vinelandii ВКПМ В-5933	Глюкоза – 10,5; K_2HPO_4 - 1,0 ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,0005; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ - 0,005; Ферментализат БВК	4,2	pH 7, 28-30°С, 48 год	Патент № 2390518 С1 RU Биопрепарат в виде водной суспензии для повышения почвенного плодородия / Акулинина Н. С., Власов С. А., Терентьева Л. И., Краснопевцева Н. В. Опубл. 27.05.2010 [12]

* – розраховано за джерелом вуглецю.

Всі три наведених мікроорганізми є аеробами, тому доцільніше використовувати культивування глибинним способом, оскільки це є менш енергозатратніше, більш економічно вигідно, менші втрати цільового продукту при виділенні, також менший ризик контамінації.

Проаналізувавши таблицю, можна зробити висновок, що кожний із представлених продуцентів Азотобактерину у процесі біосинтезу має свої особливості. Найвищий показник біомаси – 12 г/л досягається при культивуванні *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д. Найнижчий показник 4 г/л спостерігається у *Azotobacter chroococcum* АС1 та *Azotobacter vinelandii* ВКПМ В-5933.

Зміни кислотності (pH) середовища, температурного режиму, аерація надають значний вплив на вихід остаточних продуктів метаболізму бактерій. Ці зміни можуть залежати як від технологічних умов культивування, так і від фізіологічних особливостей посівного матеріалу.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Порівняльна характеристика продуцентів Азотобактерину є недостатньою для вибору біологічного агента. Тому на другому етапі порівнювали вартість поживних середовищ (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування продуцентів Азотобактерину

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
Azotobacter chroococcum d10 ВКМ В-2272Д	Меляса – 30	17	0,51	1
	K_2HPO_4 – 0,2	60	0,012	2
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,005	10	0,00005	2
	K_2SO_4 – 0,1	65	0,0065	2
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,3	20	0,006	2
	NaCl – 0,3	14	0,0042	1
	$MnSO_4$ – 0,005	55	0,000275	2
	$(NH_4)_2MoO_4$ – 0,005	580	0,0029	2
	$CaCO_3$ – 3,5	12,8	0,0448	1
Вартість 1 л середовища – 0,5867 грн				
Azotobacter chroococcum AC1	Маніт – 10,0	160	1,6	2
	K_2HPO_4 – 0,2	60	0,012	2
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2	20	0,004	2
	NaCl – 0,2	14	0,0028	1
	$CaSO_4$ – 0,1	25	0,0025	2
	$CaCO_3$ – 5,0	12,8	0,064	1
Вартість 1 л середовища – 1,6853 грн				
Azotobacter vinelandii ВКПМ В-5933	Глюкоза – 10,5	20	0,21	1
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5	20	0,01	2
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,0005	10	0,00001	2
	K_2HPO_4 – 1,0	60	0,06	2

	Ферментализат БВК– 0,2	240	0,048	3
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,005	670	0,00335	2
Вартість 1 л середовища – 0,3314 грн				

1. https://flagma.ua 2. https://prom.ua 3. https://agronet.ua

***Примітка 1** Ціни на компоненти поживних середовищ взяті з українських промислових інтернет магазинів, станом на 2020 рік.

У табл. 2.2 наведено вартість компонентів поживних середовищ за 1 л середовища для культивування продуцентів *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д**,** ціна становить за 1 літр – 0,5867 грн, це середнє за вартістю середовище. Середовище, для *Azotobacter vinelandii* ВКПМ В-5933 – має вартість – 0,3314 грн, таким чином дане середовище має найнижчу ціну, і для *Azotobacter chroococcum* АС1– ціна середовища становить 1,6853 грн за літр, це найдорожча ціна середовища, оскільки в ній є відносно дорогі компоненти порівняно з іншими поживними середовищами такі як K_2HPO_4 та маніт.

Отже, за даними наведеними у табл. 2.2 можна зробити висновок, що середовище для культивування *Azotobacter vinelandii* ВКПМ В-5933 та *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д є найдешевшими і економічно вигідними на виробництві, але оскільки концентрація біомаси більше у *Azotobacter chroococcum* d10, доцільно використовувати саме цей продуцент.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 л цільового продукту при культивуванні *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д, *Azotobacter chroococcum* АС1 та *Azotobacter vinelandii* ВКПМ В-5933

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища грн	Максимальна концентрація біомаси, г/л	Умовна вартість біомасі г/грн на 1 л середовища	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної біомаси за годину, г/год

Azotobacter chroococcum d10 ВКМ В-2272Д	0,5867	12,0	0,0488	24	0,5
Azotobacter chroococcum АС 1	1,6853	4,0	0,4213	24	0,166
Azotobacter vinelandii ВКПМ В-5933	0,3314	4,2	0,0789	24	0,175

Штам *Azotobacter chroococcum* АС1 має найдорожче поживне середовище, і вихід концентрації біомаси (г/л) у даного штаму є дуже низьким. Штам має найвищу умовну вартість по біомасі на 1 л середовища яка становить 0,4213 гривень Даний біологічний агент є досить дорогим для використання у одержанні ендотоксину.

Штам *Azotobacter vinelandii* ВКПМ В-5933 має однаковий час культивування, досить недороге поживне середовище, але вихід концентрації біомаси (г/л) у даного штаму є низьким. Умовна вартість по біомасі на 1 л середовища становить 0,0789 гривень, що є не найдешевою ціною порівняно з іншими штамами.

Штам *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д, на відміну від інших, є досить перспективним, оскільки має в дешеве поживне середовище, з основним субстратом у вигляді меляси. А також містить багато солей, як джерел макро- та мікроелементів. Тривалість культивування у даного штаму є однаковою (24 год) з вище перерахованих мікроорганізмів, має найвищу концентрацію біомаси на виході і відповідно найнижчою ціною за одиницю маси на суму в 0,0488 грн, що виграє на 100% з іншими штамами. А оскільки при масовому виробництві препарата важливе дешеве поживне середовище, з доступних компонентів, цей продуцент займає стійкі позиції відносно попередніх.

Висновок: на основі порівняльної характеристики штамів-продуцентів Азотобактерину, було обрано штам *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д, з причин найбільшої економічної доцільності, через низьку вартість поживного середовища, високу концентрацію біомаси та їх співвідношень, на користь високої концентрації цільового продукту, що є вирішальним для даного препарату, оскільки у ньому головне максимально можлива концентрація біомаси при мінімальних затратах на поживне середовище і параметри культивування, а даних параметрах та концентрації біомаси виграє саме цей штам, оскільки інші не дотягують у співвідношенні цін поживного середовища до вихідної концентрації біомаси.

Оптимальним середовищем за продуктивністю штамів *Azotobacter chroococcum* виявилося середовище, до складу якого входить меляса – продукт переробки цукрових буряків, та мінеральні солі, що забезпечує концентрацію біомаси 12 г/л культуральної рідини.

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

Azotobacter chroococcum являє собою основну групу гетеротрофних, несимбіотичних вільноживучих азотних бактерій. Ці бактерії грамнегативні і різняться за формою. Клітини мають овальну форму від паличковидних до коккоподібних (рис.2.1.). Розмножуються простим поділом, спор не утворюють. Рухливі, за домогою перитрихіально розташованих джгутиків. Діаметр клітин коливається від 1,5 до 2,0 мкм. При фарбуванні за Грамом, забарвлюється рожевим (рис.2.2) з наступною обробкою розчином Люголя, спиртом і фуксином.

Овальні або сферичні бактерії азотобактера утворюють цисти (як засіб безстатевого розмноження за сприятливих умов). Утворення цист викликається зміною концентрації поживних речовин у середовищі та додаванням деяких органічних речовин, таких як етанол, n-бутанол або β-гідроксибутират. Утворення

цист також індукується хімічними факторами і супроводжується змінами катаболізму, дихання та біосинтезу макромолекул [4].

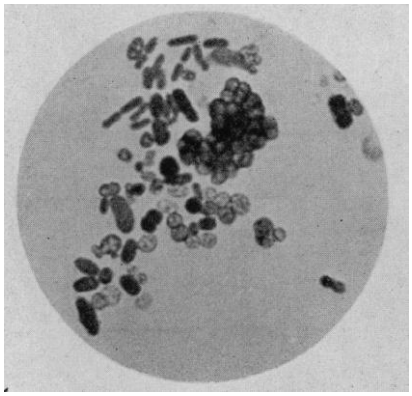


Рис.2.1. *Az. Chroococcum*, фарбовані гематоксиліном заліза Heidenhain, × 1000

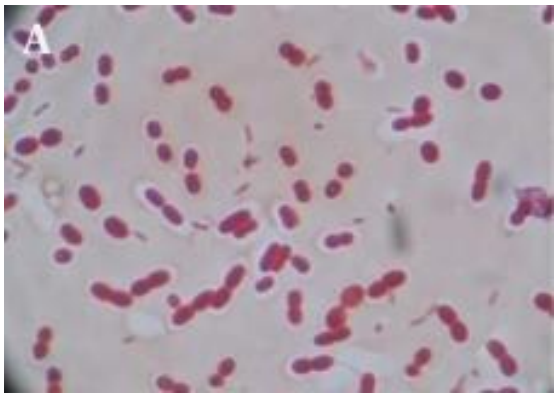


Рис.2.2. *Az. Chroococcum* фарбування за Грамом

Az. chroococcum аероб, каталазопозитивний. Джерело вуглецю при аеробному рості є глюкоза, манніт, сахароза. Ріст при кімнатній температурі, pH 4,8-8,5. При концентрації NaCl 20 г/л і більше ріст припиняється. Оптимальні умови росту – температура 29 - 31 °C, pH 7,0-7,5, концентрація NaCl - 0,2 -0,3 г/л. Азотобактер має деякі унікальні особливості серед біодобрив. Вони володіють більш ніж одним типом ферментів нітрогенази [4].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Класифікація для *Azotobacter chroococcum* наведена згідно літератури [14].

Домен – *Bacteria*

Царство– *Bacteria*

Тип – *Proteobacteria*

Клас – *Gammproteobacteria*

Порядок – *Pseudomonas*

Родина – *Pseudomonadaceae* / *Azotobaceriaceae*

Рід – *Azotobacter*

Вид - *chroococcum*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Питання землеробства в Україні на сьогодні є найбільш актуальним у контексті сталого розвитку країни. Процес росту сільськогогосподарства наразі неможливий без використання добрив.

Біологічні добрива сьогодні стають ефективним засобом підвищення дії мінеральних добрив, а за умов органічного виробництва їх альтернативою. Їх застосовують для збагачення ризосфери рослин корисними мікроорганізмами, які відповідають за ефективне живлення рослин поживними елементами з ґрунту. Живлення рослин залежить від того, який вид мікроорганізмів домінує в ризосфері рослин.

Азотобактерин є діючою речовиною препарату Азогран, який використовується для передпосівної обробки насіння, розсади, а також підживлення та обробки по вегетації зернових, технічних, овочевих, плодово–ягідних культур та кімнатних рослин, покращення показників родючості ґрунту. Сприятлива дія препарату на рослини зумовлена двома факторами: його здатністю засвоювати молекулярний азот з повітря (20-45 кг/га) та синтезувати різні біологічно активні речовини типу фітогормонів ауксинового, гіберелінового і цитокінінового рядів, антибіотиків, вітамінів групи В, органічних кислот і амінокислот.

Препарат ефективно стимулює проростання насіння до 25%. Збільшує врожайність озимих культур до 18%, ярих - до 25%, овочевих - на 30%. Ефективно бореться зі збудниками грибкових та бактеріальних інфекцій та кореневих гнилей [15].

Для обробки насіння готують водний розчин з розрахунку 10 л/т насіння. Більш детальні норми використання та призначення зазначені в таблиці 3.1. В першу чергу в розчин вносяться хімічні компоненти, останніми вносяться біологічні компоненти. Насіння та посадковий матеріал обробляють у затінку або під навісом, уникаючи потрапляння прямих сонячних променів.

Таблиця 3.1

Призначення та норми використання Азограну

Культура/об'єкт	**Дія препарату**	**Спосіб обробки**	**Кратність обробок**	**Норма**
Овочеві (картопля, огірки, помідори, капуста, перець та інші);	Для стимуляції росту і розвитку рослин і захисту від кореневих гнилей	Полив грунту при висадці розсади	1	10 г на 5 л води/1 сотки (0,01 га)
Зернові (жито, пшениця, овес, ячмінь)	Для фіксації атмосферного азоту	Замочування насіння перед посівом	1	10 г на 1 л води/5 кг насіння

Обробка насіння (розсади) препаратом – слід проводити не пізніше як за 3-5 діб до посіву або перед висаджуванням розсади. Оброблене насіння та розсаду необхідно оберігати від потрапляння прямих сонячних променів і нагрівання вище +25 °С.

Обробку рослин проводити в періоди мінімальної сонячної активності (ранок, вечір, ніч, хмарність). Робочий розчин для обробки насіння потрібно використати протягом 3-х годин [16].

Річну потребу Азотобактерину буде розраховуватися за площею посівів сільсько-господарських культур, які будуть обприскуватися при висадці.

Проаналізуємо, який вид овочів має найбільший попит. Для подальшого розрахунку необхідно навести сільсько-господарські овочеві культури (*табл. 3.2*).

Таблиця 3.2

Данні щодо посівних площ для окремих видів овочевих культур

Сільсько-господарська культура	Площі посівів, тис.га *
Капуста	69,2
Перець столовий	14,9
Томат	70,8
Огірки	50,3
Морква столова	43,3

* Примітка: дані щодо посівних площ на сезон 2020 року в Україні наведено згідно Державної служби статистики https://ukrstat.org/uk

За статистикою 2020 року було зареєстровано наступну кількість площ в усіх категоріях господарств по Україні (було взято 4 види розповсюджених овочевих культур): капуста – 69,2 тис.га; перець солодкий – 14,9 тис.га; томати – 70 тис.га, огірки – 50,3 тис.га, морква – 43,3 тис.га.

Як можна побачити, за даними статистики, найбільшу площу посівів виділено під томати (70,8 тис.га). Виходячи з цього, вирішуємо забезпечувати добривом саме цю культуру.

Наведемо таблицю 3.3 по кількості посівних площ томатів у кожній із областей, щоб зручніше було обрати одну із них.

Таблиця 3.3

Кількість посівних площ виділених під томати по областям

Область	Посівні площі, тис. га*
Вінницька	2,6
Волинська	0,8
Дніпропетровська	6,8
Донецька	2,8

Житомирська	1,7
Закарпатська	1,8
Запорізька	2,4
Івано-Франківська	0,5
Київська	3,5
Кіровоградська	3,0
Луганська	0,9
Львівська	1,1
Миколаївська	5,8
Одеська	3,0
Полтавська	4,8
Рівненська	0,8
Сумська	1,8
Тернопільська	1,1
Харківська	5,9
Херсонська	12,2
Хмельницька	0,9
Черкаська	2,5
Чернівецька	2,2
Чернігівська	1,9

* Примітка: дані щодо посівних площ на сезон 2020 року в Україні наведено згідно Державної служби статистики https://ukrstat.org/uk

Як можна побачити у Херсонській області, за даними статистики, зареєстровано найбільшу кількість посівних площ під томати (12,2 тис.га). Виходячи з цього, вирішуємо забезпечувати Азотобактерином Херсонську область.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Потребу у Азотобактерині будемо розраховувати на кількість посівних площ томатів, під час поливів грунту при висадці розсади.

Для цього порахуємо необхідну кількість добрива для забезпечення даної області, при тому що кількість препарату для однієї обробки 1 га поля складає 1 кг (табл.1.1), а кількість обробок – 1 раз на рік:

12 200 га * 1 кг/га *1 раз на рік = 12 200 кг

Оскільки, у сухому препараті близько 90 % – це наповнювач (каолін), і лише 10% припадає на біомасу, її кількість:

12 200 кг * 0,1 = 1 220 кг

В Україні досить велика кількість бактеріальних препаратів для рослин на основі *Azotobacter* широкого спектру застосування, як для замочування насіння чи розсади, внесення гранул в грунт, обприскування грунту перед посівом чи при вегетації рослин, а отже для розрахунку кінцевої потреби потрібно врахувати конкуренцію з іншими найбільш популярними добривами. Представляємо 7 таких препаратів у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Порівняльна таблиця бактеріальних добрив з використанням *Azotobacter chroococcum* на ринку України

Назва препарату	Форма	Вміст КУО на дозу	Ціна за упаковку та кількість доз*	Виробник	Література
Азотобактерин-К	рідина	1x10^9 КУО/см^3	1050 грн 1 л	« Біоінвестр - Агро» Україна	1
Азотофит-Р	рідина	1x10^8 КУО/см^3	210 грн 1 л	«БТУ-центр» Україна	2
Азогран	Рідина	1x10^9 КУО/см^3	180 грн 1 л	ТОВ «Біонік» Україна	3
Ембіко	рідина	1x10^8 КУО/см^3	81 грн 1 л	Науково-виробниче підприємство "Нові біотехнології" Україна	4
Біомаг	рідина	1x10^9 КУО/см^3	193 грн 1 л	«ENZIM» Україна	5
Азогран	суха	1x10^9 КУО/см^3	10 грн	«ENZIM» Україна	5

			10 г		
Азот	рідина	1x10^9 КУО/см^3	336 грн 1 л	«Біонорма» Україна	6

1. https://bioinvest.com.ua 2. https://prom.ua 3.https://bioshield.all.biz/udobreniya-azogran-g17537610 4. http://embiko.com.ua

5. https://market.enzim.biz/agro 6. https://www.bio-norma.com/bionorma/azot-1l/

*Примітка: Ціни на препарати взяті з українських промислових інтернет магазинів, станом на 2020 рік.

Враховуючи наявні на ринку інших біодобрив (табл. 1.4), будемо проводити розрахунки для забезпечення 15 % від вказаної кількості:

1 220 кг * 0,15 = 183 кг препарату на рік.

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для забезпечення потреби Азотобактерину в Україні необхідно виробляти 183 кг біомаси на рік. Продуктивність продуцента становить ($X_{кр}$): 12 г/л біомаси за 48 год культивування. Приймаємо вологість сухої біомаси 5 %, відповідно абсолютно сухої її буде $СР_{біом}$ = 95%.

1) Кількість продукту на добу. Приймемо кількість робочих трудоднів ($Т_{рд}$) 85, тоді кількість продукту на добу становитиме:

$G_{нтд}= G_{нд} / Т_{рд}$ = 183 / 85 = 2,15 кг/добу

2) Розрахуємо кількість продукту за один цикл:

$G_{цк}= G_{нд} * Т_{цф} / 24$ = (2,15 * 58) / 24 = 5,2 кг/цикл.

де – $Т_{цф}$ цикл роботи ферментера (58 год), що включає час біосинтезу (48 год), та час підготовки ферментера – 10 год. Підготовка ферментатора включає: миття та огляд – 2 год, перевірка на герметичність – 2 год, стерилізація – 2 год, охолодження – 1 год, завантаження середовища – 1,5 год, засів – 0,5 год, відвантаження культуральної рідини – 1 год.

3) Об'єм культуральної рідини, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат за виробничий цикл ($Е_{св}$=10%), $К_1$ –коефіцієнт запасу, що враховує ймовірність нестерильних операцій (1,1-1,5):

$V_{кр}= К_1*G_{цк}*СР_{біом} /Х_{кр}*(1-Е_{св}) = 1,1*5,2*0,95 / 12*(1-0,1) = 0,5$ м^3

4) Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезі $Е_ф$ = 0,1 становить:

$V_ф = V_{кр}/(1-Е_ф) = 0,5 / (1-0,1) = 0,55$ м^3

5) Геометричний об’єм ферментера для отримання 0,55 м^3 культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$V_г = V_ф/К_{зап} = 0,55 / 0,6 = 0,92$ м^3, найближчий ферментер 1 м^3.

Перевіряємо коеф. заповнення: $К_з$ = 0,55 / 1 = 0,55. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

6) Кількість циклів на рік:

$N_{цк} = G_{нтд} / G_{цк} = 183 / 5,2 = 36$ цикл/рік

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл необхідно отримати $V_{кр}$ = 0,5 м^3 культуральної рідини, але слід врахувати втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 % ($Е_ф$).

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_ф} = \frac{0,5}{1 - 0,1} = 0,55 \text{ м}^3$$

де $E_ф$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Для культивування необхідний ферментер, геометричний об’єм якого становить:

$$V_{ф.1} = \frac{V_{роб.1}}{Кз} = \frac{0,55}{0,6} = 0,92 \text{ м}^3$$

Найближчий за номінальним об’ємом ферментер $V_{сф}$ = 1 м^3.

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{0{,}55}{1} = 0{,}55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + X_{\text{ф}}} = \frac{0{,}55}{1 + 0{,}1} = 0{,}5 \text{ м}^3$$

де $X_ф$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 0{,}55 - 0{,}5 = 0{,}05 \text{ м}^3$$

Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для вирощування культури у посівному апараті об'ємом 100 л

Необхідно отримати 0,05 м^3 посівного матеріалу, але слід врахувати втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 % ($E_ф$).

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{0{,}05}{1 - 0{,}1} = 0{,}055 \text{ м}^3$$

Посівний матеріалу для засівання інокулятора можна отримати під час культивування продуцента у апараті об'ємом:

$$V_{ін1.} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{\text{Кз}} = \frac{0{,}055}{0{,}6} = 0{,}92 \text{ м}^3.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{ін1} = 0{,}1$ м^3

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{ін1}}} = \frac{0{,}055}{0{,}1} = 0{,}55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1+X_{\text{ін}}} = \frac{0{,}055}{1+0{,}1} = 0{,}05 \text{ м}^3 = 50 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0{,}055 - 0{,}05 = 0{,}005 \text{ м}^3 \ (5 \text{ л})$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л

Для одержання 5 л посівного матеріалу розрахунки проводяться аналогічно.

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{5}{1 - 0{,}1} = 5{,}5 \text{ л}$$

Посівний матеріалу для засівання інокулятора можна отримати під час культивування продуцента у апараті об'ємом:

$$V_{ін.2} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{\text{Кз}} = \frac{5{,}5}{0{,}6} = 9{,}2 \text{ л}$$

Найближчим за номінальним об'ємом інокулятор $V_{ін2} = 10$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{ін2}}} = \frac{5{,}5}{10} = 0{,}55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{5{,}5}{1 + 0{,}1} = 5 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 5{,}5 - 5 = 0{,}5 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Для одержання 0,5 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0{,}2$. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пмз}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{500}{750 \times 0{,}2} = 4 \text{ колб}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 качалочних колб.

Отже, процес підготовки інокуляту для виробничого біосинтезу у 1 м^3 ферментері з коефіцієнтом заповнення 0,6 складається з 3 стадій.

Для отримання азотобакерину необхідно забезпечити виробництво ферментером об’ємом 1 м^3, інокуляторами об’ємами 100 л, 10 л та качалочними колбами.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Ростовим субстратом у поживному середовищі для біосинтезу Азотобактерину є меляса, яка містить 50-60 % сахарози. Згідно KEGG, катаболізм сахарози відбувається за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколіз). Наводимо схему перетворення даного вуглеводу.

Спочатку сахароза перетворюється на фруктозу за допомогою ферменту бета-фруктофуранозидази (КФ 3.2.1.26). Потім фруктокіназа (КФ 2.7.1.4) каталізує до D-фруктоза-6-фосфату. Далі фермент глюкозо-6-фосфатна ізомераза (КФ 5.3.1.9) залучається до перетворення D-фруктозо-6-фосфату на D-глюкоз-6-фосфат.

Гліколізу притаманні певні особливості, пов’язані з ферментами, що функціонують у даному метаболічному шляху. Так, перетворення D-глюкоз-6-фосфат на α-D-глюкозо-1-фосфат та на α-D-глюкозо-6-фосфат відбувається під дією ферменту фосфоглюкомутази (КФ 5.4.2.2).

Фермент глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9.) каталізує взаємне перетворення α-D-глюкозо-6-фосфату на β-D-фруктозо-6-фосфату та β-D-глюкозо-6-фосфату. Потім 6-фосфофруктокіназа 2 (КФ 2.7.1.11) активує перетворення β-D-фруктозо-6-фосфату на β-D-фруктозо-1,6-дифосфат частина якого за допомогою фруктозо-1,6-біфосфатази I (КФ 3.1.3.11) зворотно перетворюється на β-D-фруктозо-6-фосфат.

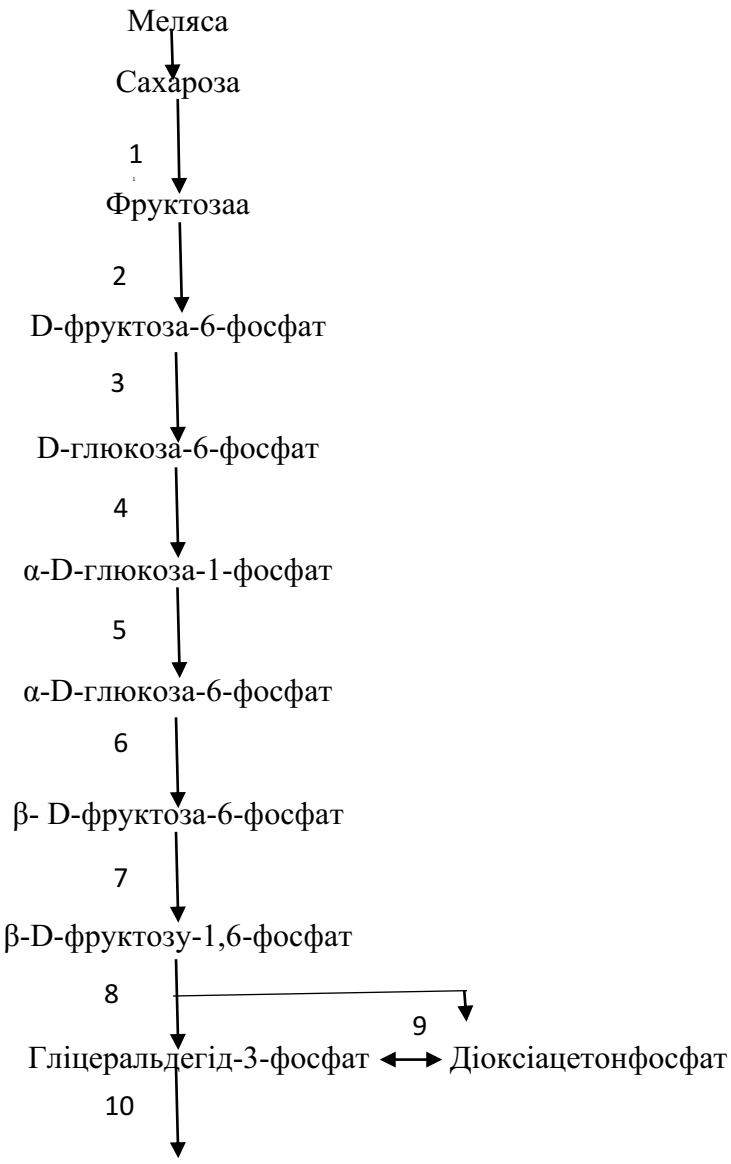
На наступному етапі під дією ферменту фруктозодифосфатальдолази, клас II (КФ 4.1.2.13) здійснюється перетворення β-D-фруктозо-1,6-дифосфату

на дві сполуки: гліцеральдегід-3-фосфат та дигідроксиацетонфосфат.

В свою чергу фермент тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) взаємно перетворюється з дигідроксиацетонфосфат на гліцеральдегід-3-фосфат.

Далі фермент гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12) залучається до перетворення гліцеральдегід-3-фосфату на 1,3-дифосфогліцерат, який під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) перетворюється на 3- фосфогліцерат.

Фермент фосфогліцератмутаза каталізує перетворення 3-фосфогліцерату до 2-фосфогліцерату, який за допомогою енолази (КФ 4.2.1.11) перетворюється на фосфоенолпіруват.



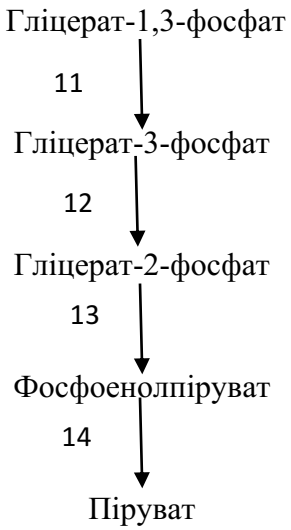


Рис.4.1. Катаболізм сахарози у *Azotobacter croococcum* згідно KEGG (див. додаток 5)

Ферменти: 1 – бета-фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26); 2 – фруктокіназа (КФ 2.7.1.4); 3 – глюкозо-6-фосфатна ізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 – фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 5 –фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 6 – глюкозо-6-фосфатна ізомераза (КФ 5.3.1.9); 7 **–** 6-фосфофруктокіназа 2 (КФ 2.7.1.11); 8 – фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); 9 –тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); 10 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 11 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 12 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 13 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 14 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

Заключним етапом є перетворення фосфоенолпірувату на піруват за допомогою піруваткінази (КФ.2.7.1.40). Далі піруват залучається до метаболізму за участю піруватдегідрогенази Е1 (КФ.1.2.4.1) та піруватдегідрогенази Е2 (КФ.2.3.1.12).

Усі реакції гліколізу, за винятком трьох (гексокіназної, фосфорукто-кіназної та піруваткіназної), повністю оборотні.

Анаплеротичні реакції: карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату (фермент піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1)) та карбоксилювання

фосфоенолпірувату з утворенням оксалоацетату (фермент фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (КФ 4.1.1.49).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Так як Азотобактерин – препарат на основі біомаси мікроорганізмів *Azotobacter chroococcum*, то біосинтез включає синтез основних органічних сполук, а саме амінокислот, нуклеотидів, вуглеводів та ліпідів.

Біосинтез амінокислот

Більшість мікроорганізмів можуть синтезувати всі 20 амінокислот.

Всі необхідні для синтезу білків 20 амінокислот утворюються з певних метаболічних попередників.

Вихідними сполуками для амінокислот є – піруват, оксалоацетат, фосфоенолпіруват, фосфогліцерат, 2-оксоглутарат.

Утворення глутаміну з глутомату каталізується глутамінсинтетазою. За допомогою глутаматсинтетази аміногрупа глутаміну може бути перенесена на 2-оксоглутарат з утворенням глутамату. Аланін та аспартат синтезуються з пірувату та оксалоацетату трансамінуванням з використанням глутамату як донора аміногрупи. Аспаргін синтезується глутамінсинтетазою. Відновлення аспартату дає напівальдегід аспаргінової кислоти – попередник лізину, треоніну, ізолейцину та метіоніну. Дезамінування треоніну проводиться до утворення 2-оксобутирату, який в результаті послідовної дій 4 попередніх ферментів перетворюється на ізолейцин. Під дією 4 ферментів піруват перетворюється на валін; проміжний продукт синтезу валіну є попередником в утворені лейцину. Серин, гліцин та цистеїн синтезуються з 3-фосфогліцерату, пролін – аргінін – із глутамату [17].

Гістидин синтезується не з 5-фосфорибозил-1пірофосфат, а з глутомату, оскільки не має відповідного ферменту гістидинол-фосфатази (КЗ 3.1.3.15).

Біосинтез ароматичних амінокислот з утворенням 1) триптофану через антранілат, 2) утворення тирозину і феніланаліну через префенат.

Біосинтез нуклеотидів

Попередниками піримідинових нуклеотидів є карбамоїлфосфат та аспартат. Карбамоїлфосфат синтезується з карбамоїлфосфатсинтетази. Рибозо-5-фосфат, утворений у пентозофосфатному циклі, активується щляхом перетворення у 5-фосфорибозил-1-пірофосфат. Реакція 5-фосфорибозил-1-пірофосфату з оротатом дає оротидинмонофосфат, який далі декарбоксилюється в уридинмонофосфат.

Синтез пуринових нуклеотидів: з 5-фосфорибозил-1пірофосфату утворюється імідазольний нуклеотид. Три атоми піримідинового кільця, необхідні для утворення пуринового кільця з імідазольного нуклеотиду, поступають з бікарбонату, аспартату та формілтетрагідрофолієвої кислоти. Замикання кільця дає інозинмонофосфат (пуриновий нуклеотид, ІМФ) далі до АТФ та ГТФ [17].

Біосинтез ліпідів

Попередником фосфо- та гліколіпідів є фосфатидна кислота, яка утворюється з 3-фосфогліцерину та ацетил-КоА. За участю ЦТФ з фосфатидной кислоти утворюється ЦТФ-діацилгліцерин. З нього ж синтезується фосфатидилсерин, фосфатидилетаноамін та фосфотидилгліцерин.

Попередником жирних кислот є ацетил-КоА. Далі з ацетил-КоА синтезуэться малоніл-КоА, за допомогою ферменту ацетил-КоА-карбоксилази. В свою чергу малоніл-КоА перетворюється на малоніл-АПБ, завдяки приєднання АПБ (ацилпереносний білок), який виконує функцию затравки [17].

Біосинтез вуглеводів.

У грамнегативних бактерій муреїнова сітка є одношаровою, а також зовнішня мембрана, що складається з білків, фосфоліпідів і ліпополісахаридів (ЛПС).

Попередником ліпополісахариду є гексозаміни, які утворюються з фруктозо-6-фосфату, який перетворюється в глюкозамін-6-фосфат: за рахунок глутаміна як

донора аміногрупи. З глюкозамін-6-фосфату утворюються інші гексозаміни. УДФ-N-ацетилмурамова кислота та УДФ-N-ацетилглюкозамін − попередники пептидоглікану – також синтезуються з глюкозамін-6-фосфату [17].

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1 Обгрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обгрунтування способу культивування і типу ферментера

Спосіб культивування *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д обираємо на основі фізіолого-біохімічних ознак продуцента. Тому важливим є визначення таких умов:

1. Для культивування *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д необхідно створити кисневі умови, так як продуцент є аеробом. Для забезпечення таких умов використовують барботер для подачі кисню, перемішуючий пристрій для інтенсифікації масообмінних процесів та піногасника.

2. В мікробіологічній промисловості використовують два способи культивування мікроорганізмів – поверхневий і глибинний. Глибинне культивування має ряд переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно зменшити виробничі площі, виключити тяжку ручну працю (високий рівень автоматизації), покращити гігієну праці, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва, робить можливий перехід на безперервний спосіб культивування.

3. Режим культивування обираємо періодичний. Процес ферментації проводять до стаціонарної фази розвитку культури, так як в цій фазі біологічно активні речовини виділяються з клітини і залишаються в культуральної рідини. Причинами вибору періодичного культивування в основному є малотоннажні і широкий асортимент продуктів, що виробляються, а також особливості культивування тих чи інших продуцентів, що не дозволяє уніфікувати як ферментери, так і їх технологічне оснащення.

Все це разом часто робить економічно невигідним впровадження безперервних технологій [18].

4. Оптимальні умови росту *Azotobacter chroococcum d10* - температура 29 ± 31°С при pH 7,0-7,5, концентрація NaCl - 0,2 -0,3 г / л.

Таким чином, культивування продуцента Азотобактерину *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д здійснюється в аеробних умовах, глибинним способом у періодичному режимі протягом 48 години при дотриманні усіх правил асептики.

З метою інтенсифікації масо- і енергообміну клітин з середовищем розроблені апарати аеробної глибинної ферментації. Але ці апарати мають більш складну конструкцію.

З точки зору конструктивних особливостей ферментери розрізняються за способами підведення енергії та аерації середовища:

1) ферментери з підведенням енергії до газової фази;

2) ферментери з підведенням енергії до рідкої фази;

3) ферментери з комбінованим підведенням енергії.

У ферментерах з підведенням енергії до газової фази аерація та перемішування субстрату відбувається стисненим повітрям. До таких апаратів відносяться:

1) барботажні ферментери. Подача повітря в них здійснюється через барботажні пристрої, які розташовані в нижній частині апарату;

2) апарати з дифузором. Змішування субстрату з повітрям, який надходить з труб, відбувається в нижній частині апарату за допомогою внутрішнього циліндр-дифузора;

3) трубчасті ферментери. Під дією потоку повітря рідина циркулює по реактору і сепаратору;

4) ферментери з форсунковим розподілом повітря. Повітря в таких ферментерах подається через форсунки, розташовані в нижньої частини апаратів;

5) ферментери колонного типу виконані у вигляді циліндричної колони, яка розділена горизонтальними перегородками на кілька секцій. У таких пристроях повітря барботує через шар рідини кожної тарілки, за рахунок руху рідини через кільцеву щілину забезпечується протитечійний рух двох фаз - газової та рідкої.

До ферментерів з підведенням енергії рідкої фазі відносяться:

1) апарати з самовсмоктуючьою турбіною складаються з циліндричного дифузора і мішалки з лопатями і валом. При обертанні мішалки створюється розрідження, яке призводить до підйому рідини в кільцевому зазорі між дифузором і стінками апарату з подальшим її поверненням в дифузор;

2) ферментери з турбоежекторними перемішуючими пристроями. Ці пристрої розділені вертикальними перегородками на кілька секцій. У кожній секції є ежектор і дифузор. Переміщення рідини з однієї секції в іншу відбувається через вікна в перегородках.

Ферментери з комбінованим підведенням енергії являть собою циліндричну посудину, усередині якої розташована механічна мішалка і барботер. В апаратах цього типу підведення енергії до газової фази здійснений для аерації, а до рідкої фазі - для перемішування [19].

Оскільки заданий об`єм ферментатора нашому випадку становить 1 м$^3$. коефіцієнт заповнення становить 0,6 = 60%. Обираємо ферментер-біореактор фірми «BIORUS» повним об`ємом у 1000 л з нержавіючої сталі. Ферментери відрізняються великою функціональністю і підходять для періодичної ферментації. Всі дані вимірювань і контрольні параметри відображаються на кольоровому сенсорному екрані. Ферментер в стандартній комплектації оснащений насосами, за допомогою яких виконується подача кислоти, луги, піногасника і поживного середовища. В процесі ферментації, управління всіма параметрами здійснюється через сенсорну панель управління. Доступні варіанти мішалок з одинарним

механічним ущільненням, подвійним механічним ущільненням з мастилом, з верхнім приводом, а також мішалки з магнітним приводом.

Подача повітря в ферментер здійснюється через стерилізуючий фільтр, через ротаметр. Система комплектується кільцевих барботером. На лінії виходу газу з ферментера встановлений конденсор для конденсації вологи, що випаровується. Контроль температури здійснюється шляхом подачі охолодженної води, для охолодження, в металеву сорочку. Автоматичний контроль піногасіння здійснюється за допомогою електрода датчика піни [20].

При вирощуванні аеробних мікроорганізмів вміст ферментера безперервно перемішується спеціальними мішалками, постійно аерується пропусканням під тиском стерильного повітря, що утворює безліч дрібних бульбашок. Повітря доставляє кисень і, проходячи через апарат, видаляє аміак і вуглекислоту [21].

Механічні мішалки за конструкцією вельми різноманітні. Найбільш простими за влаштуванням є мішалки з плоскими лопатями встановленими перпендикулярно або похило до напрямку їх руху. Для поліпшення перемішування рідини частіше застосовують мішалки з горизонтальними і вертикальними лопатями або так звані рамні мішалки, у яких нижня горизонтальна лопать має радіус кривизни.

У тих випадках, коли при перемішуванні необхідно видаляти осад або рідину зі стінок апарату, для інтенсифікації процесу теплообміну застосовують якірні мішалки, зовнішній контур яких відповідає контурах дна і корпусу апарату. Турбінні мішалки застосовують для швидкого розчинення і емульгування. У поєднанні з апаратом їх використовують для диспергування і в поєднанні з барботером для процесів взаємодії газу з рідиною. Для поліпшення перемішування маси рідини по всій висоті (часто необхідно при проведенні безперервних процесів) застосовують пропелерні мішалки з декількома пропелерами і дифузором [22].

Для процесу отримання біомаси з поживного середовища, яке має не високу в'язкість, а процес біосинтезу потребує інтенсивного перемішування та аерування доцільно використовувати якірну мішалку та частотним регулятором обертів.

Обраний ферментер забезпечений пристосуваннями для достатньої аерації і перемішування культури, підтримки необхідної температури, а також контрольно-вимірювальними приладами.

5.1.2. Обгрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Оскільки, *Az. chroococcum* d 10 ВКМ У-2272 Д росте в аеробних умовах, однією із важливих умов, при культивуванні, є підготовка стерильного аераційного повітря.

В лабораторних боксах, де проходять роботи з посівною культурою та інокулятом, для стерилізації повітря використовують ультрафіолетові лампи.

При вирощуванні мікроорганізмів глибинним способом потрібна безперервна подача стерильного повітря в ферментери, на аерацію для культуральної рідини. Повітря, що подається в ферментер, не тільки постачає культуру киснем, а й відводить газоподібні продукти обміну і фізіологічне тепло, що виділяється мікроорганізмом в процесі розвитку.

У процесі мікробного синтезу повітря, що подається на аерацію, повинно бути очищений від домішок і мікробіоти розміром до 1 мкм [23].

Підготовка аераційного повітря складається з таких стадій:

Забір атмосферного повітря. Забір повітря потрібно здійснювати зовні приміщення, із затінених і найменш забруднених місць. Повітряна частина складається з корпусу з шибером, завихрювача, заслінки і корпусу примусової подачі повітря.

Важливе значення має вибір місця для забора атмосферного повітря. Слід враховувати, що чим нижча температура всмоктуваного повітря, тим менше міститься в ньому вологи і тим вища його щільність.

Всмоктуване повітря обов'язково має проходити через пристрої, які очищають його від механічних домішок і вологи. Відносна вологість повітря, що надходить у компресор, не повинна перевищувати 65 %. При більшому вологовмісті всмоктуваного повітря необхідно передбачати його осушення [24].

Очищення повітря від пилу на пласких тканинних фільтрах грубого очищення. Фільтри грубого очищення призначені для уловлювання основної маси забруднення, від грубого аерозолю – пилу. Фільтри попереднього очищення не тільки захищають компресори від забруднення, але й істотно знижують кількість контамінантів, що могли б потрапити в 2–гу підсистему.

Обираємо карманний фильтр ФяК G-3, середня пилезатримальна здатність, по синтетичному пилу 80 %. Як фільтруючий матеріал обираємо скловату. Фільтр грубої очистки стерилізуємо гострою парою протягом 2 годин при тиску 0,4 мПа. Після стерилізації проводиться просушування фільтра стерильним нагрітим повітрям [25].

Після цього повітря стискають у турбокомпресорі до 0,35–0,5 МПа. Тиск стиску повітря в компресорі визначають з розрахунку тиску на подолання опору в системі повітряпідготовки, тиску стовпа рідини у ферментаторі і створення в ньому тиску 0,13–0,14 МПа. Стиснення повітря в компресорі приводить до підвищення його температури до 120–250°С и збільшенню вологовмісту на одиницю об'єму.

Після стиснення повітря відбувається його охолодження до температури 25-30 °С, за якої волога повітря конденсується. Для цього використовується водяний теплообмінник-охолоджувач.

Далі відбувається видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора в ресивер. Ресивер зменшує пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на робота подальших фільтрів очищення повітря [25].

Після видалення вологи відбувається нагрівання повітря.

Очищення повітря на фільтрах тонкого очищення. На підприємствах ферментної промисловості використовується фільтр типу ФТО, всередині якого викладається елемент із хімволокна. Ступінь очищення з використанням фільтрів ФТО становить 95 %. Обираємо фільтр F-8 [26]. Такий фільтр звичайно розташований на території заводу поруч з цехом. На головному фільтрі очищають повітря для усіх ферментаторів цеху.

Очищення повітря на фільтрах індивідуального очищення. Для очищення повітря використовується мембраний фільтр Emflon Filrer.

Фільтр встановлюють перед кожним інокулятором, виробничим ферментером та посівним апаратом і забезпечує очистку повітря від часток діаметром 0,2 мкм. Отримуємо стерильне аераційне повітря зі ступенем очищення – 99,995%.

Стерилізація фільтра проводиться гострою парою в технологічній обв'язці з ферментатором без вилучення фільтруючих елементів з корпусу фільтра .

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Виробництво Азотобактерину здійснюється упродовж 85 днів, що передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об’ємом 1 $м^3$, інокулятори об’ємами 100 л, 10 л, реактори-змішувачі, качалки, а також бокс та лабораторне устаткування.

Виробниче приміщення включає такі цехи: цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту, качалочна кімната та лабораторне приміщення, де знаходяться бокс, термостати, холодильники, апаратура для проведення контролю. Відстань між стінами та апаратами становить 1 – 1,5 метра. Ширина проходів між ємнісними апаратами складає 1 метр.

Габаритні розміри основного обладнання наведено у *табл. 5.1*.

Таблиця 5.1.

Габаритні розміри основного обладнання для виробнитва Азотобактерину

Обладнання	**Геометричний розмір, л**	**Діаметр, мм**	**Висота, мм**
Ферментер	1 000	1000	2 000
Інокулятор1	100	500	1 500
Інокулятор2	10	250	800
Реактор змішувач композиції А1	25	200	450
Реактор змішувач композиції А2	250	450	1 000
Реактор змішувач композиції Б1	25	100	300
Реактор змішувач композиції Б2	250	700	1 500
Реактор змішувач композиції В1	30	500	1 000
Реактор змішувач композиції В2	300	250	500
Всього	**1 990**		

Згідно даним наведеним в *рис. 5.2*., загальний об'єм ферментеру, інокуляторів та реакторів-змішувачів для вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу становить 1 990 л, для одного циклу, тоді для 36 циклів – 71 640 л. Об'єм мийного засобу складатиме приблизно половину кожного з відповідних об'ємів обладнання, тобто 169 150 / 2 = 35 820 л.

Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій встановлений ферментер (1 $м^3$), посівні апарати, інокулятори (100 л та 10 л), збірники, автоклав та інше обладнання становить 156 $м^2$ (14*12 м). Висота стін – 2,5м. Площа підлоги – 156 $м^3$.

Загальна площа стін приміщення:

$$((14*2,5) + (12*2,5))*2 = 130 \text{ м}^2$$

Для проведення розрахунку витрат мийних та дезінфікуючих засобів приймаємо, що обладнання та комунікації підлягають очищенню перед кожним виробничим циклом (кількість циклів становить 36), тобто 36 разів (додаткове миття після останнього циклу). Підлога миється кожен робочий день, 85 разів; стіни, вікна та двері – раз на місяць, 3 рази.

Визначимо площі поверхні, які необхідно мити та/або дезінфікувати (табл.5.2.).

Таблиця 5.2.

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва Азотобактерину

Об'єкт миття та/або дезінфекції	**Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м^2 (м^3)**	**Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва**	**Загальна площа (об'єм) оброблюваного об'єкту за весь період виробництва, м^2 (м^3)**
Обладнання, інвентар, комкнікації	1,068	85	90,78
Підлога	156	85*2	26 520
Стіни, двері, вікна	130	3	390

Загальна площа поверхні підлоги, стін, вікон та дверей складає 26 520 + 390 = 26 910 м^2

Основні вимоги до дезінфікуючих засіб: виражена ефективність по відношенню до різних видів мікроорганізмів; низька токсичність та алергенність для людини; екологічна нешкідливість; хороша розчинність у воді; нешкідливість по відношенню до об'єктів, які піддаються обробці; простота застосування;

тривалість терміну зберігання без втрати активності та додаткові вимоги — можливість їх застосування без засобів захисту; наявність мийних властивостей; здатність до очищення [27].

1. Прибирання приміщень (стіни, двері, вікна) проводять вологим способом протирають ганчір'ям, змоченим розчином засобу (хімічний спосіб дезінфекції), з наступною витримкою відповідно до експозиції, а прибирання полів – методом двох відер.

Підлогу необхідно мити та дезінфікувати кожного дня 2 рази на день (85*2=170 разів), стіни, двері та вікна – 1 раз на місяць (3 разів).

Чистота повітря в приміщеннях повинна відповідати встановленим нормам. Обираємо періодичність включення стельових бактерицидних ламп – 1 годину після кожного генерального прибирання та 0,5 години кожного робочого дня (фізичний спосіб дезінфекції).

Вибираємо наступні розчини для дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей:

Біолонг 100 % концентрат – володіє дезінфікуючими та миючими властивостями. До складу концентрата входить: бензалконію хлорид - від 8 до 14%, Н-октодецилдиметил (3-триметоксиселіл)пропіл, амонію хлорид - від 1 до 4%, ізопропіловий спирт - 11-20%. Завдяки їм досягається тривалий дезінфікуючий ефект (від 7 до 60 днів залежно виду патогенного фактора, на який впливає препарат). Ефективний відносно грамнегативних та грампозитивних бактерій (у т.ч. мікобактерій туберкульозу), поліовірусів, грибів роду Кандіда, дерматофітів, пліснявих грибів, має спороцидну дію. Засіб призначений для проведення поточної, профілактичної та заключної дезінфекції на всіх об’єктах, які підлягають санітарному нагляду. При контакті зі шкірою не викликає роздратування, оскільки відноситься до безпечних речовин. Пари в приміщенні не впливають на слизові оболонки і верхні дихальні шляхи. Робочий розчин 0,5-1%, при цьому передбачено протирання та обприскування [28].

«Вернедор-Плюс» – суміш четвертинних амонійних сполук (алкілдиметилбензиламоній хлорид і дидецилдметиламоній хлорид) – 9,0 %; полігексаметиленгуанідин гідрохлориду – 7,0 %; N,N-біс (3-амінопропіл) додециламіну – 3,0 %. Має антимікробну активність відносно грамнегативних і грампозитивних бактерій (включаючи мікобактерії туберкульозу, збудників внутрішньолікарняних і анаеробних інфекцій), вірусів (відносно усіх відомих вірусів-патогенів людини, патогенних грибів роду Кандіда, Трихофітон, пліснявих грибів, а також спороцидні, миючі, дезодоруючі властивості. За параметрами гострої токсичності засіб належить до 3 класу помірно небезпечних речовин при введенні у шлунок, в умовах інгаляційного впливу та при нанесенні на шкіру до 4 класу мало небезпечних речовин. Дезінфекцію проводять способами протирання, замочування, занурення і зрошування, робочий розчин 0,05-0,1% [29].

2. Санітарна обробка поверхонь обладнання, комунікацій, внутрішньоцехової тари та інвентаря складається з послідовного проведення таких операцій: механічне очищення і миття теплою (30±5 °С) водопровідною водою з мийними засобами; промивання водопровідною водою; дезінфекційну обробку робочим розчином; промивання гарячою (60±5°С) водопровідною водою.

Для миття ферментера, інокуляторів та реакторів використовуємо СІП-мийку.

Миття ферментера (1 $м^3$), інокуляторів (100 л, 10 л), збірників для приготування композицій для трьох стадій культивування відбуватиметься циркуляційним способом. Об'єм мийного засобу складатиме приблизно половину кожного з відповідних об'ємів обладнання.

Для миття обладнання вибираємо наступні засоби:

«ОКСІН ЛД 105» – лужний засіб на основі активного хлору для автоматичної і циркуляційної мийки та дезінфекції виробничого обладнання. Діючі речовини: натрій гіпохлорит – 4,0-6,0% (з активним хлором), натрій гідроксид –

2,0-7,0%, калій гідроксид – 1,0-5,0%). Використовується для миття та дезінфекції виробничого обладнання. Не ушкоджує алюміній, містить інгібітор корозії. Концентрація при автоматичній мийці: 0,5-5%, температура до 60 °С, експозиція 5-30 хвилин [30].

Кальцинована сода – універсальний дезінфектант з потужним бактерицидним ефектом, що засноване на сильних лужних характеристиках. У водних розчинах частково розкладається з утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату, які зумовлюють мийні властивості і формуванням мильної консистенції. У вигляді 2-3% -го гарячого (70 °С) розчину справляється з великою кількістю інфекцій, спровокованих бактеріями і вірусами, добре обмилюють жирові забруднення на поверхнях та руйнують білки. Має не надміру токсичність для людей. Забезпечює знезараження навіть при наявності органічних речовин [31].

Приблизно на 1 $м^2$ затрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дезинфікувального засобу (згідно наказу МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Біолонг – засіб з пролонгованою дією, будемо використовувати для дезінфекції підлоги 1 раз на 7 днів (12) і 3 разів для дезінфекції стін, дверей та вікон.

Засоби варто застосовувати з інтервалом в 3 місяці для запобгання розвитку стійких штамів мікроорганізмів.

Таблиця 5.3.

Орієнтовний розрахунок потреби в дезінфекційних засобах для дезінфекції поверхонь у приміщеннях, обладнання тощо на 2020 рік

Назва мийного/дезінфікувального засобу	**Об'єкт миття та/або дезінфекції**	**Концент-рація робочого розчину, %**	**Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м^2 (л)**	**Кількість робочого розчину за весь період виробництв, л**	**Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікува-льного засобу, грн**	**Вартість 1 л робочого розчину**	**Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн**
Кальценована сода	Обладнання	2,0	35 800	17 900	11	0,22	4 000
ОКСІН ЛД 105	Обладнання	0,5	35 800	17 900	34	0,17	3 000
Вернедор-Плюс	Стіни, підлога, вікна, двері	0,1	26 900	3 580	330	0,33	1 200
Біолонг	Стіни, підлога, вікна, двері	0,5	26 900	3 580	90	0,45	1 600

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез Азотобактерину досягається за умови росту штаму *Az. chroococcum* d 10 ВКМ У-2272 Д на середовищі такого складу (г/л): меляса - 30,0; K_2HPO_4 - 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,3; NaCl -0,3; K_2SO_4 - 0,1; $FeSO_4$ - 0,005; $MnSO_4$ - 0,005; $(NH_4)_2MoO_4$ - 0,005; $CaCO_3$ - 3,5.

Згідно розрахунків, виробничий біосинтез Азотобактерину здійснюється у ферментері 1 $м^3$, що містить 550 л середовища. Одержання інокуляту відбувається у 3 етапи.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.

Об'єм середовища, необхідний для вирощування посівного матеріалу в колбах, становить 0,45 л. При аналізі склад поживного середовища для *Az. chroococcum* d 10 ВКМ У-2272 Д для культивування можна поділити на такі композиції (залежно від режиму стерилізації певних компонентів):

Композиція А: Меляса (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: $MgSO_4 \times 7H_2O$, NaCl, K_2SO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція В: $CaCO_3$ (режим стерилізації: 131 °С, 50 хв, 0,15 МПа).

Композиція Г: K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Основні солі (композиція Б) стерилізують окремо від фосфорних (композиція Г), щоб запобігти випадінню в осад фосфорних солей магнію при нагріванні.

Через невелику кількість $FeSO_4 \times 7H_2O$, $MnSO_4$, $(NH_4)_2MoO_4$ розчини цих солей готують окремо у вигляді 100 мл запасного розчинул (з розрахунку на використання в двох стадіях підготовки посівного матеріалу). Стерилізацію проводять у автоклаві при 131 °С впродовж 40 хв.

Стерилізація відбувається в автоклаві з вертикальним навантаженням.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторах та посівних апаратах

Об'єм середовища, необхідний для вирощування посівного матеріалу в інокуляторах, становить 5 л та 50 л. Поживне середовище поділяємо на такі композиції:

Композиція А: Меляса (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: $MgSO_4 \times 7H_2O$, NaCl, K_2SO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція В: $CaCO_3$ (режим стерилізації: 131 °С, 50 хв, 0,15 МПа).

Композиція Г: K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Основні солі (композиція Б) стерилізують окремо від фосфорних (композиція Г), щоб запобігти випадінню в осад фосфорних солей магнію при нагріванні.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Об'єм середовища, необхідний для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті, становить 500 л. Поживне середовище поділяємо на такі композиції:

Композиція А: Меляса (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: $MgSO_4 \times 7H_2O$, NaCl, K_2SO_4, K_2HPO_4, $FeSO_4 \times 7H_2O$, $MnSO_4$, $(NH_4)_2MoO_4$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція В: $CaCO_3$ (режим стерилізації: 131 °С, 50 хв, 0,15 МПа).

Солі композиції Б розчиняють в реакторі. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів Mg pH розчину з солями доводять до значення 4,5 6 %-вим розчином соляної кислоти. Для підкислення 1 л розчину необхідно 2 мл соляної кислоти.

Після закінчення стерилізації композиції Б розчин подають у ферментер стерилізують і дводять pH до 7 6%-вим розчином гідроксиду натрію. Для підлуження 1 л розчину необхідно 2 мл лугу.

Обгрунтування вибору розчинів для регуляції pH та піногасника

Титровані розчини використовуємо для регуляції рівня pH під час підготовки поживного середовища. В особливості це стосується фосфатних солей, які утворюють нерозчинні фосфати магнію. Для запобігання цього pH середовища при вирощування в інокуляторі та ферментері, перед стерилізацією підкислюють 6% розчином соляної кислоти до значення 4,5. Розчин кислоти стерилізації не потребує.

Для стабілізації pH, перед культивуванням середовище підлужують 6% гідроксидом натрія до pH 7,0. Розчин лугу попередньо стерилізуєм в автоклаві при 131 °С при 0,15 МПа впродовж 40 хв.

Піногасник. У складі поживного середовища є меляса, яка при перемішуванні у ферментері і інокуляторах буде пінитись. Для зменшення рівня піни використовуємо силіконовий піногасник **SILFOAM SE-40**. Піногасник буде вноситися (дозування – 0,1-2%) при реагуванні датчика рівня піни, стерилізації не потребує [32].

Отже, технологічна схема біосинтезу *Az. chroococcum* d 10 ВКМ У-2272 Д передбачає проведення таких допоміжних робіт:

1) приготування запасного розчину мікроелементів для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці та інокуляторів об’ємом 10л;
2) приготування 6% розчину HCl;
3) приготування та стерилізація 6% розчину NaOH;
4) приготування та стерилізація поживних середовищ.

Додаткове обладнання:

- Реактори-змішувачі для приготування та стерилізації композиції А об’ємом 25 л та 250 л.

- Реактори-змішувачі для розміщування та розчинення солей композиції Б об’ємом 25 л, 250 л.

- Реактори-змішувачі для приготування та стерилізації композиції В об’ємом 30 л та 300 л.

5.2. Обгрунтування стадій виділення цільового продукт

Біодобрива (також відомі як біоінокулянти), органічні препарати, що містять мікроорганізми корисні для сільського господарства з точки зору забезпечення поживними речовинами: азотом та фосфором.

Завданням виробництва бактеріальних добрив являється максимальне накопичення життездатних клітин, збереження їх життездатності на всіх стадіях технологічного процесу, приготування на їх основі готових форм препаратів із збереженням активності протягом гарантійного терміну придатності. Азотобактерин у сухій формі готують наступним чином: готову культуральну рідину відділяють від біомаси, отримують біомасу у вигляді пасти з вологою 70-80%, пасту направляють на висушування [3].

Отже, для виділення Азотобактерину будемо застосовувати такі методи:

1) Відділення біомаси від культуральної рідини;
2) Висушування.

Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання

Після культивування азотобактера, культуральну рідину збирають у збірник об’ємом 1 $м^3$, підтримуючи температуру в рубашці 29°С для унеможливлення швидкого вмирання клітин.

Необхідно відділити біомасу від культуральної рідини, для отримання зневодненої біомаси використовують різні способи виділення. До них відноситься фільтрування, центрифугування, сепаруваня.

В даний час фільтруючі системи бувають різного застосовування (барабанні, стрічкові, тарілчасті фільтри, вакуум-фільтри, фільтри-преси, мембранні фільтри) засновані на однаковому принципі – затримці біомаси на пористою фільтруючою перегородці. Недоліком способу є налипання клітин на фільтрі, шар яких знижує швидкість протоку рідини в процесі фільтрування. Для фільтрів безперервної дії передбачаються системи автоматичного очищення від біомаси, що забиває пори. Вона може здуватися з поверхні фільтрів стисненим повітрям або віддалятися спеціальними «ножами». Існують також фільтри для багаторазового або одноразового періодичного використання. Наприклад, мембранні фільтри, що дозволяють фільтрувати дуже розбавлені клітинні суспензії. Однак проблемою їх використання є швидка закупорка пір клітинами, білками і іншими колоїдними частинками [33].

Стрічковий вакуум-фільтр. Фільтр являє собою працюючий під вакуумом апарат безперервної дії, в якому напрямок сили тяжіння і рух фільтрату збігаються. Недоліком є низька ефективність процесу, яка обумовлена невеликою поверхнею фільтрування, наявність невикористаних зон на фільтрувальній стрічці, досить швидкий знос фільтруючої стрічки, громіздкість апарату, складність герметизації та дороговартість, тому виключаємо використання данного апарату [34].

Барабанний вакуумний фільтр є фільтром безперервного дії для поділу середньо- і грубодисперсних суспензій з вмістом твердої фази до 30%. Найбільш поширені барабанні фільтри з зовнішньою поверхнею фільтрування. Барабанні вакуум-фільтри мають високу ступінь механізації і дозволяють здійснювати фільтрування різних суспензій з постійною швидкістю. Перевагами вакуум-

фільтрів в порівнянні з іншими фільтрами є безперервність процесу і менша трудомісткість обслуговування. Однак рушійна сила фільтрації тут незначна через обмежену величини вакууму, який можна створити в секціях, тобто низька продуктивність та неможливість забезпечення асептичних умов, негнучкість режимів роботи (неможливо зміна часів фільтрування та промивання осаду). Таке обладнанання виключаємо.

Процес центрифугування здійснюють в відцентрових машинах, які представлені двома основними видами: центрифуги, рідинні відцентрові сепаратори. Центрифугування – процес розділення неоднорідних рідких середовищ або дисперсних систем у відцентровому полі. Для порівння розгленемо деякі центрифуги. Бувають періодичної та безперервної дії.

У порівнянні з різними способами поділу, центрифугування дозволяє отримувати осади з найменшою вологістю. Відцентрове осадження на відміну від фільтрування розмежовує суспензії з жорсткою дрібнозернистої фазою, величина яких досягає 5-10 мкм. Одне з провідних плюсів центрифугування - ймовірність проведення в апаратурі порівняно невеликих обсягів; дефект - висока енергоємність. Швидкість розділення сумішей в центрифугах значно вища, ніж у фільтрах [35].

У мікробіотехнології застосовують різні типи центрифуг: осаджувальні, шнекові, безперервного дії з вивантаженням осаду через сопла, саморозвантажні сепаратори й ін.

Для поділу низько- і средньоконцентрованих суспензій широкого поширення набули осаджувальні центрифуги безперервної дії зі шнекової вивантаженням осаду типу ОГШ. Конструктивною особливістю даних центрифуг є горизонтальне розташування осі циліндричного ротора з концентрично закріпленим всередині нього шнеком. В результаті різниці швидкостей

здійснюється транспортування утвореного осаду вздовж стінки ротора до його вузької частини, де розташовуються розвантажувальні вікна.

Успішне використання шнека в якості пристрою для вивантаження осаду знайшло застосування не тільки в осаджувальних, але і в фільтруючих центрифугах типу ФГШ. Ці машини добре зарекомендували себе в процесах поділу висококонцентрованих суспензій з крупнозернистою дисперсійною складовою. Отриманий осад накопичується на поверхні сита і при необхідності промивається рідиною, яка подається через промивний трубопровід. Для відведення використаної промивної рідини в кожусі центрифуги є спеціальна камера. У свою чергу осад після промивання транспортується до широкої частини ротора і скидається в камеру збору осаду [36].

Все ж таки на центрифугах ускладенене відділення біомаси Азотобактерину з концентрацією 1-2%, оскільки концентрація дисперсної фази при центрифугуванні повинна становити не менше 5%.

Центрифуги, що мають високий фактор поділу і оснащені тарілчастим барабаном, називають сепараторами. В мікробіологічній промисловості сепаратори є одним із самих поширених типів центрифуг. Сепаратори дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60-90%. В останні роки з’явилися спеціальні герметичні сепаратори, що дозволяють вести процес сепарування в автоматизованому режимі, оптимально підібраному для специфічних умов конкретних культуральних рідин.

Сепаратори поділяються на: сепаратор-роздільник, сепаратор-згущувач, сепаратор-прояснювач. Залежно від об’єму є сепаратори з різною системою видалення осаду: з ручним вивантаженням, з періодичним та безперервним.

При розділенні суспензії із змістом твердої фази до 3% вибираємо сепаратор с механічним вивантаженням осаду під дією відцентрових сил. Осад в такому сепараторі вивантажується періодично, після припинення подачі суспензії.

Сепарація має ряд переваг перед фільтрацією та іншими способами, а саме:

- більш висока інтенсивність процесу за рахунок більшої рушійної сили;

- матеріал обробляється з найменшими втратами активної речовини;

- процес легше піддається автоматизації, агрегати займають менше приміщень, легше здійснити мийку устаткування [37].

Сопловий сепаратор безперервної вивантаженням осаду. Вони призначені для обробки суспензій або поділу емульсій, що містять 6-15% осаду вологістю 80-85%. При цьому забезпечується безперервність процесів сепарації і вивантаження осаду. У цих сепараторах осад разом з частиною рідини компонента безперервно віддаляється через отвори сопел, розташованих на периферії, або через днище підстави ротора. На відмінну від інших центрифуг в сепараторі є пакет конічних тарілок, закріплених на валу ротора. Такий сепаратор використовують для досягнення меншої кількості вологи [38]. Соплова центрифуга розроблена для розділення або концентрації.

Вибір сепаратора. Із обгрунтування способів відділення біомаси, був обраний двофазний сопловий сепаратор (*рис.5.1*).

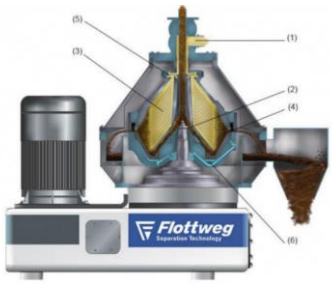


Рисунок 5.1. Сопловий сепаратор

Суміш надходить через стаціонарну вхідну трубу (1) в розподільник обертового барабану (2) (ємність, в якій знаходиться суміш). Там вона прискорюється до окружної швидкості барабана сепаратора. На зовнішній стороні підстави розподільника передбачені прорізи або отвори, через які відокремлюваний продукт надходить в простір з дисками. Поділ виконується у внутрішньому простору між дисками сепаратора (3). Тверда речовина під дією відцентрової сили прагне назовні і накопичується в так званій камері твердої речовини (4). Рідкі фази проходять через простір між дисками і також під дією відцентрової сили прагнуть в протилежну сторону до осі барабана, а далі випливають через диск поділу фаз (грейфер) або водозлив (5). Зібрана тверда речовина виходить по окремій випускній лінії (вивантаження твердої фази). Гідравлічний розвантажувальний механізм відкриває барабан сепаратора у виступаючій частині корпусу центрифуги, де збираються тверді речовини. Після виходу твердої фази барабан сепаратора знову закривається [39].

Обгрунтування способу сушіння та сушарки

Сушка є процес видалення вологи з твердих пористих матеріалів. У більшості випадків видаляється в процесі сушіння вода, що особливо характерно для біотехнологічних виробництв. Процеси мікробіологічного синтезу проходять в розбавлених водних розчинах, тому на останніх стадіях отримання цільових продуктів дуже часто постає завдання видалити зайву воду. В даний час існує безліч видів сушіння і конструкцій сушарок. За способом підведення тепла розрізняють:

- конвективну сушіння, яка відбувається при безпосередньому контакті з сушильним агентом (пнематичні, аерофонтанні, з псевдорозрідженим шаром, розпилювальні);
- контактну сушку з передачею тепла через стінку (шафові, вальцові сушарки);

- ліофільні сушку, засновану на сублімації води при низькому тиску.

Конвективная сушка проходить при взаємодії висушіваемо матеріалу з сушильним агентом. Як сушильний агента найбільш часто використовують попередньо нагрітий в калорифері повітря.

У сушарках з псевдозрідженим шаром процес сушіння протікає в шарі частинок, що знаходяться в підвішеному стані. За конструкції вони можуть бути однокамерними і багатокамерними, причому камери можуть розташовуватися в декілька ярусів. Сушарки такого типу особливо часто використовують в медичній промисловості через можливість чіткого дотримання правил GMP і поєднання декількох операцій в одному апараті (сушка, гранулювання, опудривание, покриття оболонкою). Швидкість газу підбирається таким чином, щоб вона потрапила в діапазон між швидкістю початку псевдоожиження і швидкістю витання дрібних частинок. У псевдоожиженном стані частки піддаються турбулентному стану. В таких обставинах існує висока ймовірність втрати продукту. Вимагає вільного руху частинок. Отже, липкі або клейкі матеріали не будуть рухатися вільно, тому використовувати це обладнання буде практично неможливо [40].

Вальцьові сушарки є сушарками неперервної дії і призначаються для сушіння текучих речовин (розчинів, колоїдів і суспензій). Як основний вузол вони мають один чи два порожніх обертових вальців, що обігріваються зсередини парою чи якимось іншим теплоносієм. На поверхні вальців за період менше ніж один оберт проходить висушування нанесеного тонким шаром рідкого чи пастоподібного матеріалу. Висушений матеріал зіскрібується з вальця шкребком чи спеціальними ножами. Виключаємо використання такої сушки, через те, що на вальці подається обігрів парою з температурою 150 °С, при короткочасна взаємодія дає до 12-15 % втрат життєздатності клітин [41].

У розпилювальних сушарках висушуваний продукт у вигляді розчину або суспензії подається в верхню частину апарату і розподіляється в об'ємі

сушарки у вигляді тонких крапель. Краплі взаємодіють з гарячим сушильним агентом, інтенсивно втрачають вологу і опускаються на дно апарату під дією сили тяжіння. Таким чином, швидкість подачі газу в цьому випадку повинна бути менше (приблизно в 2 рази) швидкості витання дрібних частинок. У цьому випадку вони будуть повільно опускатися вниз у процесі сушки. Недоліки розпилювальної сушки: складність обладнання для розпилювання й уловлювання сухих частинок; складність управління процесом і контролю якісних показників продукту при переробці; значні питомі габарити установок [40]. Така сушарка не підходить для данного продукту.

Сублімаційний (ліофільний) метод сушіння ґрунтується на вилученні вологи з матеріалу, який знаходиться у замороженому стані. При цьому лід переходить в газовий стан, оминаючи рідкий стан. Більшу частину часу сушіння матеріал знаходиться при температурі –15…–30°С. Оскільки процес ведуть при дуже низькому тиску (50…150 Па), то на матеріал не діє не тільки тепло, але й кисень повітря. При швидкому заморожування вологої біомаси можуть утворюватись кристалики льоду, які своїми гострими краями можуть зруйнувати або пошкодити біологічні мембрани і тоді клітині гинуть. Для попередження цього перед сушінням біомасу обробляють розчинами, які не дають утворювати кристали з гострими крами. Ліофілізація біологічних продуктів спрямована на збереження їх фізичної та біологічної цілісності після зберігання протягом декількох місяців. Ліофільна сушка трудомісткий процес: підготовка препарату до сушіння повинна бути ретельною, для повного висихання потрібно високий вакуум, сам процес досить тривалий і вимагає великих енерговитрат. Виключаємо використання такої сушки.

Вакуум сушильна шафа призначена для сушіння термолабільних продуктів, висушування препарату відбувається в тонкому шарі (0,5 мм) при температурі близько 30 °С і тиску 136 Па. Сушіння відбувається періодично, на

полиці завантажують вологий матеріал, після висушуванні до певної вологості матеріал вивантажують. Тривалість висушування в вакуум-сушильних шафах залежить від товщини шару, тиску, температури теплоносія та властивостей препарату. Другий період сушки менш інтенсивний, так як відбувається видалення вологи із глибинних шарів матеріалу. Вакуумне сушіння вимагає меншої витрати теплоти внаслідок (майже) відсутності втрат з повітрям, що викидається з сушарки [41]. Перевагою вакуум–сушарок у порівнянні з конвективними атмосферними сушарками є більш інтенсивне сушіння при низьких температурах, що важливо для речовин, які не витримують високої температури. Отже, для сушіння Азотобактерину обираємо вакуум сушильну шафу.

Вибір вакуум сушильної шафи.

Стандартна вакуум сушильна шафа забезпечена автоматичною системою. Крім того, в сушильних камерах, як правило, знаходиться вбудований таймер, за допомогою якого задається час сушіння. Технологія сушіння в вакуумних шафах приваблива тим, що вона надає істотну можливість набагато скоротити тривалість сушіння, при цьому зберігаючи якість висушених матеріалів. Завдяки створенню вакууму в обсязі камери, де протікає висушування матеріалів, істотно знижується вологість зразка. Іноді виникає необхідність створення більш глибокого вакууму. Такий вакуум в сушильній шафі утворюється за допомогою спеціального вакуумного насоса. Для створення глибокого вакууму використовують насоси пластинчато-роторні. Продукти в вакуумних сушильних шафах практично не втрачають свої початкові природні якості та не піддаються механічному тиску [42].

Обираємо вакуумну сушильну шафу СВ-150 (*рис.5.2*) (виробник: SpectroLab, Україна).

Рисунок 5.2. Вакуум сушильна шафа

Дана серія шафи призначена для делікатної сушки матеріалів і зразків, нестійких до високих температур. Вакуумна шафа може бути поставлена в комплекті з вакуумним насосом або вакуумною системою. Робочі поверхні шафи виготовлені з легованого алюмінія і кремній сталі 304, автоматичне регулювання температурного режиму [43].

Обгрунтування кінцевої форми продукту

Азотобактерин випускають у рідкій або сухій формі. Розглянемо їх. Рідка форма являє собою активну культуру азотобактера, вирощену на твердому поживному середовищі з подальшим культивуванням та розливу культуральної рідини. При цьому в 1 мл препарату повинно міститися не менше $1*10^8$-$1*10^9$ життєздатних клітин. Має ряд недоліків: термін зберігання рідкого Азотобактерину без зниження титру клітин не більше двох місяців; швидко, знижується титр, при змінах температур, не витримує герметичну закупорку пляшок (вилітають пробки і при забрудненні сторонньої мікрофлорою знижується титр клітин раніше двох місяців); громіздкість тари при транспортуванні; умови стерильного розливу перешкоджають механізації цього етапу виробництва.

Азотобактерин в сухій формі являє собою активну культуру висушених клітин азотобактера в суміші з наповнювачем. В 1 г сухого препарату повинно міститися не менше 0,5 млрд життєздатних клітин. Біологічно активні речовини

можуть повністю або частково втрачати при висушуванні, проте життєздатні клітини швидко відновлюють здатність їх продукувати. Висушену культуру стандартизують шляхом добавки необхідної кількості наповнювача і фасують в поліетиленові пакети по 0,5 кг. Пакети зберігають при температурі не вище +15 °С протягом 3-4 місяців. Тобто сухий Азотобактерин має більший термін придатності, унеможливлюється зменшення життездатності клітин, зручний у використанні та дозуванні [7].

Обгрунтування вибору наповнювача

Наповнювач - матеріал, який добавляють у добривну суміш, щоб стабілізувати її і полегшити її виробництво, зберігання і застосування. Наповнювач додається для компенсації різниці між вагою добрив, необхідних для доставки поживних речовин, і бажаним обсягом суміші. Таким матеріалом є торф, грунт, зольне вугілля, тирса та інші відходи [44].

Вугільна сажа може бути отримана внаслідок спалювання кам'яного або бурого вугілля. Відповідно, вона буде відрізнятися пропорціями хімічного складу, в якому міститься незначна кількість: кальцію, калію, фосфору, магнію, натрію. Однак зольна добриво застосовується досить рідко, тому як мінімальний вміст корисних речовин надходить в грунт в важкодоступному, для споживання рослинами стані - це силікати, які під впливом високих температур сплавляються і утворюють стеклообразні маси [45]. Такий наповнювач виключаємо.

Торф - природне добриво, що утворюються з частинок відмерлих болотних рослин. Торф, як корисна копалина видобувається в болотах, руслах річок. Речовина складається з відмерлих рослин і продуктів синтезу - гумусових, мінеральних часток і води. У складі міститься також невелика кількість мінеральних і хімічних елементів. Речовина покращує структуру землі, зменшує вміст нітратів, знижує дію пестицидів, пригнічує шкідливі бактерії і гриби.

Розрізняють такі види торфу: низинний, верховий, перехідний. Низинний торф використовують у разі піщаних і глинистих грунтів, щоб волога при поливі утримувалася довше. Верховий торф мало багатий поживними речовинами. Торф'яні відкладення верхового типу мають кислу реакцію pH 2,5-3,1 і часто застосовуються для підкислення грунту. Торф не принесе ніякої користі, якщо земля родюча і пухка [46].

Так як торф здатний підвищувати кислотність грунту, що несприятливо діє на зростання культури виключаєм його застосування.

Глина - потенційно родючий грунт. У ній великий вміст мінеральних солей. Так, наприклад, кількість калію і магнію в глині значно більше, ніж в легких піщаних або торф'яних грунтах. Крім того, навіть після внесення калійних добрив кількість калію в грунті збільшується незначно і на невеликий термін, а ось глина може прекрасно його накопичувати і утримувати.

Якщо глина переважає в структурі грунту, тоді грунт повільніше прогрівається, швидше перезволожуються, утворює герметичний замок, який значно знижує надходження атмосферного повітря, життєво важливого для розвитку кореневої системи рослин, грунтових мікроорганізмів, і ускладнює вихід вуглекислого газу, сірководню, настільки небезпечних для рослин.

Термін життя бактерій та інших грунтових мікроорганізмів може бути дуже коротким - від днів до декількох годин. Якщо є харчування, тепло і волого - вони дуже швидко розмножуються, якщо «корм» закінчився, то вони дуже швидко гинуть. Але їх біомаса і продукти життєдіяльності складають той самий «поживний бульйон», в який входять не тільки прості з'єднання для живлення рослин, але і амінокислоти, вітаміни, гормони росту, антибіотики і багато інші поживні речовини. Грунтові мікроорганізми переводять глинисті мінерали в розчинний стан, надаючи рослинам елементи Cr, Ti, Fe^{2+}, Mg, Ca, Na, K [47].

Обираємо білу глину – каолін, в якості наповнювача і стабілізації бактеріальної суміші.

Обгрунтування стадії пакування цільового продукту

Азотобактерин – висушені живі клітини бактерій в гранульованій формі разом з наповнювачем (каолін).

При виборі упаковки необхідно враховувати властивості самого цільового продукту та умови його зберігання. Необхідно обирати таку тару, яка захищала б цільовий продукт від пошкоджень, сприяла безпечному транспортуванню, надійності швів, стійкістю до температур та збереженню клітин. Після виробництва Азотобактерин відразу поступає на ферми, тому обирати дороговартісну упаковку не має сенсу.

За один цикл виробницва виготовляється приблизно 38 кг добрива, доречно обрати невеликі упаковки по 0,5 кг.

Класифікують тару наступним чином:

- за матеріалом: картонні, полімерні, металеві, паперові, скляні, тканеві, комбіновані;
- за формою: м’які, тверді, напівтверді;
- за габаритами: мало- , велико- та середньогабаритні.

Також є одноразові, багаторазові, виробничі чи торгові.

Відмирання мікроорганізмів при зберіганні в сухому стані залежить, в основному, від трьох чинників: вологості біокомпоненту, температури зберігання і наявності кисню в упаковці.

Доцільним буде використання поліетиленових пакетів (*рис.5.3*.), виготовлених з плівки високого тиску, одношарові.

Рис.5.3. Приклад поліетиленової упаковки для добрива

Політетиленова упаковка для добрив є найбільш дешевим варіантом і має наступну характеристику:

- можливість використання при підвищених температурах без втрати експлуатаційних властивостей;

- морозостійкі зі збереженням міцності;

- стійкість до деформації, стискання, розривів;

- повітрянепроникні і захист від вологи;

- захист від УФ впливу;

- інертність від хімічних речовин, захист від мікроорганізмів;

- можливість нанесення стійких зображень [48].

5.3. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях

Вихідні дані:

а. об’єм культуральної рідини з однієї ферментації - $V_{кр}$ = 0,5 м^3; КП «Основи проектування»;

б. концентрація біомаси у КР $С_{БМ}$ = 12 г/л (12 кг/м^3) – АСБ,

с. втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 13% (прийнято для розрахунку ТЕО КП «Основи проектування»): початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає 0,5м^3×12кг/м^3= 6,0 кг; кінцева кількість (з урахуванням 13% втрат) має становити 5,2 кг.

Обґрунтовано вибір таких післяферментаційних стадій:

ТП 7. Відділення біомаси

ТП 7.1 Сепарування культуральної рідини

ТП 8. Сушіння біомаси

ТП 8.1. Сушіння у вакуум шильній шафі

ТП 9. Змішування біомаси с наповнювачем

ТП 9.1. Змішування біомаси с наповнювачем

ПМВ 10. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 10.1.Фасування та пакування продукту в пакети

Таблиця 5.4

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (разом 13 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
Зберігання культуральної рідини						
1	Зберігання культуральної рідини	КР	0,5 м^3 (500 л)	-	0,5 м^3 (500 л)	Збірник КР 1 м^3
ТП 7. Відділення біомаси від культуральної рідини						

2	ТП 7.1 Сепарування культуральної рідини	Волога біомаса	6,0 кг (0,5×12) АСБ, з урахуванням вологості 110 л	0,3 кг (5%)	110 л (АСБ з урахуванням врат 6,0-0,3=5,7 кг)	Сепаратор продуктивністю 1 $м^3$/год (розрахунок на 20 хв роботи)
		Фугат	390 л (500-110)	-	390 л	
ТП 8. Сушіння біомаси						
3	ТП 8.1. Сушіння біомаси у вакуум сушильній шафі	Біомаса (вологість 80%)	110 л (АСБ 5,7 кг)	-	-	Сушильна шафа
		Висушена біомаса (вологість 5%)	АСБ 5,7 кг, з урахуванням 5 % вологості 6 кг	0,3 кг (5%)	5,7 кг	Пересувна ємність об'ємом 10 л
ТП 9. Змішування біомаси с наповнювачем						
4	ТП 9.1. Змішування біомаси с наповнювачем	Наповнювач змішують з біомасою у співвідношенні 1:10	5,7 кг біомаси з урахуванням наповнювача (57 кг) 62,7 кг	1,3 кг (2 %)	61,4 кг	Збірник для змішування з наповнювачем об'ємом 100 л
ПМВ 10. Пакування, маркування, відвантаження						
5	ПМВ 10.1. Фасування та пакування продукту в пакети	Змішана біомаса (вологість 5%)	61,4 кг	-	-	Фасувально-пакувальний апарат потужністю 100 уп/год
		Упакований у поліетиленові пакети (по 0,5 кг)	-	0,6 кг (1%)	60,8 кг 30 пакетів	

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання ділянки доферментаційних та післяферментаційних процесів, зображено на апаратурних схемах (див. *графічна частина*), наведена у табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Специфікація ділянки доферментаційних та післяферментаційних процесів Азотобактерину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
З-1 Р-4 Н-2 Н-5	СІП-мийка	1	Автоматична станція мийки (CIP) призначена для автоматизованої мийки та дезінфекції технологічного обладнання та трубопроводів. Кожен контур комплектується: насосом з частотним керуванням подачі, підігрівачем миючих розчинів, витратоміром, запірної і запірно-регулюючої арматурою з пневмоприводами, контрольно-вимірювальною апаратурою. Виробник: «АТТІС» (Укрїна) [1]
З-7	Збірник для розчину Біолонг	1	Збірник об'ємом 1000 л оснащений лопатевою мішалкою, $К_{зап}$ = 0,7, нержавіюча сталь AISI 304, висота 1500 мм, діаметр 1000 мм. Виробник: КРАПТ (Укрїна) [2]

ПЗ-8	Повітрозабірник	1	Обладнений металевою сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф-9	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр ФяК G-3. Фільтруючий матеріал – скловата, плетений алюмінієвий дріт, швидкість фільтрування – 2 м/с, 287х287х300мм, Е = 80 %. Виробник: «AS FILTER» (Україна).[3]
К-10	Компресор	1	Компресор COPCO, максимальний робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: AtlasCopco (Швеція), продуктивність 223,2 $м^3$/год, потужність 22 кВт. [4]
Т-11	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник охолоджувач Systemair PGK, максимальний робочий робочий тиск 1,6 МПа, вихідна температура повітря 20 ºС, 200х400 мм, продуктивність 576 $м^3$/год. Виробник: «Systemair» (Швеція). [5]
РС-12	Ресивер	1	Ресирвер серії РВ 430/16. Виробник: «Бежецкий завод АСО» (Росія), об'єм 430 л, 69х61х185 см, робочий тиск 1,8 МПа. [6]
Т-13	Теплообмінник нагрівач	1	Повітренагрівач канальний водяний VBR. робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 ºС, потужність 2,7 кВт, продуктивність 400 $м^3$/год, 400х200 х2мм. Виробник: «Systemair» (Швеція). [7]
Ф-14	Фільтр головний	1	Фільтр тонкої очистки, фільтруючий матеріал – хімволокно, 305х305х78, швидкість фільтрування 0,1 м/с, Е = 95%. Виробник: AlterAir (Україна)[8]

Д-3 Д-6 Д-15	Об’ємно-ваговий дозатор	5	Дозатор ваговий ДВУ-1, продуктивність 1-8 кг/хв, 560 х 725 х 750 мм, потужність 1000 Вт, точність 0,5%. Виробник: «АСВІК»[9]
Д-19 Д-24			Дозатор ваговий ДВУ-3, продуктивність 5-25 кг/хв, 500 х 930 х 860 мм, потужність 1000 Вт, точність 0,5%. Виробник: «АСВІК»[9]
Р-16 Р-20	Реактор змішувач для приготування композиції А	2	Реактори об’ємом 25 л (d=300 мм, Н=0,6м), 250л (d=800 мм, Н=1,0м) оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI, $К_{зап}$ = 0,8 Виробник: Olsa (Італія) на замовлення[10]
Р-17 Р-22	Реактор змішувач для приготування розчину солей	2	Реактори об’ємом 25 л (d=300 мм, Н=0,6м), 250 л (d=800 мм, Н=1,0м) з сорочкою, сталь н/ж AISI 316L, з мішалкой (20-1000 об/хв), $К_{зап}$ = 0,8. Виробник: Olsa (Італія) на замовлення[10]
Р-18 Р-25	Реактор змішувач приготування для композиції В	2	Реактори об’ємом 30 л (d=350) мм, Н=0,6м), 300 л (d=700 мм, Н=1,0м), оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI, $К_{зап}$ = 0,8. Виробник: Olsa (Італія) на замовлення[10]
ЗК-27	Засівний пристрій	1	Загальний об’єм до 3 л.
МР-32	Мірник для піногасника	1	Мірник М2р-5Гр, об'єм 5 л, клас точності ± 0,1%, ціна ділення шкали 0,005 $дм^3$,н/ж,

			габарити модель 01 – 152х530. Виробник: Геркон (Украна)[11]
Ф-28 Ф-30 Ф-33	Індивідуальний фільтр	3	Фільтри Emflon Filrer, фільтруючий матеріал –бавовна, скловолокно, поліпропілен, d=70 мм, довжина 508 мм, потужність 200 м^3/год, швидкість фільтрування – 0,025 м/с. Виробник: PALL (Німечинна), Е=99,995. [12]
ІН-29	Інокулятор	1	Ферментер об'ємом 10 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою, сорочка, $К_{зап}$ = 0,5-0,6, нержавіюча сталь AISI 304, висота 0,8 м, діаметр 250 мм. Виробник: BIORUS (Росія) [13]
ІН-31	Інокулятор	1	Ферментер об'ємом 100 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою, (50-500 об/хв), сорочка, $К_{зап}$ = 0,5-0,6, нержавіюча сталь AISI 304, висота 1,5 м, діаметр 500 мм. Виробник: Vilenoff (Україна) [14]
Фр-34	Ферментер	1	Ферментер барботажний об'ємом 1 м^3, оснащений сорочкою, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), сорочка, $К_{зап}$ = 0,5 - 0,6, нержавіюча сталь AISI 304, висота 2 м, діаметр 1000 мм. Виробник: BIORUS (Росія) [15]
НП-21	Насос	2	Насос перистальтичний Ragazzini PSF3.

НП-26	перистальтичний		Продуктивність 3 $м^3$/год. Тиск до 15 бар. Виробник: 1А-Engineering (Україна)[16]
Н-23 Н-35 Н-37	Насос відцентрований	3	Насос відцентровий Grandfar JSLm. Продуктивність 4 $м^3$/год. Потужність 750 Вт, 69х61х185мм. Виробник: Grandfar JSLm (Китай)[17]
З-36	Збірник для культуральної рідини	1	Збірник об'ємом 1 $м^3$ оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою(50-500 об/хв), $К_{зап}$ = 0,6-0,7, нержавіюча сталь AISI 304, висота 2000 мм, діаметр 1000 мм. Виробник: КРАПТ (Укрїна) [2]
С-38	Сепаратор	1	Сопловий сепаратор BTUX 305, продуктивныть 2000 л/год, швидкість обератання чаши 6000-9000 об/хв, двигун max швидкість 3000 об/хв, 7,5 кВт, 1500х874х836 мм. Виробник: Alfa Laval (Швеція)[18]
ВСШ-39	Вакуум сушильна шафа	1	Вакуум сушильна шафа СВ-300, сушіння в вакуумі до 0,002 атм, з н/ж сталі AISI 304, об'єм 220 л, в комплекті з вакуумним насосом, максимальна температура нагріву 280°С, потужність 4600 Вт, габарити 690х980х1120 мм. Виробник: SpectroLab (Укрвїна)[19]
ПЄ-39 ПЄ-43	Проміжна ємність	2	Пластиковий контейнер на колесах об'ємом, 37,9х37,7 см Виробник: Україна[20]

			Контейнер для сипучих, підлоговий на колесах об'ємом 100 л, габарити 74.9х39.4х71.1 см, поліпрпілен. Виробник: Україна[21]
Д-41	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор сипучих матеріалів, об'єм бункера 0,6 м^3, межі дозування 1-50 кг, продуктивність 800-1200 кг/год, дискретність 0,005 г, габарити 870х870х1200. Виробник: ArtMash (Україна)[22]
З-42	Збірник для змішування біомаси з наповнювачем	1	Збірник об'ємом 100 л ,оснащений шнековою мішалкою, $К_{зап}$ = 0,7, нержавіюча сталь AISI 304, висота 1000 мм, діаметр 500 мм. Виробник: КРАПТ (Укрїна) [2]
ФПА-44	Фасувально-пакувальний апарат	1	Фасувально-пакувальна машина ПИТПАК, продуктивність 100 упак/год, об'єм дози 0,5 кг, робочий тиск 0,6 МПа, потужність 2 кВт, спосіб запайки - постійний нагрів, час запайки шва 1с, дозатор в комплектації, габарити 1540х920х1556. Виробник:Tauras Fenix (Росія)[23]

Примітка:

1. http://www.attis.com.ua/site/equipment/CIP.html?lang=ru (ATTIC СІП-мийка)

2. http://krapt.com.ua/emkosti-iz-nerzhaveyushchej-stali (КРАПТ збірники об'ємом 1 м^3 та 50 л на замовлення) 3. https://alterair.ua/product/pocket-filter-g-class/ (AS FILTER, фільтр) 4.https://pts-group.com.ua/katalog-oborudovanija/vintovye-kompressori/vintovoj-kompressor-atlas-copco-g-7-22kvt-1-24-3-72-m3-min/ (AtlasCopco, копресор)

5. https://shop.systemair.com/ru-UA/pgk/c44109 (Systemair, теплообмінник охолодж33увач) 6. https://akroprom.su/rv-430-16 (Бежецкий завод АСО, ресивер) 7.http://ventklimat.com.ua/products/vodyanoj-nagrevatel-systemair-vbr-50-25-4-water-heating-batt- (Systemair, теплообмінник нагрівач) 8. https://alterair.ua/product/panelnyye-vozdushnyye-filtry-dlya-tonkoy-ochistki-vozdukha-(f7-f9)/ (AlterAir, фільтр тонкої очистки) 9. https://asvik.kiev.ua/ua/catalog/group/product/38 (АСВІК, дозатори)
10. http://www.olsa.com/liquids/ (реактора, Olsa) 11. http://gerkon.com/merniki/79-mernik-m2r-5gr.html (мірник)
12. https://www.lenntech.com/products/sediment/pall-filters.htm?gclid=CjwKCAjw-qeFBhAsEiwA2G7Nl7S25EYp7RT050NhdjRalFaKLoblu93uP5nrFk_n-Nh7D6BgyPvDABoCkf4QAvD_BwE (фільтир) 13. https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/laboratornyie-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus/glavnaya.html (ферментер 10 л BIORUS) 14. http://vilenoff.com/brewing/fermenteri-dlja-piva/ckt-100-litrov-ch (ферментер 100 л Vilenoff) 15. https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/promyishlennyie-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus%C2%AE/promyishlennyie-fermenteryi.html (ферментер 1 м^3 BIORUS) 16. http://kip.kh.ua/pumps-peristaltic.htm (насос перистальтичнийний, 1A-Engineering) 17.https://zakupka.com/p/1073373148-poverhnostnyy-samovsasyvayushchiy-centrobezhnyy-nasos-s-vnutrennim-ezhektorom-grandfar-jslm-100/ (насос відцентрований, Grandfar) 18. https://www.alfalaval.com/products/separation/centrifugal-separators/separators/btux/ (сепаратор) 19. https://spectrolab.com.ua/g9848617-vakuumnye-sushilnye-shkafy (SpectroLab вакуум сушильна шафа) 20. https://simaris.shop/inventar-i-posuda/konteynery-dlya-hraneniya-i-transportirovki/konteynery-dlya-sypuchih/konteyner-dlya-sypuchih-napolnyy-na-kolesikah-102-l./?gclid=CjwKCAjwy42FBhB2EiwAJY0yQpzBTvueIr9lq6JlIg17qXHA3AX3Kt5Pp3D--e7p54D1ZUqmJAxChhoC7NUQAvD_BwE (проміжна ємність)
21. https://homecity.com.ua/plastikovyy-konteyner-dlya-khraneniya-prosperplast-nuk-nuk6h-s429-prozrachnyy/?gclid=CjwKCAjwzMeFBhBwEiwAzwS8zHOgOvA3dBE0nt2qked1BQyO3eUudbUpvuFRx4YK3MpGX-rYgfMSSRoCcZkQAvD_BwE (проміжна ємність)
22. https://artmash.ua/category/dozatory?utm_source (ArtMash дозатор)
23. https://taurasfenix.com/oborudovanie/dlya-fasovki-sypuchikh-produktov/pitpak/(Tauras Fenix фасувально-пакувальний апарт)

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу Азотобактерину включає допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживного середовища) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез біомаси біодобрива *Az. chroococcum* d10).

Технологічну схему біосинтезу біомаси наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.1.1. Приготування робочого розчину ОКСІН ЛД

Робочий розчин ОКСІН ЛД (0,5 %) готують в установці CIP-мийка. Зважують необхідну кількість каустичної соди та додають необхідну кількість води питної, перемішують.

ДР 1.1.2. Підготовка робочого розчину Біолонг

Зі складу надходить концентрат Біолонгу (4%), який розводять водою до потрібної концентрації (0,5 %). Готують у збірнику об'ємом 500 л. Відміряють певну кількість концентрату, переносять у збірник, розводять водою питною та перемішують.

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень

Щоденне прибирання приміщень проводять після кожної зміни вологим способом. Його проводять у виробничих, лабораторних, підсобних і побутових приміщеннях. При проведенні вологого прибирання використовують 0,5% робочий розчин Біолонг *(від ДР 1.1.2).*

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання приміщень.

Генеральне прибирання проводять раз у місяць 0,5 %–м робочим розчином Біолонг (*від ДР 1.1.2*.). Стіни, двері, стелі, та інші поверхні зрошують з гідропульту 0,5 % розчином з розрахунку 100 мл/м^2. Після закінчення зрошення приміщення закривають на 30-40 хвилин.

ДР 1.3. Підготовка технічного обладнення та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття обладнання

Для миття ємнісного обладнання використовують станцію СІР – мийки, подають 0,5 %–й робочий розчин ОКСІН ЛД *(від ДР 1.1.1.).*

ДР 1.3.2. Технічний огляд

Проводять технологічний огляд обладнання на наявність пошкоджень, вм'ятин, впадин, в яких можуть залишатись залишки можливого забруднення, що може призвести до перехресної контамінації. Всі знайдені несправності усувають.

ДР 1.3.3. Дезінфекція та ополіскування

Для дезінфекції обладнання використовують СІР – мийку, подають і дезінфікуючий розчин Біолонг (*від ДР 1.1.1)*. Ополіскування здійснюють водою, протягом 30 хвилин, для виключення можливості нанесення шкоди здоров'ю персоналу розчином лугу.

ДР 1.3.4. Перевірка на герметичність

Перевіряють обладнання на герметичність, для цього в апарат вносять невелику кількість леткої галогенвмісної речовини (дифторхлорметан). Далі закривають усю запірну арматуру ємнісного обладнання і подають аераційне повітря до рівня надлишкового тиску Р = 0,1-0,2 МПа. Потім перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Після закінчення часу витримки звіряють покази манометра, якщо різниця менше 0,01 МПа, то апарат вважають

герметичним. При більшому відхилені за допомогою галогенного течієпошукача починають пошук неущільнень шляхом перевірки усіх місць з'єднань. При наближені щупа течієпошукача до місця нещільності фіксуються пари галогенвмісної речовини, що засвідчує наявність нещільності. При знаходженні усіх таких місць їх усувають шляхом підтягування різьбових з'єднань або замінюють прокладки. Потім апарат знову перевіряють на герметичність.

ДР 1.3.5. Стерилізація обладнання

Для проведення стерилізації в сорочку апарата подають пару і нагрівають його до 80–90 ºС. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, при цьому обов'язково відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні температури стерилізації (130–135 ºС) всю запірну арматуру, крім парової, закривають і витримують протягом 1 години. Після завершення витримки парову арматуру закривають, подають в апарат стерильне повітря, а в сорочку холодну воду. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30–40 ºС і надлишкового тиску Р = 0,003–0,005 МПа.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Необхідний об'єм атмосферного повітря забирають на висоті 10 м (ПЗ-8).

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення повітря

Повітря пропускають через набивний фільтр (Ф-9), де відбувається затримка пилу та інших крупних часточок бруду до ступеня очищення Е = 80%. Фільтруючий матеріал – плетений алюмінієвий дріт.

ДР 2.3. Компресування повітря

Відбувається стиснення повітря у компресорі (К-10) до температури 120-250 °С і тиску 0,35 МПа.

ДР 2.4. Охолодження повітря

У теплообміннику-охолоджувач (Т-11) температура повітря знижується до 25-30 °С.

ДР 2.5. Видалення зайвої вологи

У ресивері-вологовідділювачі (Р-12) відбувається видалення зайвої вологи до вмісту W = 60 %.

ДР 2.6. Нагрівання повітря

Повітря у теплообміннику-нагрівачу (Т-13) нагрівають до температури 35 °С.

ДР 2.7. Головне тонке очищення повітря

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-14), в якому фільтрувальним матеріалом є нержавіюча стальна сітка. Ступінь очищення становить Е = 95 %.

ДР 2.8. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом та реактором, у якому відбувається стерилізація встановлюють індивідуальний фільтр (Ф-28, Ф-30, Ф-33). Фільтрувальним матеріалом є фторопласт. Ступінь очищення становить Е = 99,995 %.

ДР 3. Приготування розчинів титрувальних агентів для титрування поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування 6 % розчину соляної кислоти

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування розчинів 6 % HCl для різних стадій підготовки поживного середовища наведений у табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Розрахунок кількісті 37 % HCl та води для приготування 6 % розчину HCl

Об'єм титровано-го розчину, л	Об'єм 6 % HCl, необхідного для титрування, мл	Кількість 37 % HCl для приготування розчину, мл	Кількість води для приготуван-ня розчину, мл	Тара для приготуван-ня розчину

15 (інокулятор 100 л)	30	6	24	Колба об’ємом 50 мл
150 (ферментер 1 $м^3$)	300	60	240	Колба об’ємом 500 мл

ДР 3.1.1. Приготування 6 % розчину соляної к-ти для підкислення середовища в інокуляторі об’ємом 100 л.

У колбу об’ємом 50 мл за допомогою циліндра вносять 24 мл дистильованої води, далі за допомогою піпетки відміряють і додають 6 мл 37 % розчину HCl, перемішують та закривають колбу скляною пробкою. Приготовлений 6 % розчин HCl не стерилізують.

ДР 3.1.2. Приготування 6 % розчину соляної к-ти для підкислення середовища в ферментері об’ємом 1 $м^3$.

У колбу об’ємом 500 мл за допомогою циліндра вносять 240 мл дистильованої води, далі за допомогою циліндра відміряють і додають 60 мл 37 % розчину HCl, перемішують та закривають колбу скляною пробкою. Приготовлений 6 % розчин HCl не стерилізують.

ДР 3.2. Приготування 6 % розчину гідроксиду натрію.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування розчинів 6 % NaOH для різних стадій підготовки поживного середовища наведений у табл. 7.2.

Таблиця 7.2

Розрахунок кількісті кристалічного NaOH та води для приготування 6 % розчину NaOH

Об’єм титровано-го розчину, л	**Об’єм 6 % NaOH, необхідного для титрування,**	**Кількість кристалічно-го NaOH для приготуван-ня розчину, г**	**Кількість води для приготуван-ня розчину, мл**	**Тара для приготуван-ня розчину**

	мл			
50 (інокулятор 100 л)	100	6	94	Колба об'ємом 250 мл
500 (ферментер 1м^3)	1 000	60	940	Колба об'ємом 2л

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація 6 % розчину гідроксиду натрію для підлужнення поживного середовища в інокуляторі об'ємом 100 л.

На технічних вагах зважують 6 г кристалічного NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 250 мл, за допомогою циліндра відміряють і вносять 94 л дистильованої води, перемішують до повного розчинення, далі закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при температурі 131°С, 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація 6 % розчину гідроксиду натрію для підлужнення поживного середовища в ферментері об'ємом 1 м^3.

На технічних вагах зважують 60 г кристалічного NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 2 л, за допомогою циліндра відміряють і вносять 940 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, далі закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при температурі 131°С, 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ.

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживних середовищ для колб на качалках.

Для вирощування культури в колбах необхідно приготувати 500 мл поживного середовища (мінус посівний матеріал з колб). Джерелом вуглецю в середовищі є меляса. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування 450 мл

середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 7.3.

Таблиця 7.3

Склад композицій для стерилізації середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 0,45 мл середовища, г	Композиції	Об`єм композиції, мл
Меляса	30	13,5	А	100
Вода		86,5		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3	0,135	Б	150
NaCl	0,3	0,135		
K_2SO_4	0,1	0,045		
Вода		150		
$CaCO_3$	3,5	1,575	В	150
Вода		148		
K_2HPO_4	0,2	0,09	Г	50
Вода		50		
Разом:		450		450

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах у попередньо відтарований хімічний стаканчик зважують 13,5 г меляси. Наважку поміщають в попередньо простерилізовану колбу на 1 л, циліндром відміряють і додають 87 мл питної води, перемішують.

Закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 ºС (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 0,135 г $MgSO_4$, 0,135 г NaCl та на торсійних вагах 0,045 г K_2SO_4. Наважки переносять в попередньо простерилізовану колбу на 250 мл, циліндром відміряють і додають 150 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують.

Стерилізація відбувається в автоклаві при температурі 131 ºС (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В.

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 1,575 г $CaCO_3$. Наважки переносять в попередньо простерилізовану колбу на 250 мл, додають 150 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують.

Стерилізація відбувається в автоклаві при температурі 131 ºС (тиск – 0,15 МПа) протягом 50 хв.

ДР 4.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г.

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 0,09 г K_2HPO_4 . Наважки переносять в попередньо простерилізовану колбу на 100 мл, за допомогою піпетки відміряють і додають 50 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують.

Стерилізація відбувається в автоклаві при температурі 131 ºС (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.1.5. Приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів.

На торсійних терезах зважуємо по 0,025 г $FeSO_4$, $MnSO_4$ та $(NH_4)_2MoO_4$. Наважки переносять в попередньо простерилізовану колбу на 250 мл, додають 100 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують.

Стерилізація відбувається в автоклаві при температурі 131 ºС (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 10 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 5 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в табл. 7.4.

Таблиця 7.4

Склад композицій для стерилізації середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 5 л середовища, г (л)	Композиції	Об`єм композиції, мл
Меляса	30	150	А	1
Вода		850		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3	1,5	Б	1,5
NaCl	0,3	1,5		
K_2SO_4	0,1	0,5		

Вода		1,5		
$CaCO_3$	3,5	17,5	В	2
Вода		2		
K_2HPO_4	0,2	1	Г	0,5
Вода		0,5		
Разом:		5		5

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах у попередньо відтарований хімічний стаканчик зважують 150 г меляси, наважку переносять у колбу об'ємом 2 л і за допомогою циліндра відміряють та вносять 850 л питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують при температурі 112 ºС (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв.

Простерилізоване поживне середовище подають через засівну колбу у попередньо простерилізований посівний апарат на 10 л (ІН-29).

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 1,5 г NaCl і 1,5 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,5 г K_2SO_4 наважки переносять у колбу об'ємом 2 л і за допомогою циліндра відміряють та вносять 1,5 л питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують.

Стерилізація відбувається в автоклаві при температурі 131 ºС (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

Простерилізоване поживне середовище подають через засівну колбу у попередньо простерилізований посівний апарат на 10 л (ІН-29).

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В.

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 17,5 г $CaCO_3$. Наважку перенесять у колбу об'ємом 3 л мл і за допомогою циліндра відміряють та вносять 2 л питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують.

Стерилізація відбувається в автоклаві при температурі 131 ºС (тиск – 0,15 МПа) протягом 50 хв.

Простерилізоване поживне середовище подають через засівну колбу у попередньо простерилізований посівний апарат на 10 л (ІН-29).

ДР 4.2.4. Приготування та стерилізація композиції Г.

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 1 г K_2HPO_4 . Наважки переносять в попередньо простерилізовану колбу на 1 л, додають 500 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують.

Стерилізація відбувається в автоклаві при температурі 131 ºС (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

Простерилізоване поживне середовище подають через засівну колбу у попередньо простерилізований посівний апарат на 10 л (ІН-29).

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 100 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 50 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 50 л поживного середовища наведено в табл. 7.5.

Таблиця 7.5

Склад композицій для стерилізації середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 50 л середовища, кг (л)	Композиції	Об`єм композиції, л
Меляса	30	1,5	А	15
Вода		12		
Конденсат		1,5		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3	0,015	Б	15
NaCl	0,3	0,015		
K_2SO_4	0,1	0,005		
$MnSO_4$	0,005	0,00025		
$(NH_4)_2MoO_4$	0,005	0,00025		
$FeSO_4$	0,005	0,00025		
K_2HPO_4	0,2	0,01		
Вода		13,5		
Конденсат		1,5		
$CaCO_3$	3,5	0,175	В	20
Вода		17,8		
Конденсат		2		
Разом:		50		50

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А.

Через об'ємно-ваговий дозатор у попередньо простерилізований збірник об'ємом 25 л (Р-16), зважують 1,5 кг меляси, і вносять 12 л питної води, перемішують і стерилізують при температурі 112 ºС (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв. Простерилізоване поживне середовище подають у попередньо простерилізований посівний апарат на 100 л (ІН-31).

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 15 г NaCl і 15 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, 5 г K_2SO_4, 10 г K_2HPO_4 та по 0,25 г $FeSO_4$, $MnSO_4$, $(NH_4)_2MoO_4$. Наважки переносять у збірник об'ємом 25 л (Р-17) і вносять 13,5 л питної води.

Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 40 °С, і вмикають перемішуючий пристрій.

Приготовлене поживне середовище подають самопливом у попередньо простерилізований посівний апарат на 100 л (ІН-31). Перед стерилізацією поживного середовища у посівний апарат, обладнаний pH-метром, через засівну колбу при ввімкненому перемішуючому пристрої добавляють 6% розчин HCl (від *ДР 3.1.1)* до pH розчину 4,5-5.

Стерилізація поживного середовища проходить безпосередньо в посівному апараті за рахунок подачі пари через барботер (під тиском 0,15 МПа при температурі 131°С упродовж 40 год).

ДР 4.3.3. Приготування та стерилізація композиції В.

На технічних вагах зважують 175 г $CaCO_3$. Наважку перенесять у збірник об'ємом 30 л (Р-18) і вносять 17,8 л питної води, перемішують і стерилізують при температурі 112 ºС (тиск – 0,05 МПа) протягом 50 хв. Простерилізоване поживне середовище подають самопливом у попередньо простерилізований посівний апарат на 100 л (ІН-31).

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для культивування у ферментері об'ємом 1 м^3

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 500 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 500 л поживного середовища наведено в табл. 7.6.

Таблиця 7.6

Склад композицій для стерилізації середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 1 м^3

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 500 л середовища, кг (л)	Композиції	Об`єм композиції, л
Меляса	30	15	А	150
Вода		120		
Конденсат		15		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3	0,15	Б	150
NaCl	0,3	0,15		
K_2SO_4	0,1	0,05		
K_2HPO_4	0,2	0,1		
$MnSO_4$	0,005	0,0025		
$(NH_4)_2MoO_4$	0,005	0,0025		
$FeSO_4$	0,005	0,0025		
Вода		134,5		
Конденсат		15		

$CaCO_3$	3,5	1,75	В	200
Вода		178		
Конденсат		20		
Разом:		500		500

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А.

Через об'ємно-ваговий дозатор у попередньо простерилізований реактор об'ємом 250 л (Р-20), за допомогою об'ємно-вагового дозатора зважують 15 кг меляси і вносять 120 л питної води, перемішують і стерилізують при температурі 112 ºС (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв. Простерилізоване поживне середовище перекачують насосом (НП21) у попередньо простерилізований посівний апарат на 1 $м^3$ (Фр-34).

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На технічних вагах зважують зважують 150 г NaCl, 150 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, 50 г K_2SO_4, 100 г K_2HPO_4 та 2,5 г $FeSO_4$, $MnSO_4$, $(NH_4)_2MoO_4$. Наважки переносять у збірник об'ємом 250 л (Р-22) і вносять 134,5 л питної води.

Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 40°С, і вмикають перемішуючий пристрій.

Приготовлене поживне середовище подають за допомогою насосу (Н-23) у попередньо простерилізований посівний апарат на 1 $м^3$ (ФР-34). Перед стерилізацією поживного середовища у посівний апарат, обладнаний pH-метром, через засівну колбу при ввімкненому перемішуючому пристрої добавляють 6% розчин HCl (від *ДР 3.1.2)* до pH розчину 4,5-5.

Стерилізація поживного середовища проходить безпосередньо в посівному апараті за рахунок подачі пари через барботер (під тиском 0,15 МПа при температурі 131°С упродовж 40 год).

ДР 4.4.3. Приготування та стерилізація композиції В.

За допомогою об'ємно-вагового дозатора зважують 1,75 кг $CaCO_3$, Наважку перенесять у збірник об'ємом 300 л (Р-25) і вносять 178 л питної води, перемішують і стерилізують при температурі 112 ºС (тиск – 0,05 МПа) протягом 50 хв. Простерилізоване поживне середовище подають насосом (НП-26) у попередньо простерилізований посівний апарат на 1 $м^3$ (Фр-34).

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу.

ТП.5.1. Підтримання колекційної культури.

Умови зберігання. Культура *Az. chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д може зберігатися в ліофілізованому стані протягом декількох років або на косяках в агаризованому середовищі при 5 °С з обов'язковим пересівом не рідше одного разу на 3 місяці.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах.

Колекційна культура зростає в пробірках, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з агаризованим середовищем Ешбі і вирощують 24 год. Штам зростає при кімнатній температурі при pH 4,8-8,5. Оптимальна темпратура зростання 29-31 °С. Оптимум pH зростання 7-7,5.

ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах.

Отримані ізольовані колонії (від *ТП 5.2*) пересівають петлею в пробірки зі скошеним середовищем Ешбі (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, темпратура 29°С.

ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 1 л з 100 мл композицією А (від *ДР* 4.1.1), в асептичних умовах в лабораторії вносять 150 мл розчину композиції Б (від *ДР* 4.1.2), 150 мл розчину композиції В (від *ДР* 4.1.3), 50 мл розчину композиції Г (від *ДР* 4.1.4), за допомогою піпетки вносять 0,45 мл

запасного розчину мікроелементів (від *ДР* 4.1.5). Після проводимо мікробіологічний контроль поживного середовища на відсутність мікроорганізмів. Перемішують і розливають по 150 мл в 3 стерильних колб об’ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Az. chroococcum* d10 (від *ТП* 5.3), вирощеною на середовищі Ендо, вносять 10 мл дистильованої води, за допомогою петлі суспендують клітини і піпеткою в асептичних умовах відбирають одержану суспензію та вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують біомасу, одержану з однієї пробірки. Вирощування у колбах на качалці 240 об/хв впродовж 24 год при 29 °С.

Під час культивування відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. Після завершення вирощування кожну колбу перевіряють на відсутність сторонньої мікробіоти, у разі позитивного результату (лише мікроорганізм-продуцент) в асептичних умовах інокулят з 3 колб переносять в стерильну колбу об’ємом 1 л, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об’ємом 10 л.

У посівний апарат об'ємом 10 л (ІН-29) через засівну колбу в асептичних умовах вносять 1 л розчину композиції А (від *ДР 4.2.1*), 1,5 л композиції Б (від *ДР 4.2.2*), 2 л композиції В (від *ДР 4.2.3*), 0,5 л композицію Г (від *ДР 4.2.4*) та 5 мл мікроелементів (від *ДР 4.1.5*).

Після проводимо мікробіологічний контроль поживного середовища на відсутність мікроорганізмів. Далі в асептичних умовах за допомогою стерильної засівної колби вносять 500 мл посівний матеріал (від *ТП 5.4*) у інокулятор (ІН-29). Включають перемішуючий пристрій, вмикають аерацію, в рубашку інокулятора подають пару (для підтримання температури культивування). Швидкість перемішування становить 240 об/хв. При піноутворенні в інокулятор подаєм піногасник з мірника (МР-32).

Культивування здійснюють при температурі 29°С впродовж 24 год. Кожні 4-6 години відбирають пробу культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. Після закінчення культивування культуральну рідину подають за допомогою труби перетискування в інокулятор об'ємом 100 л (ІН-31).

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

В інокулятор об'ємом 100 л (ІН-31) з 15 л композицією Б (від *ДР 4.3.2*) самоплином подаєм 15 л композиції А (від *ДР 4.3.1*) та 20 л композиції В (від *ДР 4.3.3*). Після проводимо мікробіологічний контроль поживного середовища на відсутність мікроорганізмів.

Перед додаванням посівного матеріалу (від *ТП. 5.5)* приготовлене поживне середовище доводять 6 % розчином NaOH (від *ДР 3.2.1*), при ввімкненій мішалці до pH = 7,0. Далі трубою перетискування подаєм 5 л посівний матеріал (від *ТП 5.5*) в інокулятор (ІН-31). Включають перемішуючий пристрій, вмикають аерацію, в рубашку інокулятора подають пару (для підтримання температури культивування). Швидкість перемішування становить 240 об/хв. При піноутворенні в інокулятор подаєм піногасник з мірника (МР-32).

Культивування здійснюють при температурі 29°С впродовж 24 год. Кожні 4-6 години відбирають пробу культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор об'ємом 1 $м^3$ (Фр-34).

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 1 $м^3$

В попередньо простерилізований ферментер об'ємом 1 $м^3$ (Фр-34) з 150 л композицією Б (від *ДР 4.4.2*) в асептичних умовах за допомогою насосів (НП-21, НП-26) перекачуєм 150 л композиції А (від *ДР 4.4.1*) та 200 л композиції В (від *ДР*

4.4.3). Проводимо мікробіологічний контроль поживного середовища на відсутність мікроорганізмів.

Перед додаванням посівного матеріалу (від *ТП. 5.6)* приготовлене поживне середовище доводять 6 % розчином NaOH (від *ДР 3.2.2*), при ввімкненій мішалці до pH = 7,0. Далі з посівного апарату (ІН-31) за допомогою стисненого повітря перекачують 50 л посівного матеріалу (від *ТП. 5.6*) у ферментер (Фр-34). Вмикають перемішування та аерацію, в рубашку ферментера подають пару (для підтримування температури культивування). Швидкість перемішування становить 240 об/хв. При піноутворенні в інокулятор подаєм піногасник з мірника (МР-32).

Біосинтез здійснюють при температурі 29°С впродовж 48 год.

У процесі культивування, кожні 4-6 год, відбирають проби для здійснення мікробіологічного контролю та контролю показників росту та синтезу. У пробі відібраній на 48 год визначають показники біосинтезу, такі як концентрація біомаси та концентрацію цільового продукту – $1 \cdot 10^9$ кл/мл.

ТП 7. Відділення біомаси від культуральної рідини

ТП 7.1. Сепарування культуральної рідини

У збірник культуральної рідини на 1м^3 З-36 перекачують насосом Н-35 весь об’єм культуральної рідини з виробничого ферментера. Після цього відкривають кран подачі пари в рубашку та підігрівають культуральну рідину до 29°С, вмикають мішалку на 100 обертів та підтримують даний режим перемішування.

Для початку відкривають донний клапан збірника З-36. Після цього вмикають сепаратор С-38, та встановлюють швидкість обертання ротору: 5000 об/хв. Вмикають насос відцентровий Н-37, подають певну кількість культуральної рідини зі збірника З-36 у сепаратор, де розділяється на тверду фазу та супернатант. Після порційного сепарування по закінченню кількості культуральної процес завершують. Біомасу відвантажують вручну на полички розміром 450х650 мм, рівномірно розподіляючи. Фугат відводять на стадію знешкодження.

ТП 8. Сушіння біомаси

ТП 8.1 Сушіння біомаси у вакуум сушильній шафі

Полички з вологою біомасою завантажують у вакуум сушильну шафу ВСШ-39. Сушать при 30-35 ℃, нагрівання здійснюють парою під тиском 0,4 МПа та залишковому тиску 10-13 кПа. Процес сушіння проводять до вологості 5%. Відвантажують суху біомасу у проміжну ємність ПЄ-40.

ТП 9. Змішування з наповнювачем

ТП 9.1. Змішування біомаси з наповнювачем

Через об'ємно ваговий дозатор Д-41 у збірника З-42 відміряють 57 кг каоліну та з проміжної ємності ПЄ-40 висипають суху біомасу у збірник. Вмикають мішалку на 80 об/хв, перемішують. Змішану біомасу відвантажують у проміжну ємність ПЄ-43.

ПМВ 10. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 10.1. Пакування у поліетиленові пакети

У бункер пакувальної машини ФПА-44 завантажують сухий продукт вручну через окремі ємності. Встановлюють на приймач пакувального матеріалу блок з поліетиленовими пакетами. Встановлюють вагову кількість на автоматичному дозаторі пакувальної машини у значенні 0,5 кг, встановлюють продуктивність 10 пакетів за хв. Запускають пакувальну машину. Завершують процес пакування після вичерпування кількості продукту.

ПМВ 10.2. Групове пакування

Пакети завантажують на палету з дерева та обмотують поліетиленовою плівкою. Додають документацію та сертифікати якості і відправляють на склад. Наносять номер партії та серії.

ЗВ 11. Знешкодження відходів

ЗВ 11.1. Знешкодження газоподібних відходів

Утилізація газоподібних відходів здійснюється у біофільтрі, за рахунок фільтрації повітря через тверду фазу.

ЗВ. 11.2. Знешкодження твердих відходів

Утилізація твердих промислових відходів буде проходити етап сортування, а потім відвозитись до пункта прийому вторсировини.

ЗВ 11.3. Знешкодження рідких відходів

Стічні води біотехнологічних виробництв очищюють біохімічним способом в біофільтрах. Надалі їх спрямовують у водойми.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль чистоти культури *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д здійснюється висівом на чашки Петрі на середовище Ешбі і подальшим мікроскопіюванням.

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу здійснюють розсівом петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з середовищем МПА, сусло-агар (СА).

Опис колоній *A. chroococcum*: колонії на агаризованому середовищі Ешбі - напівпрозорі, білуваті, слизові, з часом набувають чорний або темно-бурий колір [4].

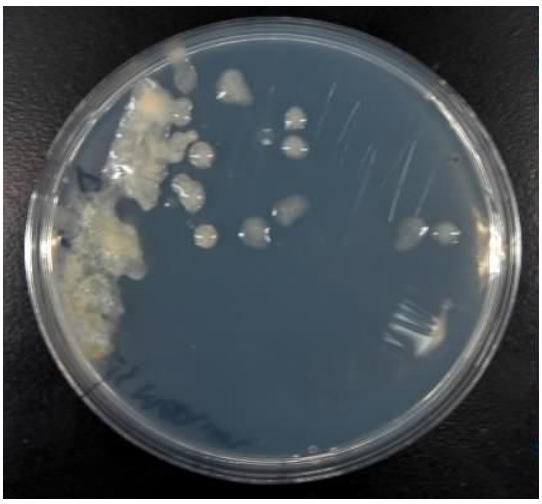


Рис.8.1. Колонії *Azotobacter chroococcum*

Для мікроскопування препарату з імерсійною системою 90х готуємо фіксований препарат. На чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплю культуральної рідини. Мазок висушують при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи.

Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1 краплю імерсійної олії і мікроскопують. Під мікроскопом не повинна спостерігатися наявність сторонньої мікрофлори [49].

Морфологічні ознаки: великі клітини овальної форми, грамнегативні, розміром 2,0-2,5х3,5-5,0 мкм з дрібнозернистої цитоплазмой і компактним нуклеоїдом. Молоді клітини мають перитрихиальні джгутики, а також фімбрії, здатні до руху. З віком культура стає поліморфной, клітини з'єднуються в ланцюжки, утворюють нитчасті форми і сарциноподібні пакети. Стадія спокою характеризується утворенням цист і слизових капсул [4].

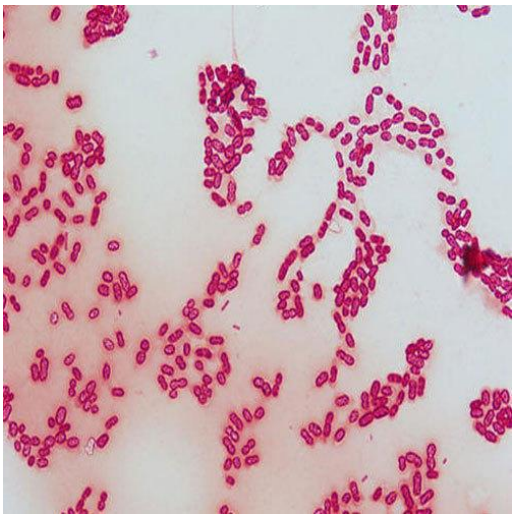


Рис.8.2. *A. chroococcum* × 1000 фарбування за Грамом

При потребі перед мікроскопіюванням звичайного препарату роблять препарат з фарбуванням за Грамом. Для кращого підтвердження чистоти культури готують мазковий препарат та фіксують його на полум'ї пальника. На фіксований мазок кладуть просочений фарбою генціанвіолету фільтрований папір і наносять 2-3 краплі дистильованої води і через 2 хвилини його знімають, а залишки фарби зливають. На мазок наносять розчин Люголя і через 2 хвилини його зливають. Мазок знебарвлюють 96% етиловим спиртом, наносячи його на 20-30 сек. Мазок ретельно промивають водою. На 1-2 хв наносять фуксин Пфейфера. Фарбу

змивають, а препарат висушують, і мікроскопують. У препараті повинні бути лише грамнегативні клітини які фарбуються в рожевий колір [50].

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукта

8.2.1. Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси *A. chroococcum* d10 культуральної рідини визначаємо за оптичною густиною клітинної суспензії при 590 нм із наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком. У пробірки із 9 мл стерильної води вносимо по 1 мл культуральної рідини.

Суміш збовтується, потім вимірюється оптична густину, отримані дані перераховують за калібрувальним графіком [51].

8.2.2. Концентрація цільового продукту

Найважливішим завданням для виробництва бактериального добрива є отримання необхідного титру бактерій. Для титрування використовувався **метод Коха** (для визначення кількості життєздатних мікроорганізмів).

Суть методу полягає в посіві досліджуваної проби на поживне середовище Ешбі в чашки Петрі і подальшому підрахунку колоній, що виросли. Робота проводиться в три прийоми: приготування розведень, посів в чашки, підрахунок колоній, що виросли [52].

Титрації проводили в двох повторностях, розливаючи на чашки Петрі з середовищем Ешбі 10^{-5}, 10^{-7} і двічі 10^{-6} ступінь розведення по 0,1 мл, рівномірно розподіляючи за допомогою шпателя, кожен раз використовуючи новий.

Чашки Петрі прибирали в термостат і відстежували їх зростання кожні 24 години, оптимальний час для підрахунку колоній *Azotobacter chroococcum* близько 72-96 годин.

Після інкубації підраховують число виросших колоній і з урахуванням розведення вираховують число життєздатних мікроорганізмів у одиниці об'єму досліджуваного об'єкта.

Статистична обробка результатів можливе тільки при мінімальній технічній помилки, тому чашковий метод вимагає великої чистоти і обережності при виконанні всіх операцій. Необхідно ретельно оберігати піпетки і середовища від зараження сторонніми мікроорганізмами, так як випадково потрапивша клітина може збільшити число мікроорганізмів в досліджуваній суспензії. Приготування розведень і висіву слід проводити в боксі [53].

8.2.3. Концентрація джерела вуглецю

Джерелом вуглецю в середовищі для культивування *Azotobacter chroococcum* d10 є меляса, до складу якої входять вуглеводи (сахароза). Джерела азоту не має, оскільки *Azotobacter* фіксує азот з півітря, а не з ПС.

Метод Бертрана – Шорля [54]

Суть методу: метод заснований на відновленні цукрами двухвалентной міді з розчину Фелінга до одновалентного оксиду міді. Виділений осад Cu_2O розчиняють в кислому розчині сульфату заліза (3+) і утворюється при цьому еквівалентну кількість сульфіту заліза (2+) титрують розчином перманганату калію.

Реактиви:

- розчин Фелінга I: 10 г кристалогідрату сульфату міді (II) і 0,04 г метиленовий синій розчиняють в дистильованої воді, доводять до 1 л в мірній колбі;
- розчин Фелінга II: 50 г сегнетової солі, 4 г жовтої кров'яної солі і 75 г гідроксиду натрію розчиняють послідовно в дистильованої воді в порцеляновій чашці, після охолодження доводять до 1 л.

Метод аналогічний методу Бертрана, але проба попередньо гідролізується на киплячій водяній бані при визначенні олігосахаридів - 10 хв, а при визначення

полісахаридів - 40 хв. Для гідролізу проба змішується з 2н HCl в співвідношенні 1:1. Потім проводять визначення цукрів методом Бертрана [55].

Техніка визначення: культуральну рідину у кількості 50 мл відбирають, переносять у центрифужні пробірки та центрифугують при 1500 об/хв 15-20 хв, далі відцентрифуговану суспензію фільтрують через фільтрувальний папір, фільтрат відбирають у окрему ємність для аналізів.

У конічну колбу послідовно вносять по 20 мл розчинів Фелінга I і II, розчини змішують, потім доливають 20 мл фільтрату, отриманого з культуральної рідини. Вміст колби перемішують і нагрівають до кипіння, кип'ятять протягом 3 хв, рахуючи від появи перших бульбашок. Після цього колбу знімають з вогню, ставлять в похилому положенні для кращого осідання випавшого закису міді і гарячу рідину зливають з осаду закису міді на скляний фільтр №4 або азбестовий фільтр, спеціально приготовлений в скляній трубці.

Розчин фільтрують у колбу Бунзена при невеликому розрідженні, уникаючи по можливості попадання осаду на фільтр. Після зливання всієї рідини на фільтр колбу і фільтр промивають кілька разів гарячою дистильованою водою до зникнення лужної реакції промивних вод.

Щоб уникнути переходу закису міді в окис при зіткненні з повітрям осад під час фільтрування повинен перебувати під водою. Після закінчення промивання осаду водою фільтрат з колби Бунзена виливають, а колбу ретельно промивають спочатку водопровідною водою, потім споліскують дистильованою водою. У конічну колбу до осаду закису міді доливають невеликими порціями 20-30 мл розчину сірчанокислого заліза, кожен раз зливаючи розчин на фільтр [56].

У присутності сірчанокислого заліза осад закису міді відновлює еквівалентну кількість сірчанокислого окису заліза в сірчанокислу закись заліза, кількість якої визначається титруванням розчином перманганату калію який окислює його в сульфат заліза (III).

Після розчинення закису міді колбу і фільтр промивають кілька разів дистильованою водою, поєднуючи всі промивні води в колбі Бунзена. Потім вміст колби титрують перманганатом до незникаючого слабо-рожевого забарвлення.

Кількість мілілітрів перманганату, який пішов на титрування, множать на титр, виражений по міді, і визначають число міліграмів міді. Потім за отриманим кількості міді знаходять відповідну кількість цукру і розраховують процентний вміст цукру (х) за формулою:

$$X_1 = \frac{GV \cdot 100}{g \cdot 20 \cdot 1000} \qquad (8.1)$$

де G - кількість цукру, знайдене по таблиці, мг;

V - об'єм мірної колби, мл;

g - навішування досліджуваної речовини, г;

20 - кількість випробуваного розчину, мл [56].

8.3. Показники якості готового продукту

8.3.1. Визначення масової частки вологи

Визначення вологи термогравіметричним методом з використанням ІЧ-вологоміра. Такий спосіб має такі переваги як: велика швидкість проведення аналізу, висока відтворюваність, плавна і однорідна сушка проб, що забезпечується керамічним інфрачервоним (ІЧ) нагрівальним елементом.

Принцип дії влогоміра заснований на випаровуванні вологи з аналізуючого зразка - об'єкта вимірювань під дією ІЧ випромінювання з автоматичним безперервним зважуванням його маси в процесі сушіння і індикацією результату вимірювання. Конструктивно вологомір складається з: нагріваючого елемента – керамічного джерела ІЧ випромінювання, вбудованого в кришку сушильної камери; зважуючого пристрою; блоку управління, оброблення та відображення. Аналіз виконується автоматично під управлінням вбудованого програмного забезпечення. Діапазон вимірювань вологості, 0,05-99,95% [57].

Рис.8.3. Вологомір термогравіметричний інфрачервоний Sartorius MA-150

Процес вимірювання включає наступні операції: оператор розміщує пробу аналізованого матеріалу (як правило в діапазоні від 1,5 до 20 г), рівномірно розподілену в кюветі (діаметром не більше 100 мм), в сушильну камеру, після чого відбувається зважування, а потім відбувається автотичное визначення втрати маси під дією ІЧ випромінювання і перерахунок в одиниці вмісту вологи з урахуванням початкової маси проби. Результати аналізу виводяться на дисплей і можуть бути передані на периферійні пристрої - принтер, компьютер [57]. Зовнішній вигляд вологоміра МА150 передставлен на малюнку 8.3.

8.3.2. Визначення числа життєздатних клітин азотфіксуючих бактерій

Метод заснований на приготуванні ряду послідовних розведень препарату у стерильній воді і висівом на чашки Петрі з подальшим внесенням поживного середовища Ешбі і подальшим підрахунком бактеріальних колоній.

Підготовка до випробування: 100,00 г добрива поміщають в мірну колбу місткістю 1000 $см^3$ і доводять обсяг до мітки водою. Залишають на 2 години і періодично перемішують. Потім суміш розливають по 150 см в колби місткістю 250 $см^3$. Стерилізують в автоклаві при 0,1 МПа протягом 1 год. Після відстоювання осаду надосадову рідину відбирають піпеткою місткістю 100 $см^3$ або обережно зливають в колби.

Культивування здійснюється на середовищі Ешбі (г/л): вода дистильована - 1,0; сахароза або маніт - 20,0; калій фосфорнокислий однозаміщений (K_2HPO_4) - 0,2 ; сульфат магнію ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) - 0,2; хлорид натрію (NaCl) - 0,2; сульфат калію (K_2SO_4) - 0,1; карбонат кальцію ($CaCO_3$) - 5,0; у середу рекомендується вносити суміш мікроелементів - 1 мл/л. Стерилізація при 1 атм., (121 ºС), 20 хв.

Проведення випробування: 10 г препарату поміщають в колбу з 90 $см^3$ стерильної води, отримують розведення 10^{-1}. Колбу збовтують протягом 5 хв і залишають на 1 год. Після цього ще раз збовтують 2 хв, і 1$см^3$ суспензії стерильною піпеткою переносять в колбу з 90 $см^3$ стерильної води, отримуючи розведення 10^{-3}, потім готують ряд наступних десятикратних розведень препарату, використовуючи для кожного розведення окремі стерильні піпетки. Для посіву препарату в чашки Петрі використовують розведення 10^{-8}, 10^{-9}. З кожного розведення засівають по три чашки Петрі по 1 $см^3$ суспензії [58].

Приготовлені чашки поміщають в термостат температурою (28 ± 2)°С, витримують 3-4 діб. Для підрахунку вибирають ті чашки Петрі, в яких число колоній не більше 200 і не менше 30. Підрахунок проводять візуально.

Обробка результатів. Число життєздатних клітин азотфіксуючих бактерій (X_2) в 1 г препарату, в млрд, обчислюють для кожного з досліджуваних розведень по формулі:

$$X_2 = \frac{N}{P}, \quad (8.2)$$

де N - число колоній (середнє арифметичне з трьох чашок Петрі);

P - розведення.

За кінцевий результат випробувань приймають середнє арифметичне результатів трьох паралельних визначень, допустима розбіжність між якими не повинно перевищувати 30% [58].

8.3.3. Визначення числа клітин сторонніх мікроорганізмів

Метод заснований на отриманні ряду послідовних розведень препарату, вирощуванні бактерій при певних умовах і порівнянню колоній, що виросли з числом колоній азотфіксуючих бактерій.

Проведення випробування: 1 $см^3$ суспензії, взятої стерильною піпеткою з розведення 10^{-6}, 10^{-7}, вносять в дві чашки, в які заливають 10 $см^3$ розплавленого м'ясопептонного агару та сусло агару. Чашки поміщають в термостат при температурі 28°С і 37°С на 2-3 доби.

Підрахунок колоній сторонніх мікроорганізмів проводять через 2-3 доби [58].

8.3.4. Визначення зовнішнього вигляду і кольору

Зовнішній вигляд і колір визначають візуально по кожній одиниці фасування в момент відбору точкової проби.

5 г досліджуваного препарату поміщають на гладку чисту поверхню аркуша білого паперу і візуально визначають зовнішній вигляд і колір, перемішуючи при природному світлі [58].

8.4. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 8.1.

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх1.2.1 Підготовка робочого розчину ОКСІН ЛД	Концентрація розчину ОКСІН ЛД	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	С = 0,5 %
Кх1.2.2 Приготування робочого розчину Біолонг	Концентрація розчину Біолонг	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	С = 0,5 %
Кт, Км 1.3.1, 1.3.2 Підготовка приміщень	М/б чистота поверхонь виробничих приміщень (стіни, підлога, двері)	Змиви тампонами або метод відбитків	Після прибирання	В змивах з площею 10 х 10 см допускається ріст не більше 300 КУО/см^2 (бактерій і грибів сумарно);
Кт1.4.1 Миття	Обладнання та комунікації, температура	Термометр технічний, годинник	Під час проведення миття	Т = 70-80 ºС, τ = 30 хв

Кт1.4.3 Дезінфекція та ополіскування	Обладнання та комунікації, температура	Термометр технічний, годинник	Під час проведення дезінфекції	T=20 ºC, τ = 30 хв
Кт1.4.4 Перевірка на герметичність	Обладнання та комунікації, тиск	Датчик	Після миття та ополіскування обладнання	P=0,01 МПа, τ = 1год
Кт, Км 1.4.5 Стерилізація обладнання	Обладнання, режим стерилізації вузлів, тиск,темпера-тура,мікробна контамінація.	Манометр, термометр м/б метод, висіви на чашки Петрі	Температура та тиск визначаються безперервно під час виробничого процесу.	p = 0,28 МПа, T= 130ºC, τ = 1 год
Кт 2.2 Попереднє грубе очищення	Повітря, ступінь чистоти, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80%
Кт 2.3 Компресування повітря	температура, тиск стиснення повітря	Термометр, мономент технічний	Після компресування повітря	P = 0,35 Мпа, t = 120-250 ºC
Кт 2.4 Охолодження повітря	Повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	t = 25-30ºC,
Кт 2.5 Видалення зайвої вологи	Вологість повітря	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	W=60-70%
Кт 2.6 Нагрівання повітря	Повітря, температура	Темометр технічний	Після нагрівання	t = 35ºC

Кт 2.7 Очищення на головному фільтрі	Повітря, вміст часток, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очищення повітря у головному фільтрі	Е = 95 %
Кт 2.8 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря, ступінь чистоти	Часточки бруду, манометр	Після очистки повітря на індувідуальному фільтрі	Е = 99,999%
Кх 3.1.1, 3.1.2 Приготування розчину соляної кислоти	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	С = 6 %
Кх, Кт, Км 3.2.1., 3.2.2 Приготування та стерилізація розчину гідроксиду натрію	Тиск, час, стерилізації, стерильність, концентрація розчину гідроксиду натрію	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль проводять після стерилізації	Р=0,15 МПа ,t = 131 ºС, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, С = 6 %
Кт, Км 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль, термометр, технічні ваги	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, тиск, температура, час, стерильніст	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль, термометр, технічні ваги	Температура визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, температура, час,	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль,	Температура визначається під час стерилізації,	t = 131 °С, Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

	стерильніст	термометр, технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	
Кт, Км 4.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, тиск, температура, час, стерильніст	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль, термометр, технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, Р = 0,15 МПа, τ = 50 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.5 Приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів	Тиск, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль, термометр, технічні ваги	Температура визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль, термометр, об'ємний дозатор	Тиск визна-чається під час стерилізації,м/б контроль після стерилізації	t = 112 °С, Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль, термометр, технічні ваги	Температура визначається під час стерилізації ,м/б контроль після стерилізації	t = 131 °С, Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль, термометр, технічні ваги	Температура визначається під час стерилізації ,м/б контроль після стерилізації	t = 131 °С, Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль, термометр, технічні ваги	Температура визначається під час стерилізації ,м/б контроль після	t = 131 °С, Р = 0,15 МПа, τ = 50 хв, відсутність мікробіоти

			стерилізації	
Кт, Км 4.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, м/б контроль, термометр, годинник об'ємний дозатор	Тиск визна-чається під час стерилізації,м/б контроль після стерилізації	t = 112 °С, Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль, термометр, технічні ваги	Температура визначається під час стерилізації ,м/б контроль після стерилізації	t = 131 °С, Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, м/б контроль, годинник, термометр, технічні ваги	Температура визначається під час стерилізації ,м/б контроль після стерилізації	t = 131 °С, Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, м/б контроль, термометр, годинник, об'ємний дозатор	Тиск визна-чається під час стерилізації,м/б контроль після стерилізації	t = 131 °С, Р = 0,15 МПа, τ = 50 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, м/б контроль, термометр, годинник, об'ємний дозатор	Тиск визна-чається під час стерилізації,м/б контроль після стерилізації	t = 112 °С, Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км, 4.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, м/б контроль, термометр, годинник, об'ємний дозатор,	Тиск визначається під час стерилізації,м/б контроль після стерилізації	t = 131 °С, Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.3 Приготування та	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, м/б контроль, термометр, годинник,	Тиск визна-чається під час стерилізації, рН	t = 131 °С, Р = 0,15 МПа, τ = 50 хв, рН=4-

стерилізація композиції В		об'ємний дозатор	визначається в кінці приготування, м/б контроль після стерилізації	4,5, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Холодильник термометр, мікробіологічний контроль	Пересів культури один раз на 3 місяці, мікробіологічний контроль проводять один раз в дві неділі	t=5°C, τ=3 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.2 Одержання робочої культури на агаризованих середовищах	Колекційна культура *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 4-6 годин	t=29°C, τ=24 год відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах	Ізольовані колонії *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 4-6 годин	t=29°C, τ=24 год відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.4 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	t= 29 °C, τ= 24 год ω = 240 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

	культури			
Кт, Км 5.5 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л	Посівний матеріал тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація клітин	Годинник, Термометр технічний, Тахометр технічний, непрямий метод визначення біомаси за оптичною густиною	Під час вирощування інокуляту в посівному апараті і в кінці процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4-6 год	t= 29 °С, τ= 24 год, ω = 240 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти, не менше $1*10^9$ КУО/см^2
Кт, Км, Кх 5.6 Вирощування посівногоматеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л	Посівний матеріал тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація клітин	Годинник, термометр технічний, тахометр технічний, мікроскоп, непрямий метод визначення біомаси за оптичною густиною	Під час вирощування інокуляту в посівному апараті і в кінці процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4-6 год	t= 29 °С, τ= 24 год, ω = 240 об/хв, pH 7,0, відсутність сторонньої мікробіоти, не менше $1*10^9$ КУО/см^2
Кт, Км, Кх 6.1 Виробниче культивування у ферментері об’ємом 1 м^3	Культуральна рідина тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, pH, концентрація клітин *Azotobacter chroococcum* d10 ВКМ В-2272Д	Годинник, датчик pH, термометр технічний, тахометр, непрямий метод визначення біомаси за оптичною густиною	Під час вирощування інокуляту в посівному апараті і в кінці процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4-6 год	t= 29 °С, τ= 48 год, ω = 240 об/хв, pH 7,0, відсутність сторонньої мікробіоти, не менше $1*10^9$ КУО/см^2

РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

Процес відділення біомаси від культуральної рідини проводять за допомогою сепаратора, який підходить для якісного розділення фаз і безпечним вивантаженням біомаси без втрати життєздатності клітин. Застосування автоматичних контрольно-вимірювальних пристроїв дозволить забезпечити високу якість продукції, котра повинна відповідати міжнародним стандартам якості.

Основним завданням відділення біомаси від культуральної рідини є отримання якісної продукції з низькою собівартістю. Для забезпечення оптимальних умов та інтенсифікації процесу, крім сепаратора, ділянка автоматизації включає в себе збірник для культуральної рідини та насос для перекачування культуральної рідини у сепаратор.

Отже, в результаті аналізу технологічного процесу встановлено, що автоматизація даної виробничої ділянки повинна забезпечувати:

1. В збірнику для зберігання культуральної рідини і підтримці оптимальних умов культури проводять контроль і управління рівня рідини, контролюють і регулюють температуру розчину в реакторі, а також контроль і регулювання інтенсивності перемішування;
2. Управління роботою двигуна насоса подачі культуральної рідини із збірника у сепаратор.
3. У сепараторі проводять контроль і управління швидкість обертів вала.

Таблиця 9.1

Завдання на розробку системи автоматизації ділянка відділення біомаси від культуральної рідини

№ з.п	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
1	Збірник культуральної рідини	Температура середовища	29±1 ºС	Контроль	Відображення реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
		Інтенсивність перемішування	200 об/хв	Контроль	Відображення Реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на кількість обертів/хв і кнопка «Стоп» по місцю
		Рівень рідини в апараті	0,55 м^3	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
				Регулювання	Захист від переповнення	Вплив на подачу води

2	Насос	Режим роботи насосу	Ввімкнення/вимкнення	Управління	Ручне/дистанційне управління	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю
3	Сепаратор	Швидкість обертання ротору	6 000 об/хв	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на кількість обертів/хв і кнопка «Стоп» по місцю

Опис функціональної схеми автоматизації

У першому контурі здійснюється контроль та регулювання перемішування компонентів за допомогою мішалки, яка приводиться в дію мотором (М1). Частота обертів мотора мішалки регулюється виконавчим механізмом (*поз. 1а*). Спостереження за зміною частоти обертів здійснюється на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у архіві. Сигналізація про відхилення, пуск та зупинка мотора передбачається також на АРМі оператора-технолога. Є аварійна кнопка «Стоп» по місцю (SB1).

У другому контурі контролюють та регулюють рівень середовища у З-1. При досягненні верхнього або нижнього рівнів спрацьовують відповідний датчик (*поз. 2б*). Сигнал від датчика подається на сигналізатор рівня (*поз. 2в*). Сигналізація про досягнення верхнього та нижнього рівня передбачається на АРМі оператора-технолога.

У третьому контурі контролюють та регулюється температура датчиком температури (*поз. 3а*). Спостереження за зміною температури здійснюється на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін у архіві. Сигнал від датчика подається на контролер. Іде управління подачею пари (*поз.3в*) в рубашку збірника регулюючим органом, що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювачів (*поз. 3б*).

У четвертому контурі необхідно управляти роботою двигуна насоса подачі культуральної рідини із збірника у сепаратор, який приводить в дію мотор (М2). У контурі передбачається: управління з АРМа оператора включенням/відключенням насосу; аварійне відключення насосу кнопкою, розташованою «по місцю» біля насоса. Подача напруги на двигун насоса здійснюється за допомогою магнітного пускача КМ1. Є аварійна кнопка «Стоп» по місцю (SB2).

У п'ятому контурі здійснюється регулювання та контроль обертання вала, який приводиться в дію мотором (М3). Частота обертів мотора вала регулюється виконавчим механізмом (*поз. 5а*). Спостереження за зміною частоти обертів здійснюється на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у архіві. Сигналізація про відхилення, пуск та зупинка мотора передбачається також на АРМі оператора-технолога. Є аварійна кнопка «Стоп» по місцю (SB3).

У шостому контурі здійснюється включення та вимкнення клапана (*поз. 6а*) спускання конденсату.

У сьомому контурі здійснюється включення та вимкнення клапана (*поз. 7а*) спускання культуральної рідини.

Таблиця 9.2

Специфікація на прилади та засоби автоматизаії

№	№ позиції	Найменування і технічна характеристика засобу	Тип, модель	Виробник
2	1а, 5а	Частотний перетворювач для двигунів середньої потужності. Потужність 0.75кВт 1-ф/220 В, номінальний струм 4,2 В	VFD007EL21A	Delta Electronics (Тайвань)
3	2а, 2б	Магнітностракційний поплавковий датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 300-4000мм, максимальна допустима температура $+70^0$С, аналоговий вихід [68]	NMT	Kobold (Австралія)
4	3а	Датчик термоперетворювач опору ТСП, НСХ-Pt100, діапозон (0 – 150)ºС, з уніф. вих. сигнал 4…20 мА	ТСМ-0193-01	ЧТП “Теплоприбор” (Росія)
5	3б	Електропневмоперетворювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwer серія 2700	СВ Альтера (Україна)
7	3в	Регулюючий пневматичний клапан, управляючий сигнал 20-100 кПа	3244-1	Samson (Німеччина)
8	КМ1	Магнітний пускач, робочий струм 7А, управляючий сигнал 220 В	3RT2015-1AP01	SIEMENS (Німеччина)
9	SB1 SB2 SB3	Двоклавішна кнопочка станція «Пуск»-«Стоп»	8LP2T B7113	Lovato (Італія)

РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Технологічний процес одержання Азотобактерину складається з допоміжних (санітарна підготовка виробництва, підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища, титрованих розчинів) та основних робіт (вирощування інокуляту в колбах на качалках, інокуляторі та посівному апараті, виробничого біосинтезу).

1. Санітарна підготовка виробництва.

Даний етап включає щоденне і генеальне прибирання. Прибирання приміщень (стіни, двері, вікна) проводять вологим способом протирають ганчір'ям, змоченим розчином «Біолонг», з наступною витримкою відповідно до експозиції, а прибирання полів – методом двох відер розчином «Вернедор-Плюс». Підлогу необхідно мити та дезінфікувати кожного дня 2 рази на день, стіни, двері та вікна – 1 раз на місяць. Для миття ферментера, інокуляторів та реакторів використовуємо СІП-мийку з засобом «ОКСІН ЛД 105». Відпрацьований розчин використовуємо повторно у СІП-мийці, а промивна вода – у каналізацію. *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

2. Пригоування і стерилізація розчинів для титрування.

На даному єтапі готуємо 6% розчин хлоридної кислоти та 6% розчин гідроксиду натрія. Розчини готуються в колбах та подаються у ферментер для регуляції pH. Відходи можуть утворитись в тому випадку, коли титрувальний розчин не відповідає нормі концентрації і асептики. *Передбачаємо, що на даному етапі не має рідких відходів*.

3. Підготовка піногасника.

Піногасник «SILFOAM SE-4» знаходиться у збірнику і автоматично подається при утворенні піни під час культивування в інокуляторах та ферментері. Піногасник не потребує стерилізації. *Даний етап не передбачає рідких відходів.*

4. Приготування та стерилізація поживних середовищ для отримання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу.

На даному етапі є тверді відходи у вигляді пакувальних матеріалів сировини (мішки, тара), які надходять на склад підприємства. Також є можливість наявності сировини, яка невідповідає нормам, таку сировину записують як браковану. *Передбачаємо, що на даному етапі є емісії твердих відходів*.

5. Підготовка посівного матеріалу.

Даний етап передбачає вирощування посівного матеріалу в колбах та інокуляторах, з подальшим засівом в інокулятор та ферментер віповідно, для виробничого культивування. Тому *відходи посівного матеріалу не зараховуємо до загальних рідких відходів.*

Оскільки, *Azotobacter chroococcum* d 10 ВКМ У-2272 Д росте в аеробних умовах, однією із важливих умов, при культивуванні, є забезпечення стерильного аераційного повітря. Тому, під час культивування, в інокуляторах утворюються великі об’єми відпрацьованого повітря. *Передбачаємо, що на даному етапі є емісії газоподібних відходів*.

6. Виробничий біосинтез.

На даному етапі відбувається накопичення цільового продукта продуцента, тобто самої біомаси в культуральній рідині, яка далі надходить у збірник. На даному єтапі не має рідких відкодів. Відпрацьоване повітря на виході з ферментера містить клітини азотобактера. *Тому, предбачаємо, що на даному етапі є емісії газоподібних відходів.*

7. Відділення біомаси від культуральної рідини

Данний етап передбачає відділення біомаси за допомогою сепаратора. Відділену біомасу збирають та відправлють на сушіння. Фугат збирають у збірник, який більше не потрібен. *Тому, предбачаємо, що на даному етапі є емісії рідких відходів.*

8. Сушіння біомаси у вакуум сушильній шафі

Даний етап передбачає видалення рідини із продукту, тобто випарювання вологи у сушильній шафі, в яку подається пара. Вмісту сухих речовин в продукті повинна становити не менше 95%. Сушіння проходить з виділенням вакууму. *Даний етап не передбачає газоподібних відходів.*

9. Змішування біомаси з наповнювачем

На данному етапі відбувається змішування сухої біомаси з каоліном у збірнику. Тому *відходи біомаси з наповнювачем не зараховуємо до загальних твердих відходів.*

10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Очищення стічних вод здійснється біохімічним способом в біофільтрах. Сутність процесів, що протікають в біофільтрі така: на поверхні зерен завантаження фільтра сорбуются нерозчинені і колоїдні забруднення, утворюючи біологічну плівку, заселену мікроорганізмами. Потрапляючи на цю плівку, розчинені забруднення стічних вод окислюються мікроорганізмами. Відмерла плівка змивається стічною рідиною і виноситься з тіла біофільтра. Освітлена в первинних відстійниках стічна рідина, періодично через спеціальний пристрій, рівномірно розподіляється по площі біофільтра. Для нормальної роботи біофільтра необхідна подача повітря в достатній кількості. У крапельних біофільтрах зазвичай використовується природна вентиляція, створювана різницею температур зовнішнього повітря і тіла біофільтра. Очищена від механічних частинок і частини

біологічних забруднень, вода спочатку потрапляє в першу камеру біофільтра, де вона рівномірно покриває всю поверхню завантаження. Протягом 2-3 тижнів після цього утворюється біоплівка з бактерій, що надходять з цього джерела стоку, яка охоплює все завантаження рівномірно. На нижньому трофічному рівні в цей період збираються всілякі бактерії і гриби, окислюють органічні сполуки які є додатковою їжею для найпростіших: інфузорій, коловерток і ін., що знаходяться в біоплівки. Така біологічна активність всередині біофільтра забезпечує можливість омолодження біоплівки [59].

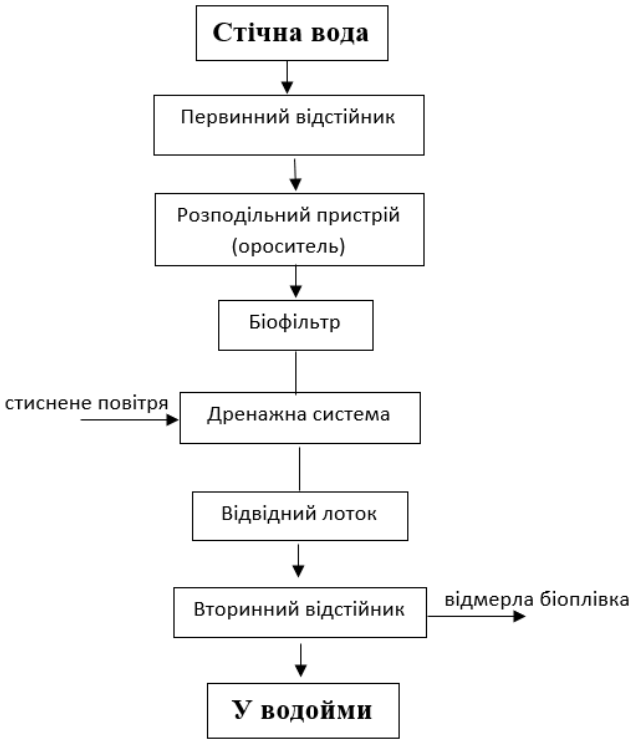


Рис.10.1. Утилізація рідких відходів

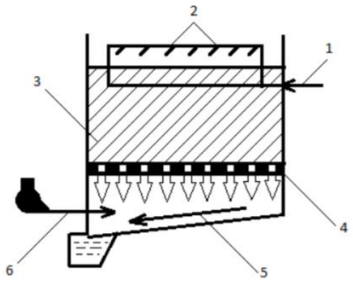


Рис. 10.2. Схема біофільтра для очищення стічних вод

1-подача стічної води, 2- водорозподільний пристрій, 3- фільтруюча загрузка, 4- дренажний прилад, 5- очищення стічної води, 6 – вентиляційний прилад

10.2.2. Сиситема знешкодження та утилізації твердих відходів

Тара від миючих засобів та упавки з-під компонентів для приготування поживного середовища спочатку буде проходити етап сортування, а потім відвозитись до пункта прийому вторсировини.

10.2.3. Сиситема знешкодження та утилізації газоподібних викидів

Утилізація газоподібних відходів здійснюється в біофільтрі, за рахунок фільтрації повітря через тверду фазу. При контакті відпрацьованих газів з фільтруючим шаром, в якості якого використовуємо компост, відбувається адсорбція забруднюючих речовин на фільтруючому шарі. Забруднюючі компоненти віддаляються з фільтруючого шару за рахунок адсорбції (поглинання) їх мікроорганізмами. Адсорбовані компоненти забруднень піддаються біохімічному окисненню у живих клітинах (стадія регенерації біологічного сорбенту), стають живленням для мікроорганізмів і служать для їх розмноження. Модифіковані суміші складаються на 70-85% з органічного матеріалу-основи (компост) і в іншому з інертного матеріалу (полімери, керамзит) для структурування. Повітря, що підлягає очищенню, завжди повинен бути вологим, як і сам фільтруючий матеріал [60].

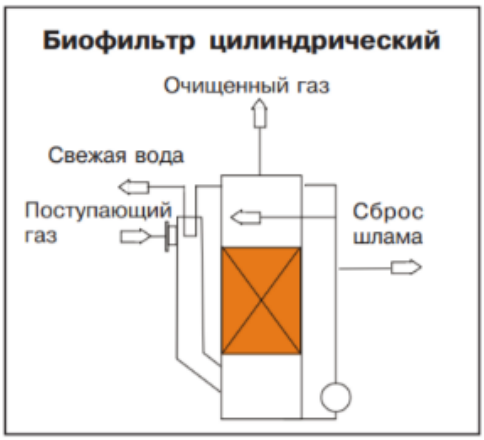


Рис.10.3. Схема циліндричного біофільтра для очистки повітря

10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Для того, щоб зменшити відходи відпрацьованого розчину «ОКСІН ЛД» рекомендуємо використання СІП-мойки, в якій можно повторно використовувати мийні розчини після фільтрування.

Так як твердих відходів утворюється дуже мало, то зменшувати їх обсяг не має сенсу.

Нажаль зменшити об'єми газоподібних відходів не вийде, оскільки продуцен є аеробом і потребує кисневе середовище для росту. Але якісне очищення відпрацьованого повітря передбачає негативний впил на навколишне середовище. Відпарацьоване очищене повітря можно збирати у балони та відводити у ліса або парки для збагачення вуглекислим газом дерева.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Иркитова А.Н., Гребенщикова А.В. Перспективы применения микробных препаратов в органическом сельском хозяйстве. Материалы II межрегиональной научнопрактической конференции «От биопродуктов к биоэкономики» (г. Барнаул, Россия 12-13 апреля 2018 г.) С. 76-79
2. Гужвин С.А., Климашевская Н.Ф., Каменский Н.П., Клыков В.В. Применение минеральных удобрений и бактериальных препаратов под полевые культуры на черноземах // КубГАУ, №82(08), 2012 р, с. 1-10
3. Клещев Н.Ф. Агробиотехнология: биологическая фиксация молекулярного азота: учебное пособие. – Х.:НТУ, 2014. - 148 с.
4. Патент №2231546C2 RU Штамм бактерий az d10 вкм в-2272 д, обладающий ростостимулирующими свойствами и устойчивый к дельтаметрину / Вайшля О.Б., Бондаренко А.А. Опубл. 27.06.2004
5. Соколова М. Г., Акимова Г. П. Адаптогенное влияние препаратов, содержащих ризосферные бактерии, на рост проростков гороха в условиях гипотермии. Россия: СИФиБР, 2014. УДК 581.1:58.07.071
6. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія і вірусологія [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної та заочної форм навчання / Т.П. Пирог, О.І. Скроцька. – К.: НУХТ, 2019. – 106 с
7. Биотехнология в сельском хозяйстве. Производство азотобактерина – електронний ресурс. – режим доступу: http://www.biotechnolog.ru
8. Терещенко Н.Н. Биоудобрения на основе микроорганизмов. Учебное пособие - Томск: 2003 - ст. 18-19

9. Никонович Т. В., Иванистов А. Н., Французёнок В. В. Биотехнологія в растениеводстве. Применение методов биотехнологии для решения проблемы азотфиксации. Горки: БГСХА, 2017 УДК 581.08:573.6(075.8)
10. Stamenković1 S., Beškoski V., Karabegović1 I., Lazić1 M., Nikolić N. Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. Spanish J Agricul Research. 2018, 16(1): 1-18. doi: 10.5424/sjar/2018161-12117
11. Bora L., Tripathi A., Bajeli J., Chaubey A. K., Chander S. A review on microbial association: its potential and future prospects in fruit crop. *Plant Archives*. 2016, 16(1): 1-11. ISSN 0972-5210
12. Romero-Perdomo F., Abril J., Camelo M., Moreno-GalvánIván A., Pastrana I., Rojas-Tapias D., Bonilla R. *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*) : Effect in reducing N fertilization. *Rev Argent de Microbiol*. 2017, 49:4. doi:10.1016/j.ram.2017.04.006
13. Патент № 2390518 C1 RU Биопрепарат в виде водной суспензии для повышения почвенного плодородия / Акулинина Н. С., Власов С. А., Терентьева Л. И., Краснопевцева Н. В. Опубл. 27.05.2010
14. Sartaj A. W., Chand S., Muneeb A. W., Ramzan M., Rehman H. K. *Azotobacter chroococcum* – A Potential Biofertilizer in Agriculture: An Overview. *Soil Science: Agricul and Environmental Prospectives*. 2016, doi: 10.1007/978-3-319-34451-5_15
15. Азогран – електронний ресурс. – режим доступу: https://agro-market.net/ua/catalog/item/9826/
16. Азогран – електронний ресурс. – режим доступу: https://agrolife.ua/azogran.html

17. Пирог, Т.П. Біохімічні основи мікробного синтезу: підручник / Т.П. Пирог, Ю.М. Пенчук. – К. :Ліра-К, 2019. – 258 с.
18. Буценко, Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: навч. посіб. – К.: НУХТ, 2010.
19. Свистунов А. И. Классификация способов ферментации и ферментеров. Россия: НГИЭИ, 2013, УДК 631.363.1; 631.363.7, с. 109-114
20. Промышленные ферментеры – електронний ресурс. – режим доступу: https://bio-rus.ru
21. Перемешивание в ферментерах – електронний ресурс. – режим доступу: https://chem21
22. Основные типы механических перемешивающих устройств. Конструкция мешалок – електронний ресурс. – режим доступу: http://talnah.su
23. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія. – Київ: НУХТ, 2009. – 336 с.
24. Забор наружного и выброс использованного воздуха – електронний ресурс. – http://www.stroitelstvo-new.ru/gigiena-truda/zabor-naruzhnogo-i-vybros-ispolzovannogo-vozduha.shtml
25. Серко А. В., Виноградов И. А. Классификация воздушних фильтров. Минск: БНТУ, 2013, УДК 628.336.42, с.224-226
26. Фильтры тонкой очистки воздуха – електронний ресурс. – режим доступу: https://pritok.com.ua/shop/filtry-vozduha/filtry-tonkoj-ochistki-vozduha/
27. Дезінфектанти – електронний ресурс. – режим доступу: https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2423/dezinfekta
28. Біолонг 100 % концентрат – електронний ресурс. – режим доступу: https://biolong.pro/disinfection-floor/mv-conc-cap-5/
29. Вернедор-Плюс – електронний ресурс. – режим доступу: http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin_upload/vika/vernedor.pdf

30. OXIN LD 105 – електронний ресурс. – режим доступу: https://ukrhim.org.ua/oxin-sup-sup-ld-105.html
31. Характеристика моющих средств – електронний ресурс. – режим доступу:http://base.garant.ru/4175754/c9c989f1e999992b41b30686f0032f7d/
32. Пеногасители для ферментных производств и биотехнологии – електронний ресурс. – режим доступу: https://siloxane.com.ua/p220789834-silfoam-silikonovyj-penogasitel.html
33. Отделение биомассы: флотация, фильтрование и центрефугирование – електронний ресурс. – режим доступу: https://students-library.com/library/read/30008-otdelenie-biomassy-flotacia-filtrovanie-i-centrifugirovanie
34. Любин В.С., Іскович-Лотоцький Р.Д. Аналіз методів та обладнання для фільтрування та очистки вологих дисперсних матеріалів // Вібрації в техніці та технологіях, 2013, №2(70), с. 185-189
35. Кухарева Н.А., Заболотец А. А. Материалы 75-ой студенческой научно-технической конференции «Центрифугирование как технологический процесс». (Минск, БНТУ) 22-28 мая 2019 р. С. 137-138
36. Голованчиков А. Б., Новиков А. Е., Филимонов М. И., Доан М. К. Физическое и математическое моделирование процессов центрифугирования: монография.- Волгоград: ГТУ, 2018. – 156 с.
37. Коростелева Н.И., Громова Т.В., Жукова И.Г. Биотехнология: учебное пособие. – Багнаул: АГАУ, 2006. – 127 с.
38. Тимонин А.С. Основы конструирования и расчета химико-технологического и природоохранного оборудования: Справочник. Т2. – Калуга: Издательство Н. Бочкаревой, 2002. – 1028 с.

39. Принцип работы сепаратора – електронний ресурс. – режим доступу: https://www.flottweg.com/ru/wiki/separation-technology/separator-functional-principle/
40. Миронов М. А., Токарева М. И. Методы расчета оборудования биотехнологических производств: учеб.-метод. пособие. – Екатеринбург: УФУ, 2017. – 47 с.
41. Ткаченко С. Й., Співак О. Ю. Сушильні процеси та установки: навчальний посібник. - Вінниця: ВНТУ, 2007. - 76 с.
42. Вакуум сушильный шкаф и его применение в пищевой промышлености – електронний ресурс. – режим доступу: https://rvs-ltd.ru/vakuumnyj-sushilnyj-shkaf-i-ego-primenenie-v-piwevoj-promyshlennosti.html
43. Вакуумный сушильный шкаф СВ-150 – електронний ресурс. – режим доступу: https://spectrolab.com.ua/p27584540-vakuumnyj-sushilnyj-shkaf.html
44. Смешивание и комбинирование органических и неорганических удобрений – електронний ресурс. – режим доступу: https://biogran.su/info/mixing-and-combining-organic-and-inorganic-fertilizers/
45. Угольная зола как удобрение: свойства и правила использования – електронний ресурс. – режим доступу: http://megaogorod.com/atricle/2465-ugolnaya-zola-kak-udobrenie-svoystva-i-pravila-ispolzovaniya
46. Какую пользу и вред может принести торф на огороде – електронний ресурс. – режим доступу: http://veltorf.com/ru/goodtoknow/what-benefits-and-harm-can-peat-in-the-garden_5/
47. Глина в садоводстве – електронний ресурс. – режим доступу: https://ogorod.ua/glina_v_sadovodstve
48. Упаковка для грунтов и удобрений – електронний ресурс. – режим доступу: http://master-pack.com.ua/product/upakovka-dlya-gruntov-i-udobreniya/

49. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
50. Загальна мікробіологія і вірусологія: лабораторний практикум для студ. освітнього ступеня «Бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми навч. / уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк. – К.: НУХТ, 2016. – 110 с.
51. Трегуб Н.С., Капрельянц Л.В. Кінетичні параметри накопичення біомаси *Lactobacillus acidophilus* на середовищах із селеном // Наукові праці, 2014, № 46, том 2, с. 112-115
52. Чашечный метод Коха – ектронний ресурс – режим доступу: https://scicenter.online
53. Гарбуз С.А., Корытова В.Е. Подбор оптимальной питательной среды для гомогенного, периодического культивирования *Azotobacter chroococcum* // Международный научно-исследовательский журнал, 2016, № 12 (54), с. 12-14
54. Хромова Н. Ю. , Кареткин Б. А., Грошева В. Д., Шакир И. В., Панфилов В. И. Исследование влияния степени полимеризации С – субстрата на активность роста и метаболизм молочнокислых бактерий // Успехи в химии и химической технологии, том 29, №8, 2015
55. ГОСТ Р 54667-2011. Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли сахаров. – Введ. 01.01.13.
56. Перманганатные методы определения сахаров – ектронний ресурс – режим доступу: http://www.spec-kniga.ru/

57. Сергеева А.С., Московкин Д.Л. Применение инфракрасных термогравиметрических влагомеров для измерения влажности пищевых продуктов // Пищевая промышленость, № 10, 2013, с.14-16
58. ГОСТ Р 57643-2017. Продукция микробиологическая. Биоудобрения нитрагин. – Введ 01.08.18.
59. Чеснокова М.Г., Комаров В.Ю. Очистка сточных вод с использованием биологических фильтров // Научно-практический электронный журнал Аллея Науки, 2018, №4(20)
60. Шестопалов О.В., Літак І.В. Аналіз існуючих процесів та апаратів біологічної очистки газових викидів // Технологический аудит и резервы производства, 2014, № 3/5(17), с. 49-52

Додаток 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 390 518** (13) **C1**

(51) МПК
C05F 11/08 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2008146611/13, 27.11.2008**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.11.2008

(45) Опубликовано: **27.05.2010** Бюл. № **15**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2148571 C1, 10.05.2000. RU 2073712 C1, 20.02.1997. CN 101284740 A, 15.10.2008. UA 72856 A, 15.04.2005. CN 1357516 A, 10.07.2002.**

Адрес для переписки:
141100, Московская обл., г. Щелково, ш. Ленина, 1, кв.183, Л.А. Князевой

(72) Автор(ы):
Акулинина Наталья Сергеевна (RU),
Власов Сергей Александрович (RU),
Краснопевцева Наталья Валентиновна (RU),
Терентьева Лариса Ивановна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Акулинина Наталья Сергеевна (RU),
Власов Сергей Александрович (RU),
Краснопевцева Наталья Валентиновна (RU),
Терентьева Лариса Ивановна (RU)

(54) БИОПРЕПАРАТ В ВИДЕ ВОДНОЙ СУСПЕНЗИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПОЧВЕННОГО ПЛОДОРОДИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и сельскохозяйственной микробиологии и, в частности, к производству бактериальных препаратов на основе азотфиксирующих бактерий, используемых в агротехнике для повышения плодородия почвы и урожайности. Биопрепарат содержит штамм бактерий Azotobacter vinelandii ВКПМ B-5933 с содержанием живых бактерий не менее 1×10^9 кл/мл в культуральной жидкости, поваренную соль, микроэлементы: цинк, магний, марганец, кобальт, молибден, бор и воду, при следующем соотношении компонентов, мас.%: штамм бактерий в культуральной жидкости - 50-60, микроэлементы - 0,2-0,3, поваренная соль - 1,0-1,5, вода - до 100%. Изобретение позволяет повысить плодородие почвы, урожайность культурных растений, увеличить срок хранения препарата. 4 табл.

RU 2390518 C1

RU 2390518 C1

RUSSIAN FEDERATION

(19) **RU** (11) **2 390 518** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
C05F 11/08 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2008146611/13, 27.11.2008**

(24) Effective date for property rights:
27.11.2008

(45) Date of publication: **27.05.2010 Bull. 15**

Mail address:
141100, Moskovskaja obl., g. Shchelkovo, pl. Lenina, 1, kv.183, L.A. Knjazevoj

(72) Inventor(s):
Akulinina Natal'ja Sergeevna (RU),
Vlasov Sergej Aleksandrovich (RU),
Krasnopevtseva Natal'ja Valentinovna (RU),
Terent'eva Larisa Ivanovna (RU)

(73) Proprietor(s):
Akulinina Natal'ja Sergeevna (RU),
Vlasov Sergej Aleksandrovich (RU),
Krasnopevtseva Natal'ja Valentinovna (RU),
Terent'eva Larisa Ivanovna (RU)

(54) BIOLOGICAL PREPARATION IN FORM OF AQUEOUS SUSPENSION FOR INCREASING SOIL FERTILITY

(57) Abstract:

FIELD: chemistry; biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and agricultural microbiology and specifically to making bacterial preparations based on nitrogen-fixing bacteria used in agricultural engineering for increasing soil fertility and yield. The biological preparation contains Azotobacter vinelandii VKPM V-5933 bacteria strain containing not less than 1×10^9 cells/ml living bacteria in a culture liquid, sodium chloride, trace elements: zinc, magnesium, manganese, cobalt, molybdenum, boron and water with the following ratio of components, in wt %: bacteria strain in culture liquid - 50-60, trace elements - 0.2-0.3, sodium chloride - 1.0-1.5, water - up to 100%.

EFFECT: invention increases soil fertility, crop yield and increases shelf life of the preparation.

4 tbl, 3 ex

RU 2390518 C1

RU 2390518 C1

Изобретение относится к биотехнологии и сельскохозяйственной микробиологии и, в частности, к производству бактериальных препаратов на основе азотфиксирующих бактерий, используемых в агротехнике для повышения плодородия почвы и урожайности.

Известно использование в сельском хозяйстве различных, в первую очередь минеральных, удобрений, которые вводят в почву в виде растворов, порошка или гранул. Недостатком известных удобрений следует признать их медленно оказываемое действие на растения, поскольку процесс освобождения питательных веществ из удобрений длителен и происходит в основном за счет сообщества микроорганизмов, присущего почве, в которую внесли указанное удобрение. Поэтому вносят вместе с удобрениями различные биодобавки, ускоряющие процесс высвобождения питательных веществ из различных удобрений, а также процесс усвоения высвобожденных веществ растениями. Кроме того, указанные биодобавки способствуют дополнительному накоплению питательных веществ в почве в легкоусвояемой растениями форме.

Известно, что основным источником азота для почвы является молекулярный азот атмосферы. Процесс его усвоения, перевод в доступную для растений форму осуществляется с помощью микроорганизмов азотфиксаторов. Почвенные микроорганизмы-азотфиксаторы при успешном развитии способны накапливать в почве значительные количества до 100 кг/га минерального азота, усвояемого растениями. При внесении в почву азотфиксирующих микроорганизмов значительно сокращается применение минеральных азотных удобрений. Микроорганизмы-азотфиксаторы, переводя молекулярный азот атмосферы в доступную для растений форму, улучшают азотное питание сельскохозяйственных растений.

В настоящее время применение бактериальных препаратов для повышения плодородия почвы является перспективным приемом агротехнологии, альтернативой возрастающему использованию минеральных удобрений. Это особенно актуально в условиях необходимости экологической безопасности.

Известно применение бактериальных удобрений на основе различных штаммов микроорганизмов или их метаболитов (авт. св. СССР №1473345, пат. РФ. №1806123, пат. РФ №2041867).

Для повышения эффективности удобрения в них дополнительно вводят водные суспензии бактериальных культур (авт. свид. СССР №589238), суспензии дрожжей и одноклеточных водорослей (авт. свид. СССР №935501), предварительно ферментированный птичий помет и торф, консорциум бактерий Streptococcus thermophilus, Streptococcus bovis, Dactobacillus salivaries var salicinicus, Lactobacillus salivaries var salicinicus, Lactobacillus acidophilus (RU, патент 2055823, C05F 11/08, 1996).

thermophilus, Streptococcus bovis, Lactobacillus salivaries var salicinicus, Lactobacillus salivaries var salicinicus, Lactobacillus acidophilus (RU, патент 2055823, C05F 11/08, 1996).

Известно использование различных микроорганизмов: азотфиксирующие (Azotobacter chroococcum), фосфатарастворяющие (Bacillus mucilaginosus), молочнокислые в виде консорциума, содержащего Streptococcus thermophilus. Streptococcus bovis, Lactobacillus salivaries var salicinicus, Lactobacillus salivaries var salivarus, Lactobacillus acidophilus. Дополнительно могут быть внесены Trichoderma viride, Beauveria bassiana (патент РФ №2081866).

Общими недостатками использования микроорганизмов являются сложность производства, а также наличие проблем при хранении и транспортировании и связанная с этим низкая стабильность препарата.

Известно большое количество микроорганизмов-азотфиксаторов, используемых для получения на их основе бактериальных препаратов: симбиотические и

ассоциативные азотфиксаторы, свободноживущие азотфиксаторы. Давно известны и применяются препараты на основе свободноживущих азотфиксирующих бактерий рода Azotobacter: препарат «Азотобактерин» (сб. «Бактериальные удобрения», ред. Березовая Е.Ф., Доросинский Л.М., 1961 г., Ленинград). В основном для данных препаратов использовали бактерии Azotobacter chrorococum. Известны штаммы Azotobacter chrorococum для бактериального препарата (авт.св. СССР №1316189). Данный штамм является несимбиотическим азотфиксатором для ячменя. Препарат на основе этого штамма имеет незначительный срок годности и слабую эффективность в полевых условиях, длительное время культивирования - около 130 часов. Также следует признать низкую продуктивность культуры при выращивании в предлагаемых условиях, использование дорогостоящего и дефицитного стимулятора роста - арахидоновой кислоты, а также низкую жизнеспособность культуры на кислых почвах (pH меньше 5,0) и в условиях низкой влажности (меньше 20%).

Использование Azotobacter позволяет повысить урожай в основном лишь овощных культур и кормовых трав (Мишустин Е.Н. и др. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М., 1973. Barber J.E. et al. Plant fnd Sil. 1979. 52. №1).

Штамм Azotobacter mysorens-7 №164 применяется для изготовления бактериального удобрения, повышающего урожайность злаковых кормовых трав (авт. свид. СССР №1083531).

Наиболее близким техническим решением к предлагаемому относится биопрепарат, который содержит ассоциацию азотфиксирующих бактерий Azotobacter chrorococum и Beijerinckia fluminensis, консервант, а также микро- и макроэлементы, например ионы магния, железа, марганца, цинка, молибдена, бора и кобальта (пат. РФ №2148571).

культуральной жидкости, а в качестве консерванта используют поваренную соль, при следующем соотношении компонентов, мас.%

штамм бактерий в культуральной жидкости	50-60
микроэлементы	0,2 - 0,3
поваренная соль	1,0-1,5
вода	остальное до 100

Штамм бактерий Azotobacter vinelandii ВКПМ В-5933 является продуцентом экзополисахарида (патент РФ 2073712). Препарат получают простой и дешевой технологией получения препарата, а именно используют один штамм, что упрощает технологию и позволяет повысить технологическую стерильность.

Штамм Azotobacter vinelanlii (Lipman) выделен из почвы методом почвенных

пластинок из нейтральной пахотной почвы АБС МГУ "Чашково". Штамм депонирован в ВКПМ института "ВНИИгенетики", наименование штамма ФЧ-1, присвоенный номер при депонировании ВКПМ В-5933. Штамм растет на многих натуральных и синтетических средах: МПА, агаризованном сусле, средах Эшби, Виноградского, Федорова. Культивирование на указанных средах осуществляется при 28-30°С в течение 2-2,5 суток при pH 6,8-7,2.

Для улучшения роста культуры и синтеза втор-метаболитов в состав сред вносится азот в виде аммонийных солей и органический азот в виде белково-витаминного концентрата (БВК). На вязкость раствора постферментационной жидкости pH в интервале 2-11 не влияет, система биологически стабильна.

Пример 1. Бактерия Azotobacter vinelandii (Lipman) ВКПМ В-5933 при росте на богатой органической среде (жидком сусле) в условиях аэрации при 20-30°С в течение 48 ч продуцирует экзополисахарид, превращая постферментационную жидкость в гель. Культивирование штамма осуществляли на жидкой минеральной среде, содержащей в 100 г воды K_2HPO_4 - 1,0 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5 г; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,0005 г; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ - 0,005 г.

В качестве источника углеродного питания использовали глюкозу в концентрации 1,5%. При культивировании на жидкой минеральной среде заявляемый штамм требует дополнительный фактор роста - ферментализат БВК в количестве 0,2 г на 100 г воды. Выращивание осуществляли при 28-30°С в условиях аэрации и перемешивании в колбах объемом 750 $см^3$ со 100 мл среды указанного состава в течение 48 ч на качалках (n 220 об/мин). При этом происходит подкисление среды до pH 4,7 за счет выделения органических кислот и CO в культуральную жидкость. Было установлено оптимальное значение pH для роста культуры Azotobacter vinelandii (Lipman) 6,8-7,0 и для синтеза экзополисахаридов 6,8-7,2.

концентрата (БВК). На вязкость раствора постферментационной жидкости pH в интервале 2-11 не влияет, система биологически стабильна.

Пример 1. Бактерия Azotobacter vinelandii (Lipman) ВКПМ B-5933 при росте на богатой органической среде (жидком сусле) в условиях аэрации при 20-30°C в течение 48 ч продуцирует экзополисахарид, превращая постферментационную жидкость в гель. Культивирование штамма осуществляли на жидкой минеральной среде, содержащей в 100 г воды K_2HPO_4 - 1,0 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5 г; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,0005 г; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ - 0,005 г.

В качестве источника углеродного питания использовали глюкозу в концентрации 1,5%. При культивировании на жидкой минеральной среде заявляемый штамм требует дополнительный фактор роста - ферментализат БВК в количестве 0,2 г на 100 г воды. Выращивание осуществляли при 28-30°C в условиях аэрации и перемешивании в колбах объемом 750 $см^3$ со 100 мл среды указанного состава в течение 48 ч на качалках (n 220 об/мин). При этом происходит подкисление среды до pH 4,7 за счет выделения органических кислот и CO в культуральную жидкость. Было установлено оптимальное значение pH для роста культуры Azotobacter vinelandii (Lipman) 6,8-7,0 и для синтеза экзополисахаридов 6,8-7,2.

Пример 2. Периодическое культивирование штамма Azotobacter vinelandii (Lipman) осуществляют в аппаратах типа АНКум объемом 10 л, рабочий объем 4 л. Использовали среду из примера 1. В качестве источника углеродного питания применяли этанол в количество 1 об. В качестве инокулята использовали штамм, полученный по примеру 1, в колбе на качалке. Количество инокулята 10-20%. Условия проведения процесса: температура 28-30°C, pH 6,8-7,2, подача воздуха 0,5 л/л среды в 1 мин, скорость перемешивания 300 об/мин, время культивирования 18-20 ч. Содержание живых бактерий в культуральной жидкости $1,3 \times 10^9$ кл/мл. Процесс идет стабильно, ассоциация устойчиво сохраняет свои свойства в пяти последовательных ферментациях.

Авторами были установлены новые свойства штамма бактерий Azotobacter vinelandii ВКПМ B-5933. Указанная культура обладает рядом ценных характеристик: возможность развития на кислых почвах (pH меньше 5,5), в условиях пониженной влажности (12-14%), на почвах, бедных органикой. Культура накапливает значительные количества витаминов (табл.1). При определенных условиях культура синтезирует значительное количество полисахаридов-альгинатов, которые играют важную роль в выживаемости и адаптационных процессах при внесении препарата в почву. Температурный режим +12+40°C.

При выращивании культуры Azotobacter vinelandii ВКПМ B-5933 на плотных средах культура образует так называемую полисахаридную капсулу, что способствует устойчивости биопрепарата при хранении и в почве.

При разработке состава препарата с использованием культуры Azotobacter vinelandii ВКПМ B-5933 было проверено влияние микроэлементов: кобальта, молибдена, бора,

Додаток 2

+Model
RAM-195; No. of Pages 7

ARTICLE IN PRESS

Rev Argent Microbiol. 2017;xxx(xx):xxx–xxx

asociación argentina de microbiología

REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram

ORIGINAL ARTICLE

Azotobacter chroococcum as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization

Felipe Romero-Perdomo[a], Jorge Abril[a], Mauricio Camelo[a], Andrés Moreno-Galván[a], Iván Pastrana[a], Daniel Rojas-Tapias[a,b], Ruth Bonilla[a,*]

[a] *Laboratorio de Microbiología de Suelos, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, Mosquera 250014, Colombia*
[b] *Graduate Field at Department of Microbiology, Cornell University, Wing Hall, Ithaca, NY 14853, USA*

Received 17 November 2016; accepted 21 April 2017

KEYWORDS
Plant growth-promoting (rhizo)bacteria (PGPR/PGPB);
Biofertilizer;
Nitrogen-fixing bacteria;
IAA;
Phosphate solubilization

Abstract The aim of this research was to evaluate whether the application of two plant growth-promoting (rhizo)bacteria might reduce nitrogen fertilization doses in cotton. We used strains *Azotobacter chroococcum* AC1 and AC10 for their proven ability to promote seed germination and cotton growth. These microorganisms were characterized by their plant growth-promoting activities. Then, we conducted a glasshouse study to evaluate the plant growth promoting ability of these strains with reduced doses of urea fertilization in cotton. Results revealed that both strains are capable of fixing nitrogen, solubilizing phosphorus, synthesizing indole compounds and producing hydrolytic enzymes. After 12 weeks, the glasshouse experiment showed that cotton growth was positively influenced due to bacterial inoculation with respect to chemical fertilization. Notably, we observed that microbial inoculation further influenced plant biomass ($p < 0.05$) than nitrogen content. Co-inoculation, interestingly, exhibited a greater beneficial effect on plant growth parameters compared to single inoculation. Moreover, similar results without significant statistical differences were observed among bacterial co-inoculation plus 50% urea and 100% fertilization. These findings suggest that co-inoculation of *A. chroococcum* strains allow to reduce nitrogen fertilization doses up to 50% on cotton growth. Our results showed that inoculation with AC1 and AC10 represents a viable alternative to improve cotton growth while decreasing the N fertilizer dose and allows to alleviate the environmental deterioration related to N pollution.
© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

PALABRAS CLAVE
(Rizo)bacteria promotora de crecimiento vegetal;
Biofertilizante;
Bacteria fijadora de nitrógeno;
AIA;
Solubilización de fosfato

Azotobacter chroococcum como biofertilizante bacteriano potencialmente útil para el algodón (_Gossypium hirsutum_ L.): efecto en la reducción de la fertilización nitrogenada

Resumen El objetivo de esta investigación fue evaluar si la aplicación de 2 (rizo)bacterias promotoras del crecimiento vegetal podría reducir la dosis de fertilizante nitrogenado en el cultivo de algodón. Se usaron las cepas *Azotobacter chroococcum* AC1 y AC10 por su habilidad para promover la germinación de semillas y el crecimiento del algodonero. Estos microorganismos fueron caracterizados sobre la base de sus actividades de promoción del crecimiento vegetal. Luego se realizó un estudio de invernadero con plantas de algodón para evaluar la capacidad de promoción del crecimiento vegetal de dichas cepas con dosis reducidas de urea. Los resultados revelaron que ambas cepas son capaces de fijar nitrógeno, solubilizar fósforo, sintetizar compuestos indólicos y producir enzimas hidrolíticas. Después de 12 semanas, el experimento de invernadero permitió observar que el crecimiento del algodón fue influido positivamente por la inoculación bacteriana con respecto a la fertilización química. En particular, se evidenció que la inoculación microbiana impactó más en la biomasa vegetal ($p < 0,05$) que en el contenido de nitrógeno. Curiosamente, la coinoculación exhibió un mayor efecto positivo sobre los parámetros de crecimiento en comparación con la inoculación simple. Además, se observaron resultados similares, sin diferencias estadísticamente significativas, entre la coinoculación bacteriana más del 50% de urea y el 100% de fertilización. Estos hallazgos indican que la coinoculación de las cepas de *A. chroococcum* AC1 y AC10 permitiría reducir las dosis de fertilización nitrogenada del cultivo de arroz en hasta el 50% y aliviar, de esta manera, el deterioro ambiental relacionado con la contaminación por N.
© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Introduction

Sustainable agricultural production requires new approaches to reduce the applications of polluting agrochemicals. In particular, the application of synthetic nitrogen fertilizers (SNF) represents an important environmental threat as it involves pollution due to its production and usage[33]. Within 40–50% of the total fertilizers involved in nitrogen uptake are not assimilated immediately by plants or are lost *via* leaching, denitrification, volatilization and are subject to conversion into unavailable forms. Poor assimilation of nutrients eventually leads to an increasing utilization of SNF, which reduces soil fertility, and biodiversity, contaminates groundwater, and consequently affects human health[19]. In Colombia, the unsustainable cotton production system is an example of the negative aftermath of SNF overuse. Low profitability for producers, lower export competitiveness, and environmental degradation are some consequences of this problem[5]. One potential solution to overcome this major challenge is the study of the biological processes involving plant growth-promoting (rhizo)bacteria (PGPR/PGPB) and their interaction with plants[2].

The group of PGPR/PGPB encompasses several bacterial phyla, and although the direct molecular mechanisms associated to plant growth promotion remain poorly understood, it is widely accepted that their primary effect on plant growth is due to increasing availability of essential nutrients, plant growth stimulation, phytopathogen control, and decrease of negative effects in some abiotic stress involved in plant growth[8,9]. Several lines of evidence suggesting direct mechanisms of PGPR/PGPB involved in plant growth promotion are the following: (i) production of ACC deaminase, which reduces the level of ethylene in crop roots thus enhancing root length and density; (ii) symbiotic and associative nitrogen fixation, which increases the availability of soluble nitrogen in soil; (iii) nutrient solubilization and mineralization (*e.g.* P, K, Zn and Si), which increases the availability of those elements for plant uptake; (iv) synthesis of phytohormones such as indoles, gibberellins, abscisic acid and cytokinins which modulate plant growth and division; (v) ability to produce siderophores, hydrolytic enzymes and antibiotics, which renders the cells more competitive over niche colonization; (vi) quorum sensing signal interference and inhibition of biofilm formation, and (vii) enhanced resistance to stresses by synthesis of water soluble vitamins as niacin, thiamine and biotin[4,12]. Undoubtedly, the relationship among those bacterial attributes are associated to plant growth promotion in diverse studies, and hence their use is promising as a biotechnological tool to be integrated into the agricultural production systems[13].

Within the PGPR/PGPB group, the nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter chroococcum* has shown to promote the growth of different crops under different soil types and climatic conditions[15]. Indeed, recent literature suggests that *A. chroococcum* might be a potential alternative to ameliorate the negative impact of NaCl on maize growth[29]. Although their positive effects on plant growth have been reported, few studies have explored the potential of *A. chroococcum* as supplement of chemical fertilization. For

example, Bonilla et al.[5] found that the application of *A. chroococcum* AC1 and AC10 increases cotton biomass. Moreover, significant differences in all plant growth parameters were evidenced between the inoculated treatment and the full fertilizer rate (positive control). They suggested that the use of AC1 and AC10 could not completely replace nitrogen (N) fertilizer. The goal of this work was to determine whether the inoculation of these *A. chroococcum* strains might reduce N fertilization rates in cotton. For this purpose, we evaluated the integrated use among these microorganisms and different doses of urea on plant growth attributes and nitrogen content under glasshouse conditions. Moreover, we related the evidenced results with the plant growth-promoting traits measured in these bacteria.

Materials and methods

Microorganisms and culture conditions

We used the *Gossypium hirsutum*-associated bacterial strains *A. chroococcum* AC1 and *A. chroococcum* AC10 for their compatibility, and ability to promote seed germination and growth of cotton without fertilization[5]. AC1 and AC10 strains were obtained from the Soil Microbiology Lab at Corpoica, Colombia. For routine use, both strains were stored at −80 °C in 50% (v/v) glycerol in MBR broth[22], and grown on Ashby plates (composition in g/l: mannitol 10.0, K_2HPO_4 0.2, $MgSO_4$ 0.2, NaCl 0.2, $CaSO_4$ 0.1, $CaCO_3$ 5.0, agar 15.0, pH 7.5) at standard conditions (*i.e.* 30 °C for 48 h). All reagents used were from Merck, Millipore, USA.

In vitro screening of plant growth promoting features

In order to characterize the plant growth promoting (PGP) traits of AC1 and AC10 strains, the ability to fix nitrogen[11], solubilize nutrients as P[10] and potassium[17], produce the ACC deaminase enzyme[16], synthesize Indole Acetic Acid (IAA)[6,14] and siderophores[31], and secrete cell-wall-degrading enzymes (proteases and chitinases) and other enzymes such as pectinases, cellulases, amylases, and ureases[7] were evaluated. Each assay was performed with at least two biological replicates, and three technical replicates.

Influence of *A. chroococcum* and fertilizers on cotton

In order to determine whether inoculation with AC1 and AC10 as single or mixed inoculation could reduce the fertilization dosage on cotton, we established a glasshouse experiment at Centro de Investigación Motilonia (CIM) of Corpoica, Agustín Codazzi, Colombia. The experiment was carried out in a completely randomized design (CRD) with six treatments. Each experiment was performed three times with six replicates. The fertilizer doses were 100, 75 and 50% (p/v) of urea (Ecofertil® Colombia) with respect 75 kg/ha−2.34 g/pot for urea, 50 kg/ha−1.56 g/pot for DAP and 50 kg/ha−1.56 g/pot for KCl. We used *A. chroococcum* AC1, AC10, AC1 + AC10 (1:1) strains, and sterile MBR broth as control treatment. In all cases, the biological treatments were applied along with 50% urea. Bacterial inoculum ($\sim 1 \times 10^9$ CFU/ml) was prepared by growing the cells in MBR broth, using a Rushton type turbine-agitated fermenter (Miniforms, INF-30174) at 300 rpm, 1 lpm, and 30 °C during 24 h. Soil was collected from cotton at CIM and its preparation was performed according to Rojas-Tapias et al.[29]. Cotton seedlings of DP ACALA 90 were surface-sterilized using 1% (v/v) NaClO for 10 min and rinsed three times in deionized-sterilized water. The surface-sterilized seeds were inoculated ($\sim 4 \times 10^8$ CFU/ml/seed) by soaking with 10 ml of inoculum or in sterile MBR broth as a control for 30 min. Two inoculated seeds were planted in 600 g of soil/pot. Five ml of each bacterial suspension ($\sim 1 \times 10^9$ CFU/ml/pot) were re-inoculated in the rhizosphere per treatment after 20 and 40 days of establishment. Soil chemical and physical properties are listed below: pH (7.15), organic matter (3.02%), effective cationic interchange coefficient (15.23 cmol/kg), P (215.93 ppm), S (15.08 ppm), Ca (13.37 cmol/kg), Mg (1.8 cmol/kg), K (0.63 cmol/kg), Na (0.05 cmol/kg), Fe (38.5 ppm), Mn (2.2 ppm), Cu (1.7 ppm). Plants grown at 25–35 °C, 16:8 day/night regime with daily water application. After 90 days, flowering stage, root and shoot length were measured. Samples were dried at 50 °C for 72 days and subsequently, dry weights were taken (boll, shoot and root). In addition, nitrogen (N) content was estimated over the total plant tissue in the LISSALAB Laboratory at Corpoica.

Data analysis

Statistical analysis was performed using ANOVA ($\alpha = 0.05$) and the Tukey's HSD test. Associations among variables were examined by a simple correlation analysis. These analyses and graphics were performed using the GraphPad prism 7 software (Graphpad, San Diego, CA).

Results and discussion

Inoculation with bacteria improves plant growth regardless of chemical treatment

Rhizosphere is a highly dynamic environment in which complex interactions take place between plants and microorganisms. The understanding of those biological interactions represents a potential opportunity for biotechnological developments and could increase crop yield while reducing the use of agrochemicals[28]. In this study, the biofertilizer potential of *Azotobacter* strains with N fertilizer doses were evaluated in a glasshouse experiment to determine whether inoculation could replace N fertilization rates in cotton growth.

The results showed inoculation with bacteria caused a significantly increase ($p \leq 0.05$) in plant growth compared to

Додаток 3

(19) **RU** (11) **2 231 546** (13) **C2**

(51) МПК[7] **C 12 N 1/20//(C 12 N 1/20, C 12 R 1:065)**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2002123083/13, 28.08.2002

(24) Дата начала действия патента: 28.08.2002

(46) Дата публикации: 27.06.2004

(56) Ссылки: КАРАСЕВИЧ Ю.Н. Основы селекции микроорганизмов, утилизирующих синтетические соединения. - М.: Наука, 1982. SU 1703634 A1, 07.01.1992. RU 99112161 A, 20.01.2002.

(98) Адрес для переписки:
634050, г.Томск, пр. Ленина, 36, Томский госуниверситет, Отдел интеллектуальной собственности, зав. отделом В.Н. Воронину

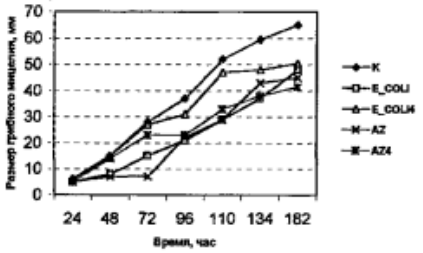
(72) Изобретатель: Вайшля О.Б. (RU), Бондаренко А.А. (RU)

(73) Патентообладатель:
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Томский государственный университет" (RU)

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ AZ D10 ВКМ B-2272 Д, ОБЛАДАЮЩИЙ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ И УСТОЙЧИВЫЙ К ДЕЛЬТАМЕТРИНУ

(57)

Изобретение относится к сельскохозяйственной микробиологии и может быть использован для получения бактериального препарата, повышающего урожайность сельскохозяйственных культур. Проводят адаптацию штамма бактерий Azotobacter chroococcum, выделенного из темно-серой почвы Томской области, путем многостадийного повышения концентрации дельтаметрина с целенаправленным инкубированием клеток. Получают новый штамм Az d 10 ВКМ B-2272, обладающий ростостимулирующими и фунгистатическими свойствами, что позволяет использовать его при получении эффективного бактериального препарата и применять в качестве стимулятора роста растений одновременно с инсектицидными химическими препаратами. 2 табл., 6 ил.



Рост Fusarium oxysporum под действием бактерий (E.coli 4, Az 4 - четвертое разведение)

Фиг. 1

RU 2231546 C2

RU 2231546

(19) **RU** (11) **2 231 546** (13) **C2**

(51) Int. Cl.[7] **C 12 N 1/20//(C 12 N 1/20, C 12 R 1:065)**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2002123083/13, 28.08.2002

(24) Effective date for property rights: 28.08.2002

(46) Date of publication: 27.06.2004

(98) Mail address:
634050, g.Tomsk, pr. Lenina, 36, Tomskij gosuniversitet, Otdel intellektual'noj sobstvennosti, zav. otdelom V.N. Voroninu

(72) Inventor: Vajshlja O.B. (RU), Bondarenko A.A. (RU)

(73) Proprietor:
Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego professional'nogo obrazovanija "Tomskij gosudarstvennyj universitet" (RU)

(54) STRAIN OF BACTERIUM AZ D10 VKM B-2272 D ELICITING GROWTH-STIMULATING PROPERTIES AND RESISTANT TO DELTAMETHRIN

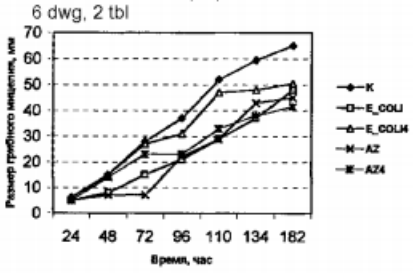
(57) Abstract:

FIELD: agricultural microbiology.

SUBSTANCE: invention can be used for preparing the bacterial preparation enhancing productivity of agricultural crops. Method involves adaptation of the bacterium strain Azotobacter chroococcum isolated from dark-gray soil in Tomsk region by multistage elevating the concentration of deltamethrin in combination with goal-seeking incubation of cells. Using such method the novel strain Az d 10 VKM B-2272 D is obtained that shows growth-stimulating and fungistatic properties that provides its using in preparing the effective bacterial preparation and to use its as the plant growth-stimulating agent being with insecticide chemical preparations simultaneously.

EFFECT: valuable properties of strain.

6 dwg, 2 tbl



Рост Fusarium oxysporum под действием бактерий
(E.coli 4, Az 4 - четвертое разведение)

Фиг. 1

RU 2231546 C2

RU 2231546 C2

Изобретение относится к сельскохозяйственной микробиологии и касается получения нового штамма микроорганизмов, обладающего ростостимулирующими и фунгистатическими свойствами. Штамм может быть использован для получения бактериального препарата, повышающего урожайность сельскохозяйственных культур.

В агропроизводстве широко используются полезные свойства микроорганизмов, в частности азотобактера, для культивации почвы в целях повышения урожайности [1. Рубенчик Л.И. Азотобактер и его применение в сельском хозяйстве. Изд. АН УССР, Киев, 1960]. Известен штамм Azotobacter chroococcum Beijering 1901 В 3344 -Т12 Института цитологии и генетики АН БССР, обладающий ростостимулирующими свойствами, а также штамм Azotobacter chroococcum Beijering 1901 В 3721-3064 НПО "Биотехнология", культивируемый на среде Бэрка и используемый для повышения урожайности [2. Карасевич Ю.Н. Основы селекции микроорганизмов, утилизирующих синтетические органические соединения. Изд. "Наука". Москва, 1982]. Последний штамм принят за прототип.

Известные штаммы не обладают устойчивостью к дельтаметрину. Внесение в почву биопрепаратов на их основе совместно с инсектицидами, содержащими дельтаметрин, приводит к гибели живых бактериальных клеток, что не позволяет применять известные штаммы для почв, обработанных некоторыми химическими препаратами ("Децис" и ему подобные).

Задача изобретения - получение культурального штамма, обладающего ростостимулирующими и фунгистатическими свойствами и устойчивого к дельтаметрину.

Указанная задача решена путем получения неизвестного ранее штамма микроорганизмов, получившего название Az d10, и использованием его при производстве бактериального препарата. Новый штамм Az d10 получен в Томском государственном университете из известного штамма бактерий Azotobacter chroococcum, выделенного в 1997 году из темно-серой почвы Томской области, путем его постепенной адаптации к дельтаметрину. Адаптация проведена путем многостадийного повышения концентрации дельтаметрина при целенаправленном

(г/л): маннит - 20,0; К2 HPO_4 - 0,2; $MgSO_4 \square 7H_2O$ - 0,2; NaCl - 0,2; $FeSO_4$ - 0,1; $CaCO_3$ - 5,0; агар - 20,0. На вторые-третьи сутки штамм образует выпуклые мутно-белые колонии. На твердой питательной среде колонии клеток существуют в виде слизистых бесцветных или мутно-белых образований округлой выпуклой формы с гладкой поверхностью.

Физиологические признаки: штамм аэробный, микроаэрофильный каталозоположительный. Источники углерода при аэробном росте - глюкоза, маннит, сахароза. Пигментация колоний и среды отсутствует. Штамм растет при комнатной температуре при pH 4,8-8,5. При концентрации NaCl 20 г/л и более рост прекращается. Оптимальные условия роста - температура 29±31°С при pH 7,0-7,5, концентрация NaCl - 0,2 -0,3 г/л.

Для культивирования штамма Az dl0 применяют питательную среду следующего состава (г/л): меласса - 30,0, K_2 HPO_4 - 0,2; $MgSO_4 \square 7H_2O$ - 0,3; NaCl - 0,3; K_2SO_4 - 0,1; $FeSO_4$ - 0,005; Mn SO_4 - 0,005; аммоний молибденовокислый - 0,005; $CaCO_3$ - 3,5; дельтаметрин - 0,01. Выращивание осуществляют в колбах методом глубинного культивирования на качалке при 200 об/мин.

Свойства штамма

Отличительным признаком заявляемого штамма является устойчивость к дельтаметрину. Штамм Az dl0 устойчив к дельтаметрину, сохраняя, в отличие от прототипа, способность синтезировать ростостимулирующие и фунгистатические вещества. Штамм Az d 10 не патогенен, не фитопатогенен. Свойства штамма стабильны при хранении на скошенной агаризованной среде при температуре +5°С в течение 3-х месяцев и сохраняют способность к многократной воспроизводимости. Поскольку заявляемый штамм получен впервые и ранее не использовался в промышленной технологии, можно сделать вывод о соответствии его критерию "новизна".

Дополнительные свойства

Для штамма Az d10 характерна повышенная способность к продуцированию ИУК - 7,3 мкг/мл.

Получение штамма

Штамм получили путем выделения бактерий из почвы на специфичной среде без

RU 2231546 C2

RU 22

селекции микроорганизмов, утилизирующих синтетические органические соединения. Изд. "Наука". Москва, 1982]. Последний штамм принят за прототип.

Известные штаммы не обладают устойчивостью к дельтаметрину. Внесение в почву биопрепаратов на их основе совместно с инсектицидами, содержащими дельтаметрин, приводит к гибели живых бактериальных клеток, что не позволяет применять известные штаммы для почв, обработанных некоторыми химическими препаратами ("Децис" и ему подобные).

Задача изобретения - получение культурального штамма, обладающего ростостимулирующими и фунгистатическими свойствами и устойчивого к дельтаметрину.

Указанная задача решена путем получения неизвестного ранее штамма микроорганизмов, получившего название Az d10, и использованием его при производстве бактериального препарата. Новый штамм Az d10 получен в Томском государственном университете из известного штамма бактерий Azotobacter chroococcum, выделенного в 1997 году из темно-серой почвы Томской области, путем его постепенной адаптации к дельтаметрину. Адаптация проведена путем многостадийного повышения концентрации дельтаметрина при целенаправленном инкубировании клеток.

Полученный штамм Az d10 депонирован Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов (ИБФМ им. Г.К.Скрябина, г. Москва) 16.10.2001 г. под № ВКМ В-2272 Д. Штамм депонирован с научным описанием (паспортом).

Штамм Az dl0 ВКМ В-2272 Д характеризуется следующими признаками.

Морфологические признаки: клетки имеют овальную форму от палочковидных до кокковидных, размножаются простым делением, спор не образуют. Подвижны, жгутикование перитрихальное. Диаметр клеток колеблется от 1,5 до 2,0 мкм. При окраске по Грамму (окраска кристаллическим фиолетовым с последующей обработкой раствором Люголя, спиртом и фуксином) клетки Az dl0 дают отрицательную реакцию.

Культуральные признаки: рост штамма проверен на селективной тест-среде Эшби

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,3; NaCl - 0,3; K_2SO_4 - 0,1; $FeSO_4$ - 0,005; Mn SO_4 - 0,005; аммоний молибденовокислый - 0,005; $CaCO_3$ - 3,5; дельтаметрин - 0,01. Выращивание осуществляют в колбах методом глубинного культивирования на качалке при 200 об/мин.

Свойства штамма

Отличительным признаком заявляемого штамма является устойчивость к дельтаметрину. Штамм Az dl0 устойчив к дельтаметрину, сохраняя, в отличие от прототипа, способность синтезировать ростостимулирующие и фунгистатические вещества. Штамм Az d 10 не патогенен, не фитопатогенен. Свойства штамма стабильны при хранении на скошенной агаризованной среде при температуре +5°С в течение 3-х месяцев и сохраняют способность к многократной воспроизводимости. Поскольку заявляемый штамм получен впервые и ранее не использовался в промышленной технологии, можно сделать вывод о соответствии его критерию "новизна".

Дополнительные свойства

Для штамма Az d10 характерна повышенная способность к продуцированию ИУК - 7,3 мкг/мл.

Получение штамма

Штамм получили путем выделения бактерий из почвы на специфичной среде без азота (среда Эшби) и идентифицировали с помощью специальных методов и тестов. Изучили культуральные, морфологические и физиологические свойства штамма. Затем провели его адаптацию к повышенному содержанию дельтраметрина. При этом концентрацию дельтаметрина в питательной среде увеличивали с каждым пересевом микроорганизмов по специально разработанной методике.

Эвристические моменты теоретических и экспериментальных научных исследований позволяют сделать вывод о соответствии полученного технического решения критерию "изобретательский уровень".

Получение биомассы, выход полезного продукта

Штамм культивируется на питательной среде следующего состава (г/л): меласса - 30; KH_2PO_4 - 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,3; NaCl - 0,3; K_2SO_4 - 0,1; $FeSO_4$ - 0,005; $MnSO_4$ -

RU 2231546 C2

RU 2231546 C2

Azotobacter chroococcum – A Potential Biofertilizer in Agriculture: An Overview

Sartaj A. Wani, Subhash Chand, Muneeb A. Wani, M. Ramzan, and Khalid Rehman Hakeem

Contents

1 Introduction 334
2 Taxonomy, Morphology and Distribution of *Azotobacter* 334
3 Mode of Action of *Azotobacter* on Plant Growth 336
3.1 Nitrogen Fixation 337
3.2 Growth Promoting and Other Substances Produced by Azotobacter 338
3.3 Response of Crops to Growth Promoting Substances 339
4 Interaction of *Azotobacter* with Other Microorganisms 340
4.1 Interaction with Rhizobium 340
4.2 Interaction with Azospirillum 341
5 Possibility of Using *Azotobacter* in Crop Production 341
5.1 Effects of Azotobacter on Growth and Yield of Crops 342
6 Conclusion 344
References 344

Abstract Research on *Azotobacter chroococcum spp*. in crop production has manifested its significance in plant nutrition and its contribution to soil fertility. The possibility of using *Azotobacter chroococcum* in research experiments as microbial inoculant through production of growth substances and their effects on the plant has markedly enhanced crop production in agriculture. Being free living N_2-fixer diazotroph, *Azotobacteria* genus synthesizes auxins, cytokinins, and GA like substances and these growth materials are the primary substances regulating the enhanced growth. It stimulates rhizospheric microbes, protects the plants from phyto-pathogens,

S.A. Wani (✉) • S. Chand
Division of Soil Science, Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences and Technology-Shalimar, Srinagar, Kashmir 190001, India
e-mail: sartajmess@gmail.com

M.A. Wani
Division of FLA, Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences and Technology-Shalimar, Srinagar, Kashmir 190001, India

M. Ramzan
Department of Botany, Aligarh Muslim University, Aligarh, Uttar Pradesh, India

K.R. Hakeem (✉)
Faculty of Forestry, Universiti Putra Malaysia, 43400 Serdang, Selangor, Malaysia
e-mail: kur.hakeem@gmail.com

© Springer International Publishing Switzerland 2016

K.R. Hakeem et al. (eds.), *Soil Science: Agricultural and Environmental Prospectives*, DOI 10.1007/978-3-319-34451-5_15

improves nutrient uptake and ultimately boost up biological nitrogen fixation. These hormonal substances, which originate from the rhizosphere or root surface, affect the growth of the closely associated higher plants. In order to guarantee the high effectiveness of inoculants and microbiological fertilizers it is necessary to find the compatible partners, i.e. a particular plant genotype and a particular *Azotobacter* strain that will form a good association.

Keywords *Azotobacter chroococcum* • Nitrogen fixation • Microbial inoculant • Soil fertility

1 Introduction

Biofertilizers also called as bio-inoculants, the organic preparations containing microorganisms are beneficial to agricultural production in terms of nutrient supply particularly with respect to N and P. When applied as seed treatment or seedling root dip or as soil application, they multiply rapidly and develop a thick population in rhizosphere. Biofertilizers can fix atmospheric N through the process of biological nitrogen fixation (BNF), solubilize plant nutrients like phosphates and stimulate plant growth through synthesis of growth promoting substances. They have C: N ratio of 20:1 indicating the capacity of the biofertilizer to release nutrients. Being eco-friendly, non hazardous and non-toxic products, biofertilizers are nowadays gaining the importance in agriculture (Sharma et al. 2007; Hakeem et al. 2016). They are cheaper and low capital intensive.

Biofertilizers benefiting the crop production include *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Blue green algae*, *Azolla, P-solubilizing microorganisms*, *mycorrhizae* and *sinorhizobium* (Selvakumar et al. 2009). *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter agilis* were first of all studied by Beijerinck (1901). The first species of the genus *Azotobacter*, named *Azotobacter chroococcum* family *Azotobacteriaceae*, was isolated from the soil in Holland in 1901. In subsequent years several other types of *Azotobacter* group have been found in the soil and rhizosphere such as *Azotobacter vinelandii*, Lipman (1903); *Azotobacter beijerinckii*, Lipman (1904); *Azotobacter nigricans*, Krassilnikov (1949); *Azotobacter paspali*, Dobereiner (1966), *Azotobacter armenicus*, Thompson and Skerman (1981); *Azotobacter salinestris*, Page and Shivprasad (1991).

2 Taxonomy, Morphology and Distribution of *Azotobacter*

The genus *Azotobacter* includes 6 species, with *A. chroococcum* most commonly inhabiting many soils all over the world (Mahato et al. 2009). Among the saprophytes along with nodular bacteria, genus *Azotobacter* was considered to be the

most extensively studied (Horner et al. 1942). Aerobic bacteria belonging to the genus *Azotobacter* represent a diverse group of free-living diazotrophic (with the ability to use N_2 as the sole nitrogen source) microorganisms commonly inhibiting the soil. The taxonomic classification of *Azotobacter* is shown below.

Domain	:	Bacteria
Kingdom	:	Bacteria
Phylum	:	Proteobacteria
Class	:	Gammproteobacteria
Order	:	Pseudomonas
Family	:	Pseudomonadaceae/Azotobaceriaceae
Genus	:	Azotobacter

Azotobacter represents the main group of heterotrophic, non-symbiotic free living nitrogen-fixing bacteria principally inhabiting the neutral or alkaline soils. These bacteria are Gram negative and vary in shape. They are generally large ovoid pleomorphic cells of 1.5–2.0 um or more in diameter ranging from rods to coccoid cells. The cells can be dispersed or form irregular clusters or occasionally chains of varying lengths in microscopic preparations. In fresh cultures, the cells are mobile due to the numerous flagella present on their body surface but later the cells lose their mobility, become almost spherical and produce a thick layer of mucus, forming the cell capsule. The shape of the cell is affected by the amino acid glycine which is present in the nutrient medium peptone. Their distribution of existence is diverse and occurs either singly, in paired or irregular clumps and sometime in chains of varying length. Fig. 1 shows different stained *Azotobacter* species cells. *Azotobacter* possesses some unique features among the biofertilizers. They possess more than one type of nitrogenase enzymes (Joerger and Bishop 1988). They do not produce endospores but form cysts, oval or spherical bacteria that form thick-walled cysts (means of asexual reproduction under favorable condition) (Salhia 2013). The formation of cysts is induced by changes in the concentration of nutrients in the medium and addition of some organic substances such as ethanol, n-butanol, or β-hydroxybutyrate. The formation of cysts is also induced by chemical factors and is accompanied by metabolic shifts, changes in catabolism, respiration and biosynthesis of macromolecules (Sadoff 1975). The cysts of *Azotobacter* are spherical and consist of the so-called 'central body'a reduced copy of vegetative cells with several vacuoles and the 'two-layer shell'. The inner part of the shell has a fibrous structure and is called intine and outer part has a hexagonal crystalline structure called as

Додаток 5

Ферменти:

1. Бета-фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26)
2. Фруктокіназа (КФ 2.7.1.4)
3. Глюкозо-6-фосфатна ізомераза (КФ 5.3.1.9)
4. Фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2)
5. Фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2)
6. Глюкозо-6-фосфатна ізомераза (КФ 5.3.1.9)
7. 6-Фосфофруктокіназа 2 (КФ 2.7.1.11)
8. Фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13)
9. Тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1)
10. Гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12)
11. Фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3)
12. Фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12)
13. Енолаза (КФ 4.2.1.11)
14. Піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)
15. Бета-субодиниця піруватдегідрогенази Е1 (КФ 1.2.4.1.)
16. Бета-субодиниця піруватдегідрогенази Е1 (КФ 1.2.4.1)
17. Компонент піруватдегідрогенази Е2 (КФ 2.3.1.12)
18. 6-Фосфоглюконоальдолаза (КФ 3.1.1.31)
19. 6-Фосфоглюконат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.44)
20. Транскетолаза (КФ 2.2.1.1)
21. Глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9)
22. Глутамін - фруктоза-6-фосфатна трансаміназа (КФ 2.6.1.16)
23. Фосфоглюкозаміну мутаза (КФ 5.4.2.10)
24. УДФ-N-ацетилглюкозамін пірофосфорилаза (КФ 2.3.1.157)
25. УДФ-N-ацетилглюкозамін пірофосфорилаза (КФ 2.7.7.23)
26. 1-карбоксивінілтрансфераза UDP-N-ацетилглюкозамін (КФ 2.5.1.7)
27. УДФ-N-ацетиленолпірувойлглюкозамін редуктаза (КФ 1.3.1.98)
28. Аспартат амінотансфераза (КФ 2.6.1.1)
29. Аргінін синтаза (КФ 6.3.5.4)

30. Аспартат кіназа (КФ 2.7.2.4)

31. Аспартат-серміальдегід дегадірогеназа (КФ 1.2.1.11)

32. Гомосерин дегідрогеназа (КФ 1.1.1.3)

33. Гомосерн кіназа (КФ 2.7.1.39)

34. Треонін синтаза (КФ 4.2.3.1)

35. Треонін дегідратаза (КФ 4.3.1.19)

36. Ацетолактат синтаза (КФ 2.2.1.6)

37. Редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86)

38. Редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86)

39. Дигідроксидегідратаза (КФ 4.2.1.9)

40. Амінотрансфераза (КФ 2.6.1.42), лейцин дегідрогеназа (КФ 1.4.1.9)

41. Гомосерин О-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.46)

42. О-Сукцинілхомосерину сульфгідрилаза (КФ 2.5.1.-)

43. 5-Метилтетрагідрофолат-гомоцистеїн метилтрансфераза (КФ 2.1.1.13), метіонін синтаза (КФ 2.1.1.14)

44. 4-Гідрокси-тетрагідродипіколінат (КФ 4.3.3.7)

45. 4-Гідрокси-тетрагідродипіколінат редуктаза (КФ 1.17.1.8)

46. 2,3,4,5-Тетрагідропіридин-2-карбоксилат N-сукцинілтрансферази (КФ 23.1.117)

47. Орнітин / ацетилорнітин амінотрансфераза (КФ 2.6.1.17)

48. Сукцинілдіамінопімелату десцинілаза (КФ 3.5.1.18)

49. Діамінопімелат епімераза (КФ 5.1.1.7)

50. Діамінопімелат декарбоксилаза (КФ 4.1.1.20)

51. Фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (КФ 4.1.1.49)

52. Піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1)

53. НАД (Р) Н-залежна гліцерин-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.94), гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.5.3)

54. Гліцерол-3-фосфатна ацилтрансфераза (КФ 2.3.1.275)

55. Фосфоліпід / гліцерин ацилтрансфераза (КФ 2.3.1.51)

56. Фосфатидат цитидилілтрансферази (КФ 2.7.7.41)

57. Фосфатидилсеринсинтаза (КФ 2.7.8.8)

58. Фосфатидилсерин декарбоксилаза (КФ 4.1.1.65)

59. ЦДФ-Спиртова фосфатидилтрансфераза (КФ 2.7.8.5)
60. Фосфатидилгліцерофосфатаза А (КФ 3.1.3.27)
61. Кардіоліпін-синтаза (КФ 2.7.8.41)
62. Рибулоза-фосфатна 3-епімераза (КФ 5.1.3.1)
63. Транскетолаза (КФ 2.2.1.1)
64. Рибоза-5-фосфатна ізомераза А (КФ 5.3.1.6)
65. Рибоза-фосфатна пірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1.)
66. Карбамоїл-фосфат синтаза невеликого ланцюга (КФ 6.3.5.5)
67. Каталітична субодиниця аспартату карбамоїлтрансферази (КФ 2.1.3.2)
68. Дигідроотаза (КФ 3.5.2.3)
69. Дигідрооратдегідрогеназа (КФ 1.3.98.1, КФ 1.3.5.2)
70. Оротат фосфорибосілтрансфераза (КФ 2.4.2.10)
71. Оротидин 5'-фосфатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.23)
72. Уридилат-кіназа (КФ 2.7.4.22)
73. Нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6)
74. ЦТФ синтетаза (КФ 6.3.4.2)
75. Амідофосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.14)
76. Фосфорибозиламін - гліцинова лігаза (КФ 6.3.4.13)
77. Фосфорибозилгліцинамід формилтрансфераза 2 (КФ 2.1.2.2)
78. Фосфорибозилформілгліцинамідин синтаза (КФ 6.3.5.3)
79. Фосфорибозиламіноімідазол синтетаза (КФ 6.3.3.1)
80. Субодиниця АТФази фосфорибозиламіноімідазол карбоксилази (КФ 6.3.1.18)
81. 5- (карбоксиаміно) імідазол рибонуклеотидна мутаза (КФ 5.499.18)
82. Фосфорибозиламіноімідазол-сукцинокарбоксамід синтаза (КФ 6.3.2.6)
83. Аденілосукцинальний ліаз (КФ 4.3.2.2)
84. Фосфорибозиламіноімідазолекарбоксамід формілтрансфераза (КФ 2.1.2.3)
85. Фосфорибозиламіноімідазолекарбоксамід формілтрансфераза (КФ 3.5.4.10)
86. Інозин-5'-монофосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.205)
87. ГМФ-синтаза [глютамін-гідроліз] (КФ 6.3.5.2)
88. Гуанілат-кіназа (КФ 2.7.4.8)
89. Нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6), піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)

90. Гіпоксантин фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.8)

91. Аденіндезаміназа (КФ 3.5.4.2)

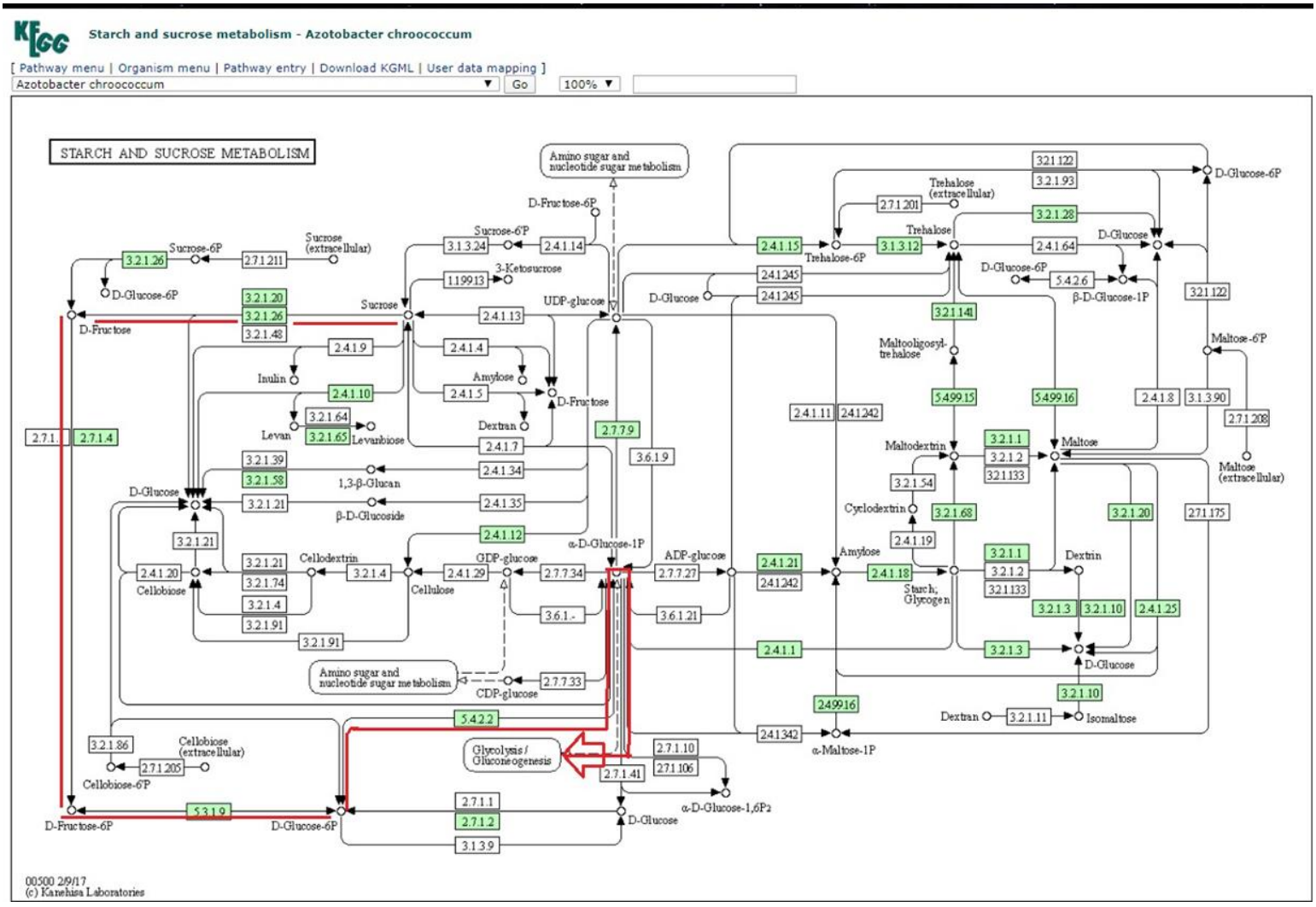
92. Пурин / піримідин-нуклеозид фосфорилаза (КФ 2.4.2.1)

93. 5'-Нуклеотидаза (КФ 3.1.3.5)

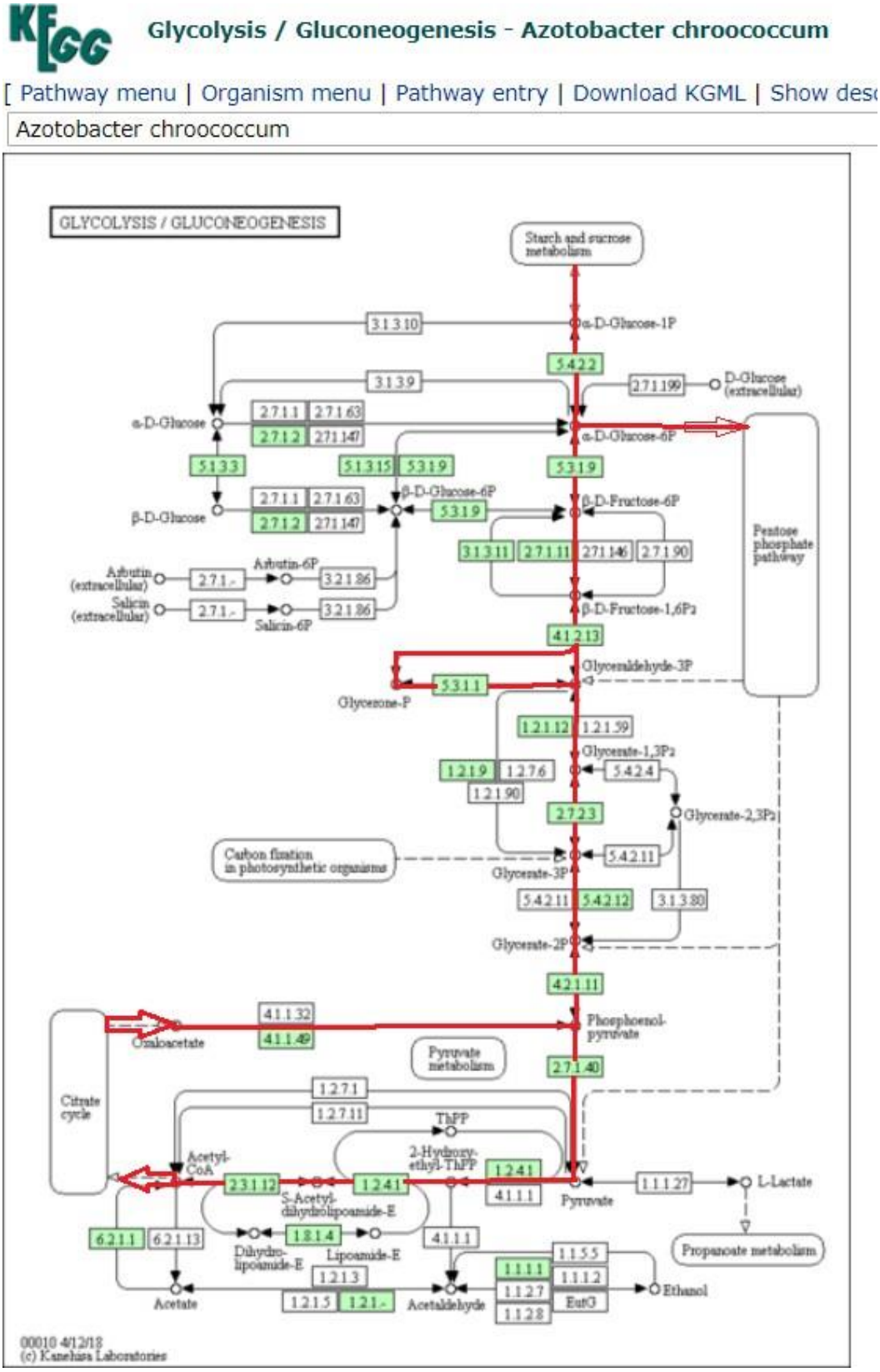
94. Аденілат кіназа (КФ 2.7.4.3)

95. Нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6), піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)

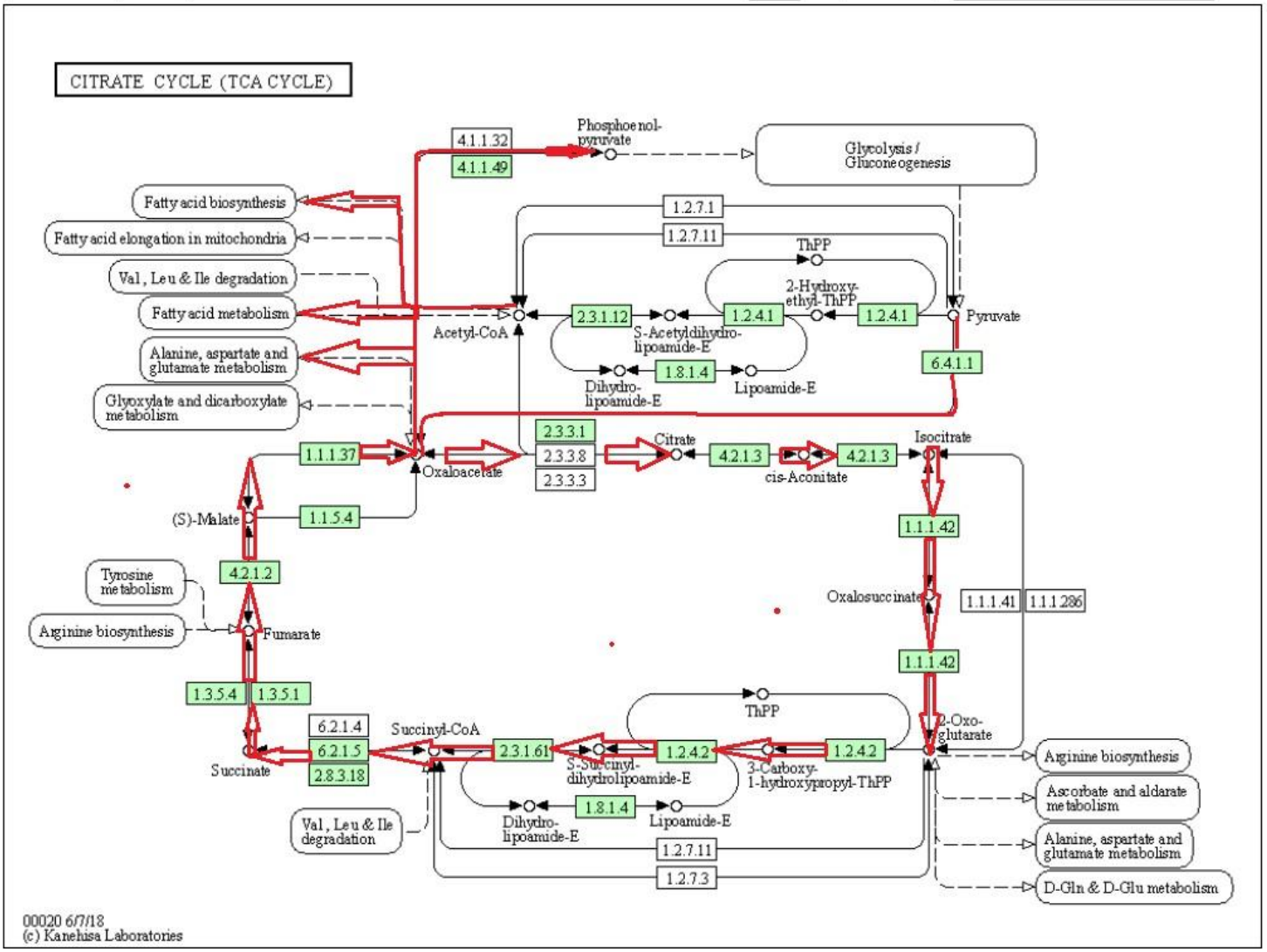
Цукровий метаболізм:



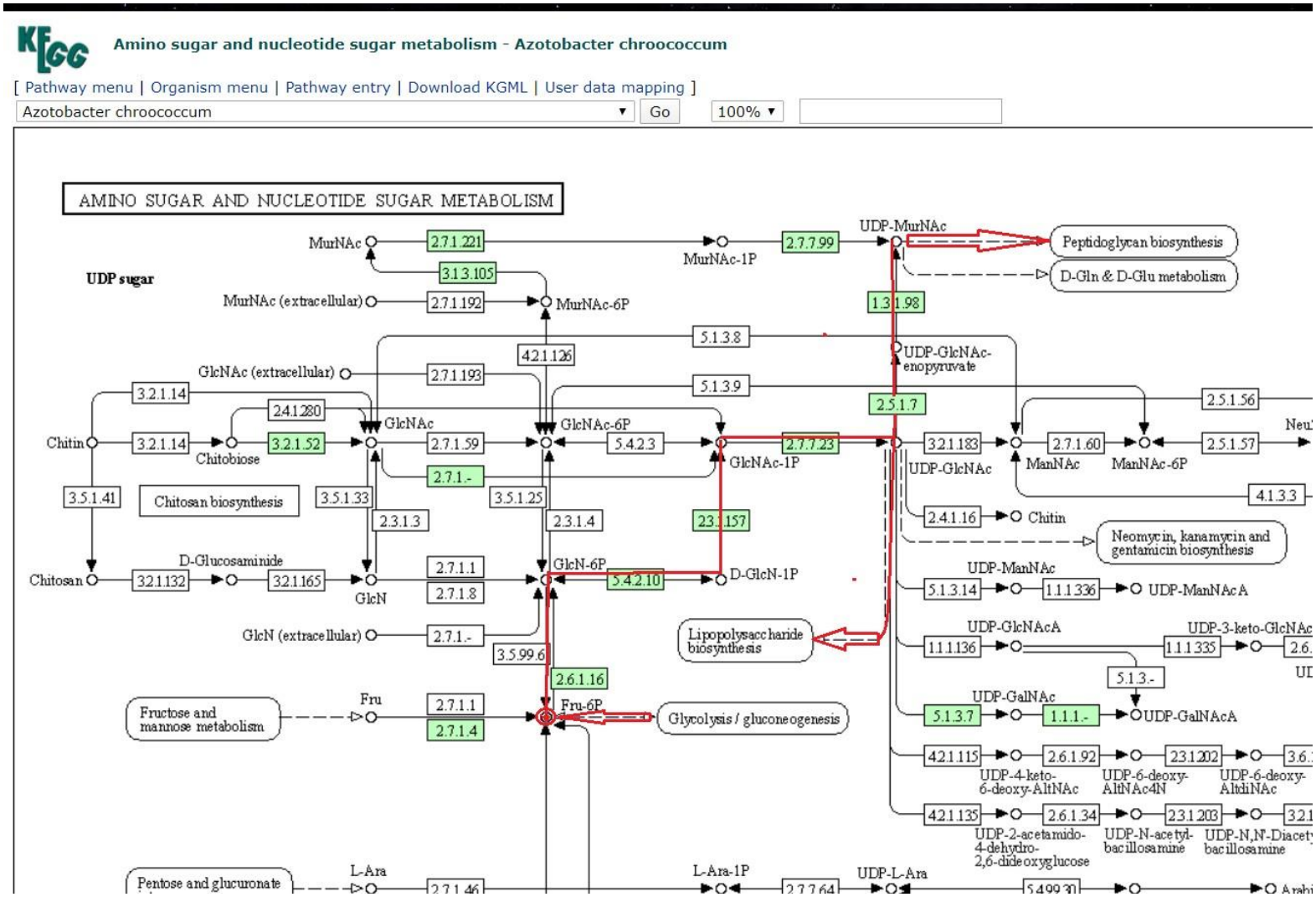
Гліколіз:


Glycolysis / Gluconeogenesis - Azotobacter chroococcum
[Pathway menu | Organism menu | Pathway entry | Download KGML | Show desc
Azotobacter chroococcum
GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS
Starch and sucrose metabolism
α-D-Glucose-1P
D-Glucose (extracellular)
α-D-Glucose
α-D-Glucose-6P
β-D-Glucose
β-D-Glucose-6P
β-D-Fructose-6P
Pentose phosphate pathway
Arbutin (extracellular)
Arbutin-6P
Salicin (extracellular)
Salicin-6P
β-D-Fructose-1,6P2
Glyceraldehyde-3P
Glycerone-P
Glycerate-1,3P2
Glycerate-2,3P2
Carbon fixation in photosynthetic organisms
Glycerate-3P
Glycerate-2P
Phosphoenol-pyruvate
Oxaloacetate
Pyruvate metabolism
Citrate cycle
ThPP
2-Hydroxy-ethyl-ThPP
Acetyl-CoA
S-Acetyl-dihydrolipoamide-E
Pyruvate
L-Lactate
Propanoate metabolism
Dihydro-lipoamide-E
Lipoamide-E
Acetate
Acetaldehyde
Ethanol
00010 4/12/18
(c) Kanehisa Laboratories

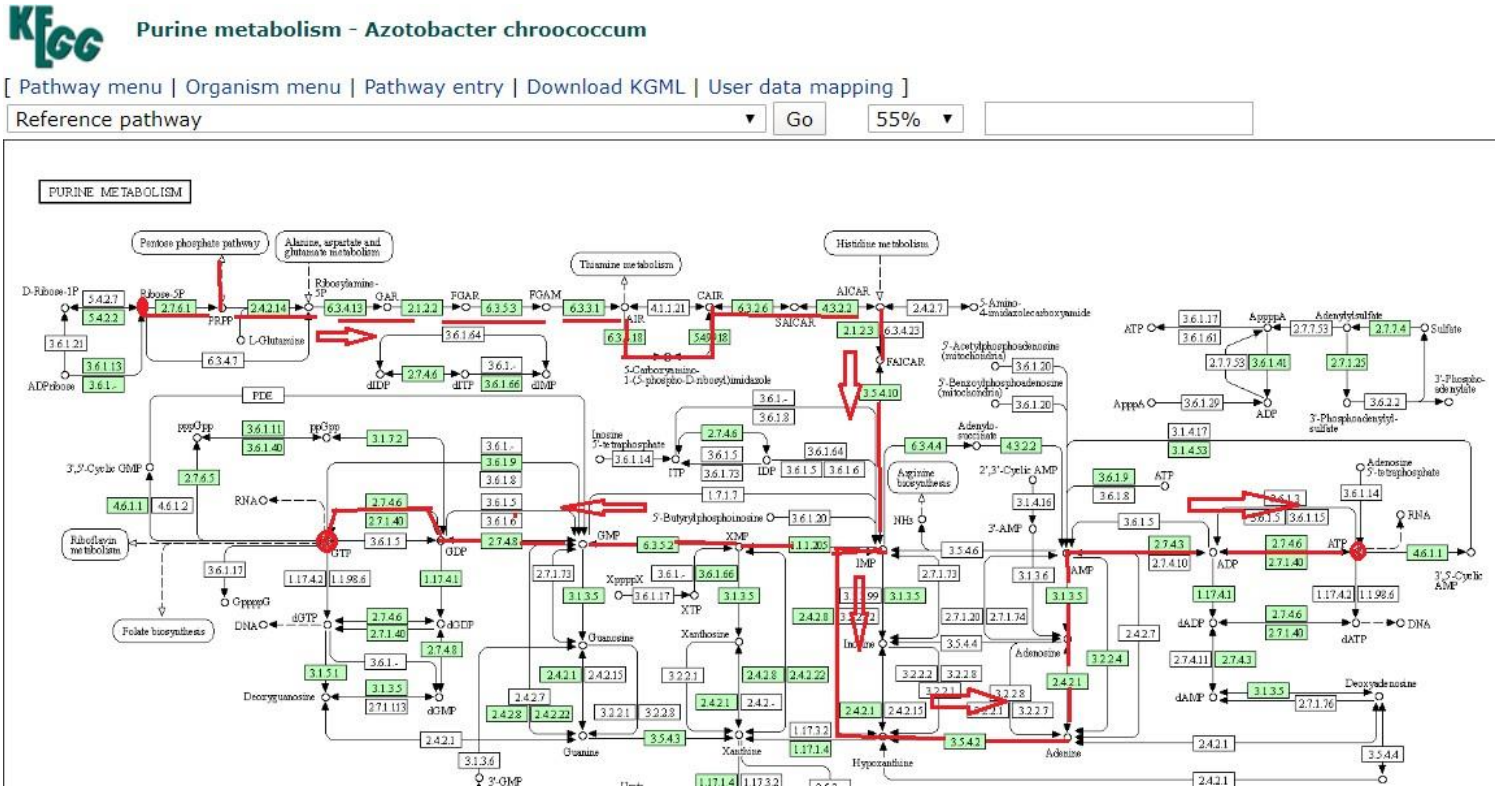
ЦТК, біосинтез жирних кислот та анаплеротичні реакції (ФЕП-оксалоацетат; піруват-оксалоацетат):



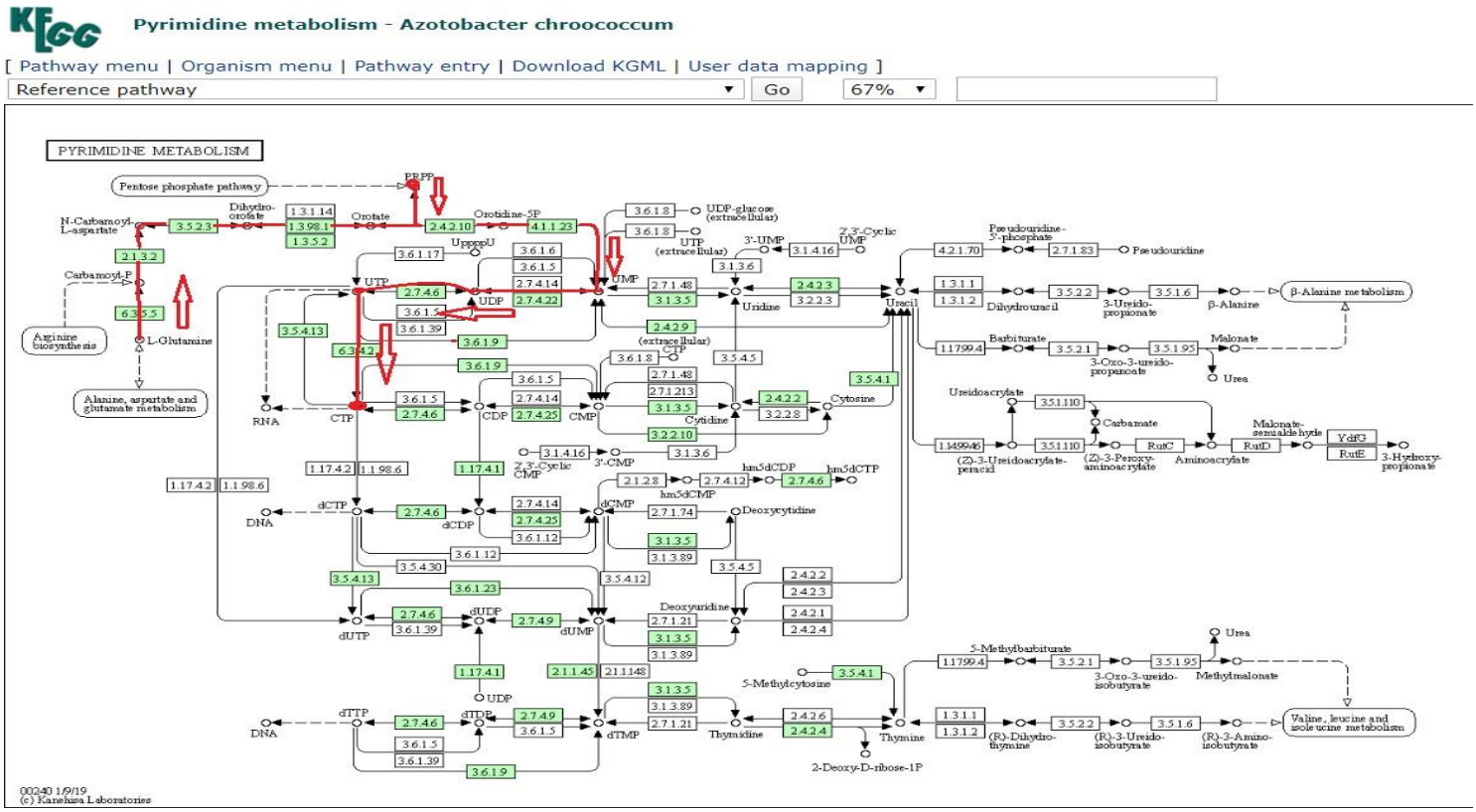
Синтез ліпополісахаридів та пептидоглікану:



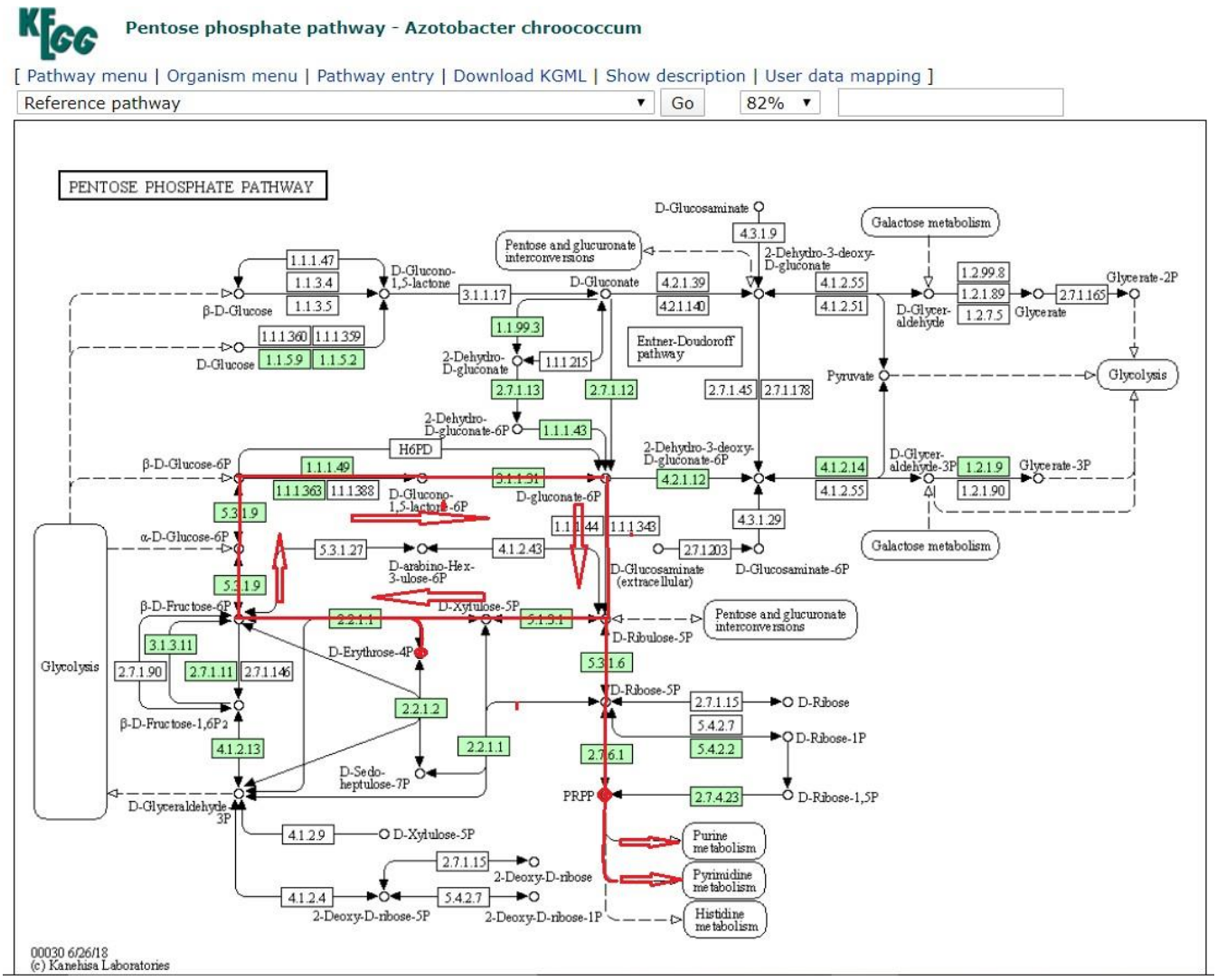
Синтез пуринів (ГТФ, АТФ):



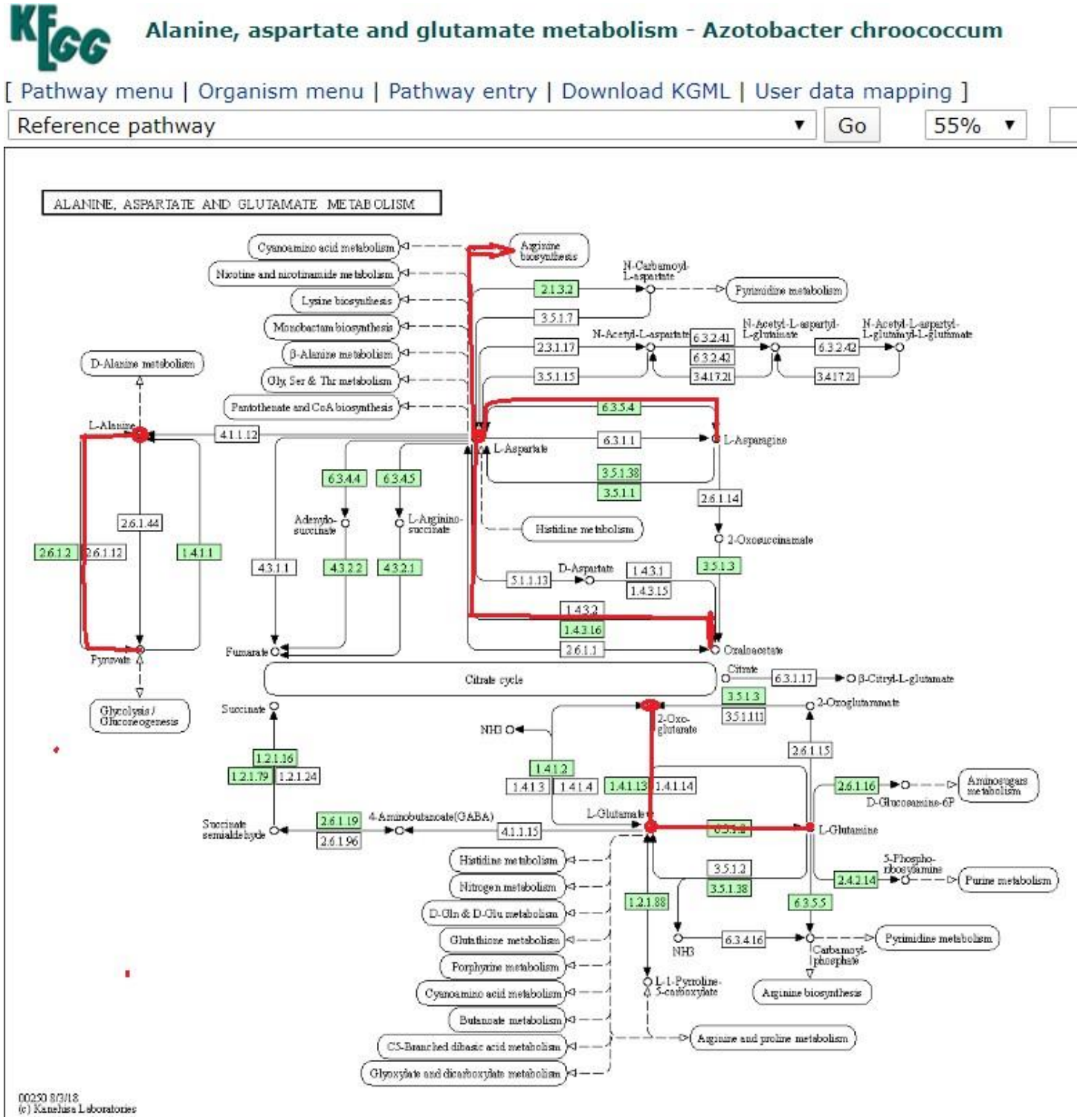
Синтез піримідинів (УТФ, ЦТФ):



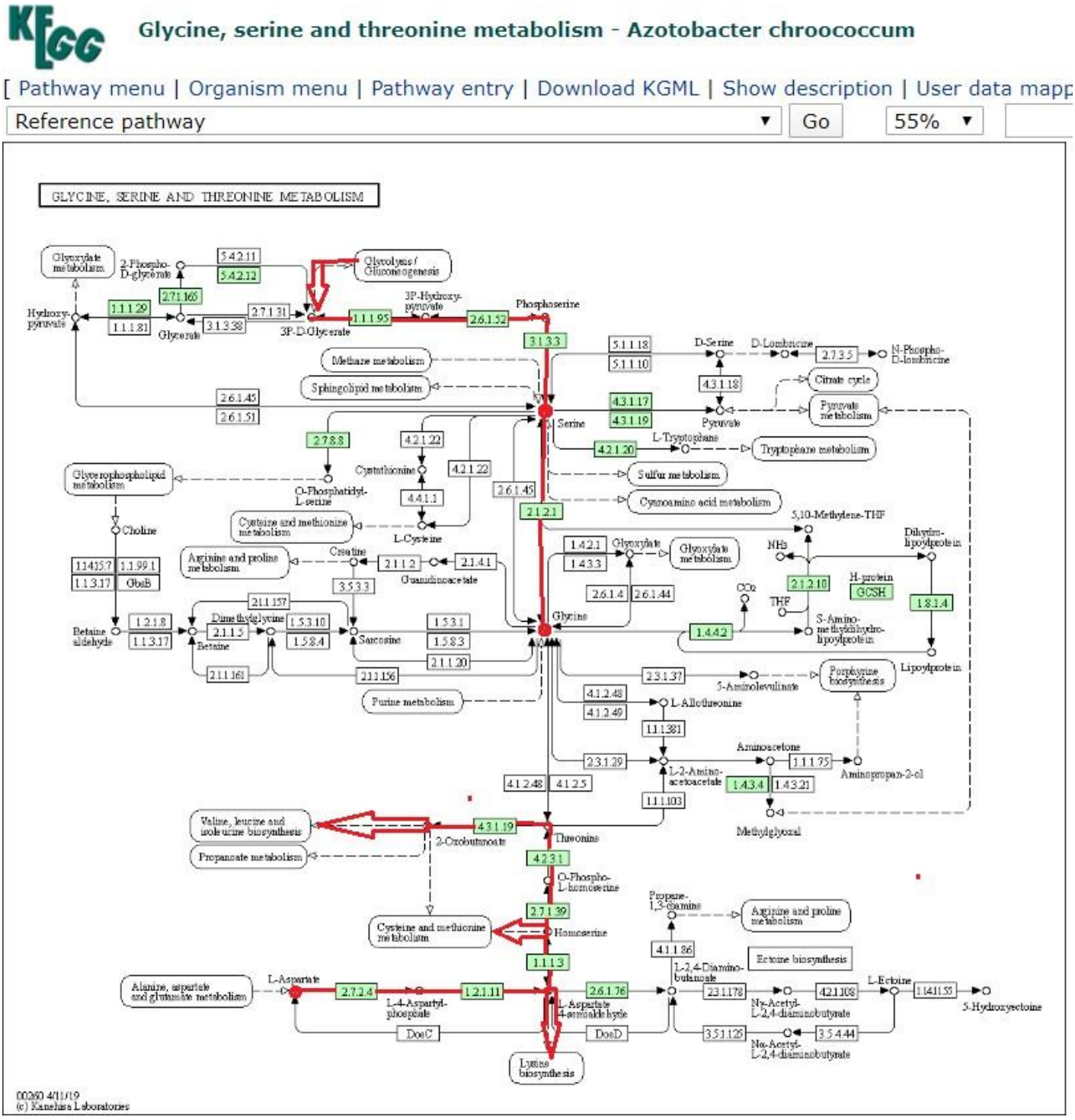
Пентозофосфатний шлях:



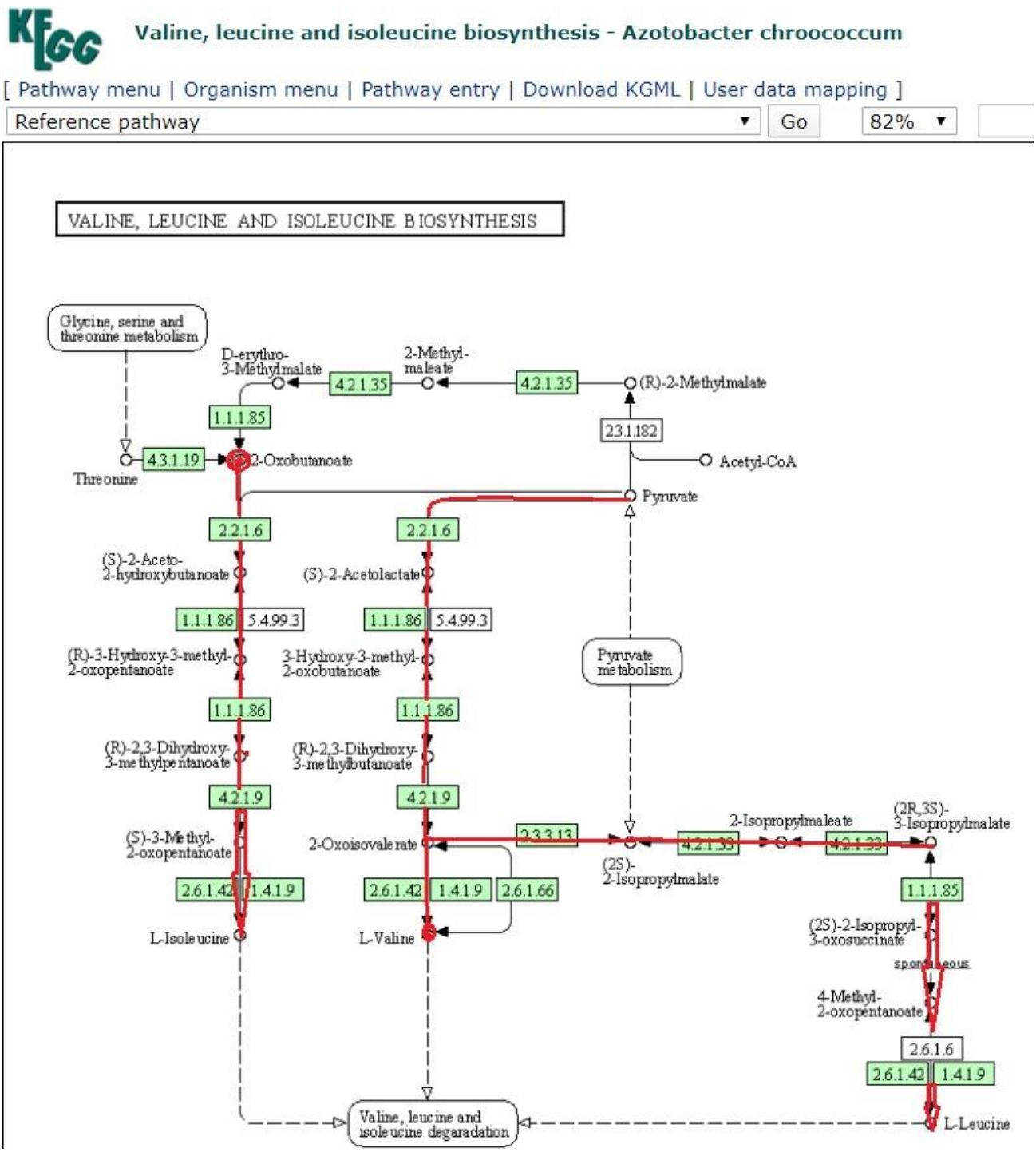
Синтез аланіну, аспартату, аспаргіну та глутамату з глутаміном:



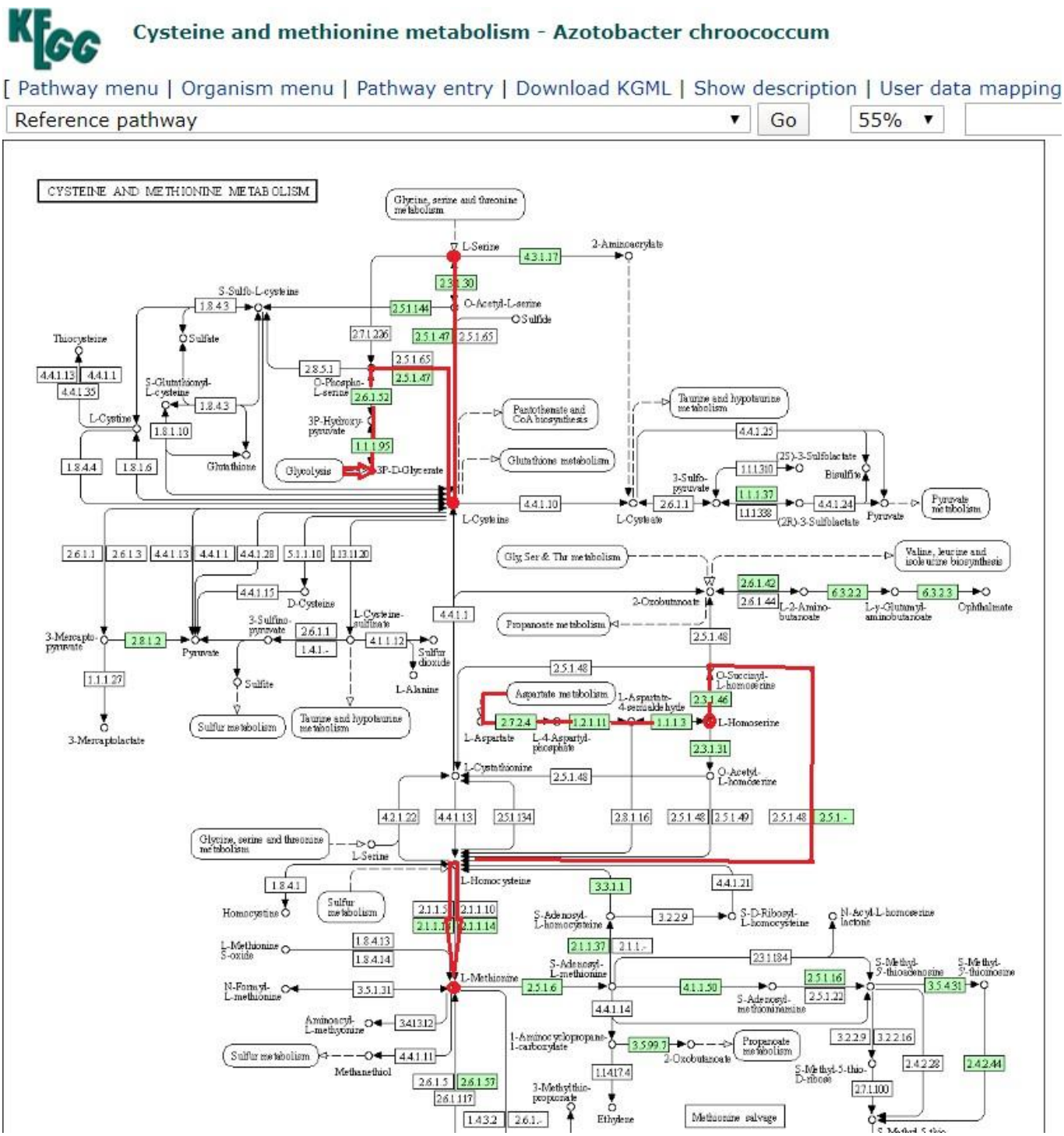
Синтез гліцину, серину та треоніну:



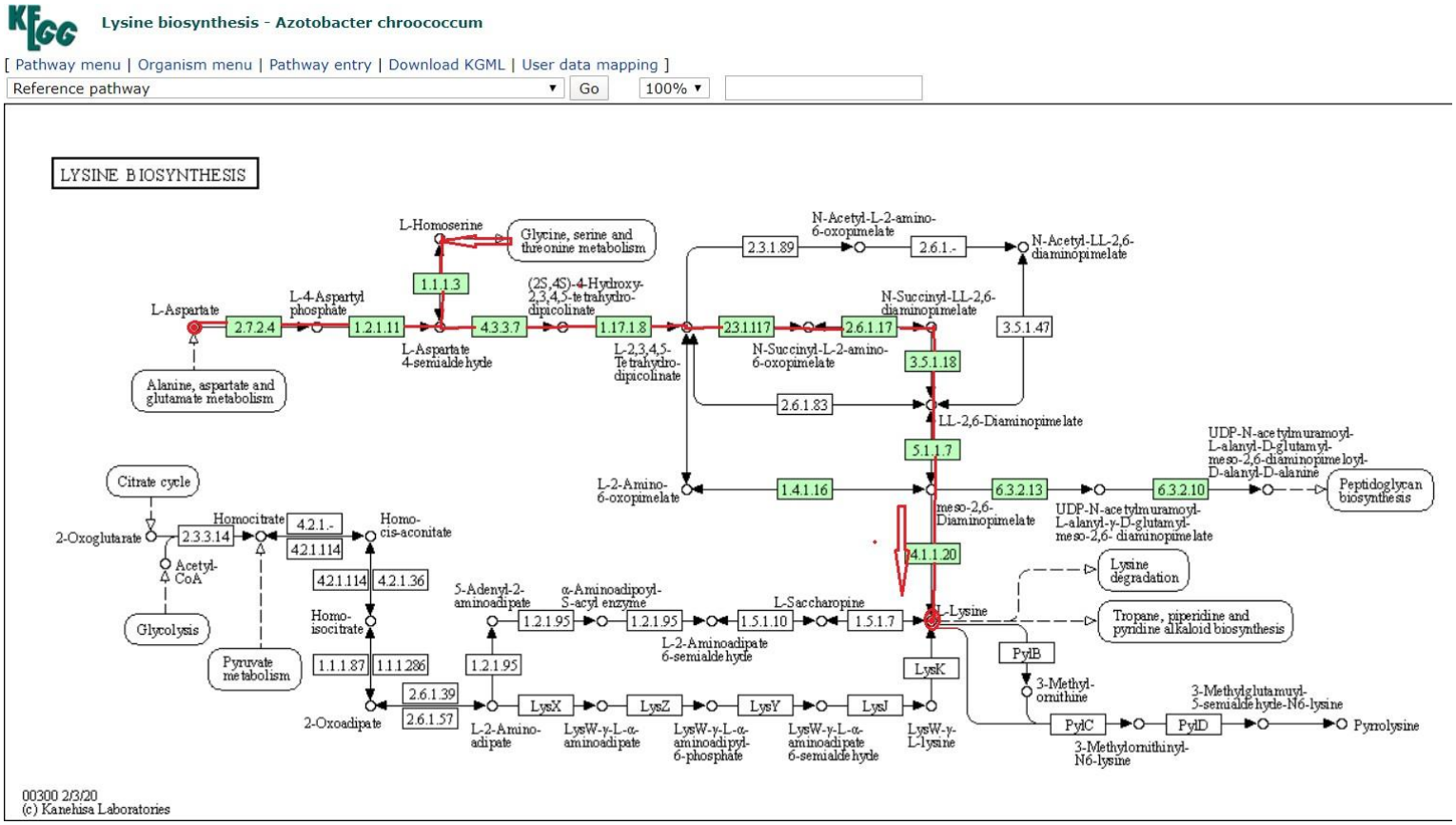
Синтез валіну, лейцинну та ізолейцину:



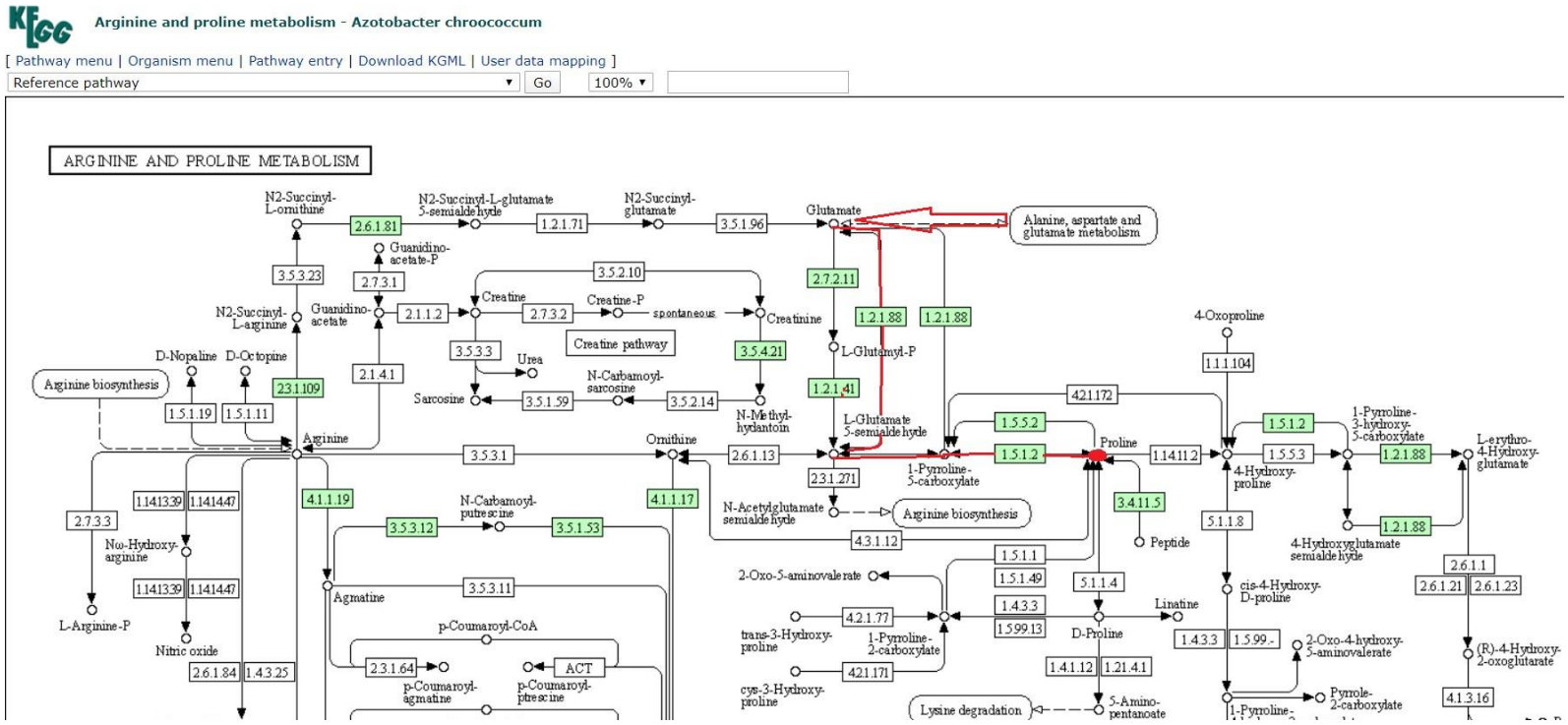
Синтез цистеїну та метионіну:



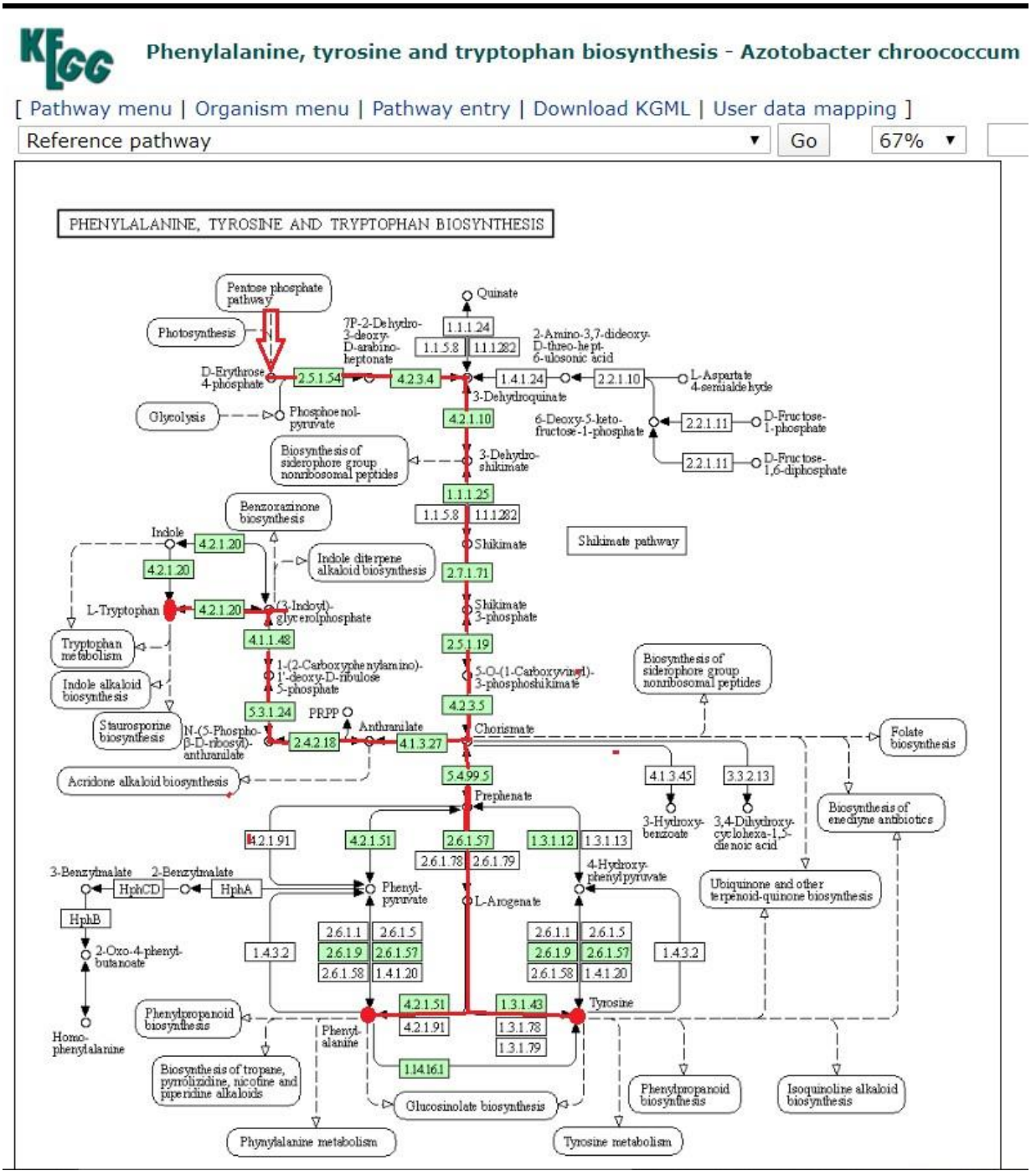
Синтез лізину:



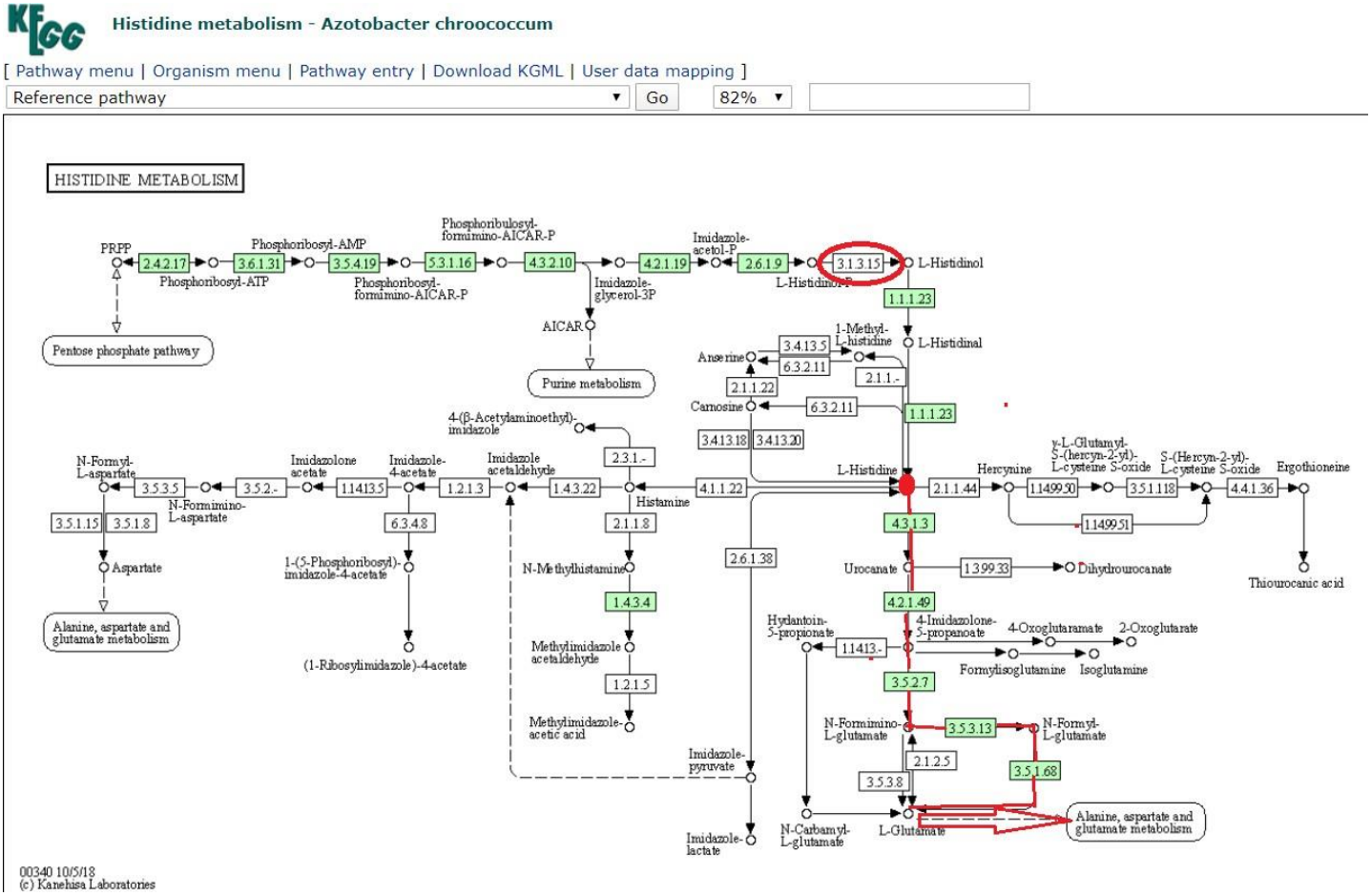
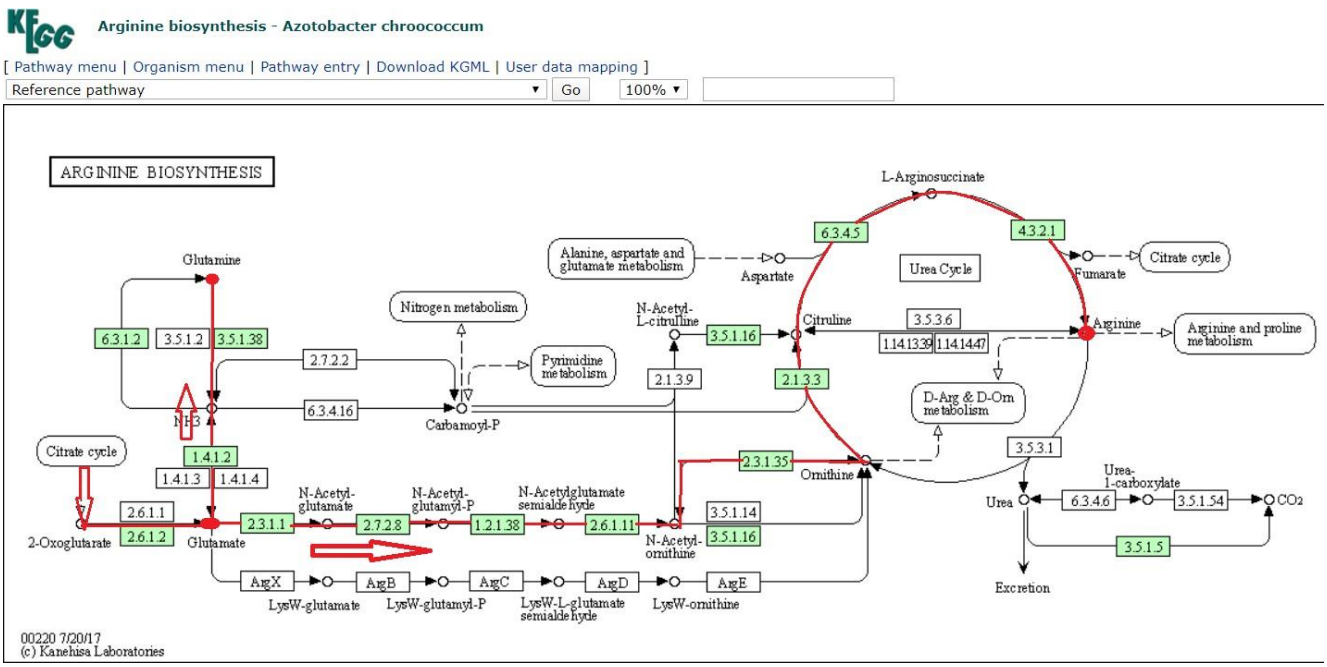
Синтез проліну:



Синтез фенілаланіну, тирозину та триптофану:



Синтез гістидину через глутамат, оскільки через 5-фосфо-рибозил-1-пірофосфат не має відповідно ферменту:



Синтез аргініну: