

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра Біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ___ » _____ 2022р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ___ » _____ 2022р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: «Культивування *Beauveria bassiana* для виробництва Боверину»

Виконав: здобувачки IV курсу, групи БТ-4-2

ЯРІЄВА Гюнай Амед кизи
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

_____ (підпис)

Керівник ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

_____ (підпис)

Консультанти

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Рецензент

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

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

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології
і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 04 ” квітня 20 22 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ЯРІСВОЇ Гюнай Амед кизи

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи: Культивування *Beauveria Bassiana* для виробництва Боверину

керівник роботи: ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович к.т.н., доц.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи штам *Beauveria bassiana* ВКПМ F-145; вихід біомаси –
18,2 г/л; росте та дешево середовище для культивування; час культивування – 96
год

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ;
Розділ 1. Характеристика цільового продукту; Розділ 2. Обґрунтування вибору та
характеристика біологічного агента; розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування;
Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми; Розділ 5. Специфікація
обладнання; Розділ 6. Опис технологічної схеми; Розділ 7. Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема 1 лист А-1, технологічна схема 1 лист А -1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

| № | Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи | Строк виконання етапів роботи | Примітка |
|---|--|-------------------------------|----------|
| 1 | Розділ 1. Характеристика цільового продукту | 04.04.2022 – 08.04.2022 | |
| 2 | Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента | 10.04.2022- 15.04.2022 | |
| 3 | Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування | 17.04.2022- 22.04.2022 | |
| 4 | Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми | 23.04.2022- 28.04.2022 | |
| 5 | Розділ 5. Специфікація обладнання | 30.04.2022- 06.05.2022 | |
| 6 | Розділ 6. Опис технологічної схеми | 08.05.2022- 13.05.2022 | |
| 7 | Розділ 7. Контроль виробництва | 15.05.2022- 19.05.2022 | |
| 8 | Виконання гафічної частини проекту | 13.05.2022- 20.05.2022 | |
| 9 | Оформлення пояснювальної записки | 23.05.2022- 01.06.2022 | |

Здобувач ЯРІСВА Гюнай
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи ВОРОНЦОВ Олександр
(підпис) (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технології отримання грибів *Beauveria Bassiana* для виробництва Боверину. Проведений аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури щодо технології отримання препарату на основі біомаси Боверину, який використовується в сільському господарстві у боротьбі проти мишеподібних гризунів.

Складено та зроблено опис технологічної схеми, яка включає всі стадії допоміжних робіт, підготовки посівного матеріалу та промислового культивування. Складено та розроблено апаратурно-технологічну схему виробництва препарату Боверину.

Кваліфікаційна робота викладена на 69 сторінки друкованого тексту, містить 13 таблиць, 7 рисунків і складається з вступу, семи розділів, та списку використаної літератури (джерела).

Ключові слова: Beauveria Bassiana, біомаса, біопестицид, культивування, виробничий біосинтез

ЗМІСТ

| | |
|---|----|
| ВСТУП | 7 |
| РОЗДІЛ 1 | 9 |
| ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ | 9 |
| РОЗДІЛ 2. Обґрунтування біологічного агента | 13 |
| 2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища . | 13 |
| 2.2. Морфолого-культуральні ознаки | 20 |
| 2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки | 21 |
| 2.4. Таксономічний статус біологічного агента | 22 |
| РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування | 23 |
| 3.1. Потреба у цільовому продукті | 23 |
| 3.2. Розрахунок річної потреби | 24 |
| 3.3 Розрахунок потужності виробництва для культивування, щоб отримати 76 487 л боверіну | 26 |
| 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу | 26 |
| 3.5. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу | 27 |
| 3.6. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу | 29 |
| РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми | 30 |
| 4.1 Обґрунтування до ферментаційних процесів та виробничого біосинтезу | 30 |
| 4.1.1 Обґрунтування умов і способу культивування <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> | 30 |
| 4.2 Вибір типу ферментера | 35 |
| 4.2.1 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря | 37 |
| 4.2.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів | 38 |
| 4.2.4. Обґрунтувати вибір миючого засобу для оброблювальних об'єктів | 43 |
| 4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища | 47 |
| 4.3.1. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.2. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 20 л .. | 49 |
| 4.3.3. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 200 л. | 49 |
| 4.3.4. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 2 м ³ | 50 |
| РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ | 51 |
| РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу цільового продукту | 52 |
| РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва | 62 |
| 7.1 Визначення біомаси | 62 |
| ВИСНОВКИ | 66 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ | 67 |

ВСТУП

Сучасне сільськогосподарське виробництво в різних країнах світу зіткнулося з необхідністю вирішення відразу двох найважливіших проблем - гарантованого захисту сільськогосподарських культур від шкідників і одночасно - захисту навколишнього середовища від техногенного забруднення. Безумовно, з цим тісно взаємопов'язані і завдання отримання якісно повноцінної екологічно безпечної їжі для людини і підвищення рівня конкурентоспроможності рослинницької продукції. З ростом врожайності сільськогосподарських культур пропорційно зростає і економічна значимість фітосанітарних заходів, досягаючи 40-50% в структурі витрат.

Ентомопатогенні мікроорганізми, такі як бактерії, гриби, віруси, нематоди та найпростіші, грають важливу роль для регулювання популяції комах-шкідників і це призводить до використання цих мікроорганізмів в якості біологічних контрольних агентів проти різних видів шкідників як альтернативу хімічним інсектицидам. Ентомопатогени, як агенти біоконтролю, мають кілька переваг у порівнянні зі звичайними інсектицидами.

До них відносяться:

- висока ефективність;
- безпека для корисних організмів;
- скорочення залишків у навколишньому середовищі;
- збільшення біорізноманіття в керованих людиною екосистемах.

За основу багатьох препаратів, що регулюють чисельність шкідливих комах, беруть ентомопатогенні гриби. Їх використання є виправданим, так як вони не вимагають великих витрат і зручні в застосуванні. Крім того, ентомопатогенні гриби добре ізолюються і можуть культивуватися на різних поживних середовищах, створених в лабораторних умовах.

Гриби як збудники захворювань комах відрізняються від інших ентомопатогенних мікроорганізмів тим, що вони здатні проникати в організм господаря через його зовнішні покриви. У природі деякі гриби зберігаються поза організмом господаря у вигляді стійких до зовнішніх умов форм, що призводить до виникнення вогнищ інфекції.

Одним з видів ентомопатогенних грибів є *Beauveria bassiana* - збудник білої мускардини, що вражає 60 видів комах і *B. tenella* (вражає 10 видів комах (жуків)).

Освоєно промислове виробництво грибного ентомопатогенні препарату боверин, що містить конідіоспори гриба *B. bassiana*. Крім спор гриб продукує активний токсин - боверіцин. Препарат нешкідливий для тварин, людини і рослин.

Боверин отримують глибинним культивуванням гриба *Beauveria bassiana* у періодичному режимі.

Актуальність. Кожен сезон городні культури піддаються негативному впливу шкідливих комах, що призводить до слабкого розвитку, втрати декоративного виду і навіть відсутності врожаю. Для вирішення даної проблеми використовуються спеціальні препарати – біопестициди, які підходять для профілактики та активної боротьби з шкідниками.

Сучасне сільське господарство потребує біологічно безпечних засобів захисту врожаю від шкідників. Витрати на такі засоби досягають 50% структурі собівартості продукції. Беручи до уваги сільськогосподарські потреби України і не насиченість ринку екологічно-безпечними біологічними засобами захисту рослин – організація виробництва є актуальною.

Новизна. В даній роботі пропонується як продуцент модифікований штам *Beauveria bassiana* ВКПМ F-145, що забезпечує біосинтез 18,2 г/л біомаси з найнижчою собівартістю цільового продукту.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Біологічний препарат для захисту рослин від шкідливих організмів (біопестицидов) - це біологічний засіб контролю чисельності шкідників, збудників хвороб рослин і бур'янів, активним інгредієнтом якого є агенти біологічної природи (мікроорганізми, їх метаболіти, нематоди і т.д.)

Переваги біологічних засобів боротьби полягають в наступному:

- висока ефективність при правильному застосування;
- вибірковість дії щодо широкого спектра шкідливих комах і фітопатогенів;
- більш висока екологічність;
- мікробіологічні засоби захисту рослин можуть з легкістю вирішити проблему стійкості більшості популяцій комах і фітопатогенів до пестицидів;
- можуть застосовуватися як з хімічними, так і з біологічними пестицидами;
- шкідники можуть знищуватися на початкових фазах розвитку;
- не шкідливі для людей;
- вирощувана продукція виходить екологічно чистою.

Але у біопестицидов є і ряд недоліків:

- найчастіше їх дія залежить від кліматичних умов;
- для досягнення більшої ефективності, відповідно, потрібні великі концентрації речовини;
- як правило не вимагають для свого виробництва великих фінансових вкладень.

Особливою ефективністю в боротьбі з комахами володіють біопестициди на основі ентомопатогенних грибів, особливо у гриба роду Боверия, завдяки його

| | | | | | | | | |
|------------------|-------------|-----------------------|---------------|-------------|--------------------------------|--------------------|---------------|-----------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.16КР ПЗ</i> | | | |
| <i>Зм</i> | <i>Арк.</i> | <i>№</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | | | | |
| <i>Розробник</i> | | <i>Ярієва Г.А.</i> | | | <i>Розділ 1</i> | <i>Літера</i> | <i>Аркулш</i> | <i>Аркулшів</i> |
| <i>Керівник</i> | | <i>Варанцов О.О.</i> | | | | | <i>2</i> | <i>57 9</i> |
| <i>Н. контр</i> | | | | | | <i>Кафедра БТМ</i> | | |
| <i>Консульт</i> | | | | | | | | |
| <i>Зав. каф.</i> | | <i>Стадніков В.П.</i> | | | | | | |

виділяє токсину боверіцину можна легко контролювати чисельність комах-шкідників без загрози для навколишнього середовища.

Боверин — мікробіологічний препарат інсектицидної дії, призначений для біологічного контролю шкідників сільськогосподарських, плодово-ягідних і овочевих культур відкритого та закритого ґрунту.[3] Пригнічує чисельність шкідочинних комах: попелиці, білокрилки, п'явиці, коники, трипси, терміти, вогняні мурашки, чорні мурахи, грибні комарик, плодові мушки, москїти, колорадський жук, мексиканський жук, японський жук, довгоносики, листовїйки, короїди, чорний виноградний жук, полуничний кореневої довгоносик, гусениці молей, європейський кукурудзяний метелик, кліщі плодови. Дїюча речовина: спори ентомопатогенних гриба – гіфомїцета *Beauveria bassiana* роду *Beauveria*, титр не менше 2×10^8 КУО / мл. [4]

Боверія Бассіана (*Beauveria bassiana*) представник роду недосконалих грибів сімейства *Clavicipitaceae*, розмножується конідіоспорами і широко використовується в якості ентомопатогена. Збудник хвороби біла мускардина, яка паразитує на різноманітних шкідників, що вражають різні товарні культури. [5] Вид названий на честь італійського ентомолога Агостіно Бассі (Agostino Bassi), який відкрив його в 1835 році як причину захворювання шовковичного шовкопряда.

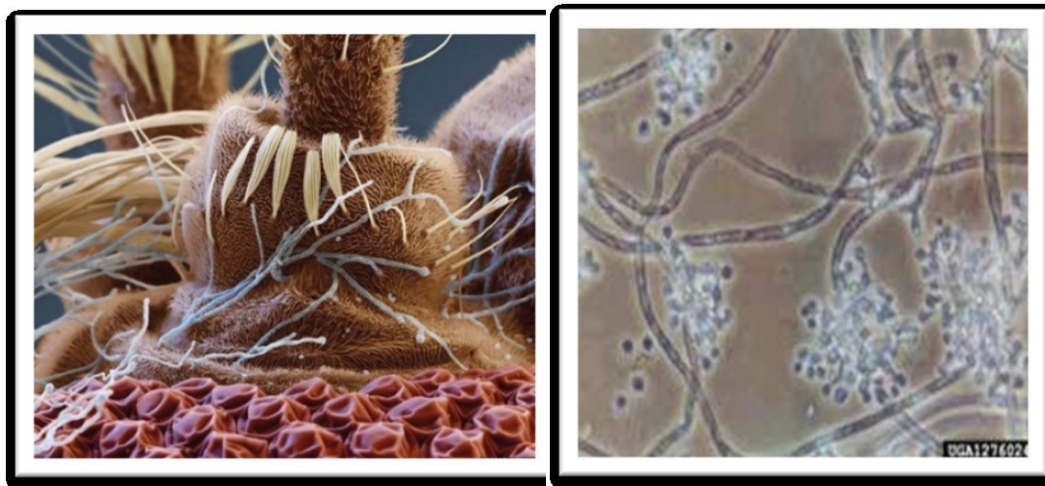


Рис. 1.1. Гриб *Beauveria bassiana*

Оптимальна температура для розвитку ентомопатогенного гриба +16...+28°C, при відносній вологості повітря: 80-85%. Форма препарата може бути рідкою та у вигляді білого або сіруватого порошка. Зберігати при t ° від +4 °C до +10°C в сухому, захищеному від прямих сонячних променів місці. [6,7]

У ґрунт гриб *Beauveria bassiana* заселяють у вологий сезон, навесні або осінню, роблячи 2-4 обробки грядок і пристволових кругів дерев. Через декілька років такі обробки будуть не потрібні: гриб розростається сам при створенні йому належних умов.

Beauveria bassiana вбиває членистоногих в результаті контакту комахи з конідіями (грибковими спорами). Механізм дії: конідіоспори гриба, потрапивши на тіло комахи, проростають і проникають в порожнину тіла, розчиняючи ферментами кутикулу, при цьому виділяють токсини, викликаючи загибель шкідників. Грибниця пронизує все тіло комахи, утворюючи на його поверхні шар конідієносців з конідіями. Господар гине, а конідії переносяться на інших шкідників. Контакт проводиться декількома способами. Найбільш поширеними і ефективними є нанесення аерозолів безпосередньо на шкідника або коли шкідник пройдеться по обробленій поверхні.[8]

Комахи гинуть протягом 4-10 днів після зараження. Час знищення буде залежати від виду комах, віку і дози конідій. Мертве комаха буде служити джерелом суперечок для вторинного поширення гриба. Інфікований дорослий самець шкідника також буде передавати гриб під час спарювання.[5]

Результати застосування препарата Боверина проілюстровані нижче.



а)

б)

Рис.1.2. а) колорадський жук, б)"зацукровані" шкідники

Переваги:

- безпечний для людей, тварин, птахів, риби, бджіл;
- не забруднює навколишнє середовище;
- не має регламентів застосування;
- не впливає на смак вирощуваної продукції;
- позитивно впливає на якісні показники продукції. [9]

Виробником боверіну (розчин в пластмасових каністрах 20 л, 5 л) є фірма «Nzim Agro» (Україна), «Біотехніка»(Україна). [4,10]

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування біологічного агента

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища

Однією з основних проблем сільського господарства є знищення врожаю комахами. Личинки і дорослі особини комах висмоктують сік із черешків, листя і стебел рослин в результаті чого рослини гинуть. Для захисту врожаю на першому місці знаходяться біологічні методи. Так як вони не тільки з легкістю здатні врегулювати чисельність шкідників, але і не погіршують екологію оброблюваної місцевості, завдяки цьому вони нічим не поступаються різним хімічним речовинам.

Біопестициди – речовини декількох типів препаратів, застосовуються для біологічної боротьби з комахами, їх дія заснована на використанні таких мікроорганізмів, як бактерії, недосконалі гриби і віруси. Ще для створення препаратів можуть використовуватися продукти життєдіяльності цих організмів. Біологічні засоби захисту класифікуються на наступні типи речовин: фунгіциди, гербіциди та інсектициди. З трьох мова піде про інсектицидах. Інсектицидні препарати виробляються в основному на основі ентомопатогенних грибів, але також можуть включати до складу нематод або віруси. [12]

Боверин – біологічний препарат на основі гриба *Beauveria bassiana* для захисту рослин від шкідників. Препарат застосовують для захисту картоплі, овочевих, декоративних, плодово-ягідних культур як в закритому, так і у відкритому ґрунті. Ефективний проти білокрилки, трипсів, плодожерок, клопів, личинок колорадського жука, кліщів. Використовується на сільськогосподарських культурах, в теплицях, на присадибних ділянках в період вегетації від сходів рослин (при появі шкідника) до цвітіння і збору врожаю. [13]

| | | | | | | | | |
|------------------|-----------------------|----------|---------------|-------------|--------------------------------|--------------------|--------------|----------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.16КР ПЗ</i> | | | |
| <i>Зм</i> | <i>Арк.</i> | <i>№</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | <i>Розділ 2</i> | <i>Літера</i> | <i>Аркцш</i> | <i>Аркцшів</i> |
| <i>Разробник</i> | <i>Ярієва Г.А.</i> | | | | | | 2 | 57 |
| <i>Керівник</i> | <i>Варанцов О.О.</i> | | | | | | | 13 |
| <i>Н. контр</i> | | | | | | <i>Кафедра БТМ</i> | | |
| <i>Консульт</i> | | | | | | | | |
| <i>Зав. каф.</i> | <i>Стадніков В.П.</i> | | | | | | | |



Рис. 2.1 Препарат Боверин

Вертициллин-М – Екологічно безпечний, природний, біологічний препарат на основі ентомопатогенних гриба *Lecanicillium muscarium* (*Verticillium lecani*) для захисту овочевих, декоративних культур в закритому ґрунті від попелиць, білокрилок, трипсів і кліщів. Препаративна форма: культуральна рідина, що містить спори і міцелій ентомопатогенні гриба *Lecanicillium muscarium*. Рекомендується для захисту сільськогосподарських і квітково-декоративних культур закритого ґрунту від тепличної білокрилки і різних видів попелиць. Ентомопатогенні гриб *Lecanicillium muscarium* проростає в порожнину тіла комах і, виділяючи токсини, викликає загибель шкідників. [14]



Рис. 2.2 Препарат Вертициллин

Метаризин – біопрепарат, рекомендований для захисту рослин від шкідників (личинки колорадського і травневого жуків, капустянки, дротяники), а також в якості добрива та стимулятора росту.



Рис. 2.3 Препарат Метаризин

Препарат містить ентомопатогенні гриби *Metarhizium anisopliae*, що діють протягом декількох років після внесення. Перед посадкою картоплі виробляють його обробку обприскуванням або замочуванням. Під час висадки розсади її кореневу систему занурюють в розчин препарату або поливають. У вегетативний період метаризин ефективний проти трипсів, личинок довгоносиків молодого віку, а також личинок комарів. [15]

Ефективність ентомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* над іншими полягає в наступному:

1. Після поразки комахи спорами ентомопатогенного гриба, починає розвиватися мікоз. Далі для досягнення адгезії конідій, відбуваються взаємодії гідрофобних і ліпідних компонентів кутикули з клітинною оболонкою. Нерівності поверхні кутикули комахи також сприяють процесу зараження комахи (Ташкінова 2017).

2. Результатом вище вказаних взаємодій стає те, що восковий шар кутикули зникає. Внаслідок цього гриб продовжує розвиватися і виникають в кутикулі порожнини. Після чого, в порожнині комахи проникають гіфи ентомопатогенного гриба. Вони досягають протокутикули та утворюють в ній так

звані дископодібні структури. Ці структури розташовуються паралельно ламелі кутикули. При цьому візуальних порушень кутикули не спостерігається. Потім відбувається ураження внутрішніх систем і органів. Спочатку гриб надає згубний вплив на жирове тіло, потім травну систему, мальпігієві судини, гиподерму, нервову систему. Завершується все ураженням м'язової системи комахи і настає швидка його загибель (Шубак, Кучерявий, 2004).

3. В процесі розвитку даного ентомопатогенні гриба в тіло комахи виділяється токсин - боверіцин. Завдяки цьому токсину вірулентність цього гриба вище, ніж у інших. Він більшою мірою сприяє ослабленню комах (Ташкинова, 2017).

Порівняльна характеристика грибів

| Біологічний агент | Склад поживного середовища | | Тривалість культивування, год | Концентрація біомаси Розрахунок вмісту г/л | Особливості процесу біосинтезу | Використана література |
|--|--|---|-------------------------------|---|---|---|
| | компонент | концентрація, г/л | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| <i>Beauveria bassiana</i> САСВ | глюкоза пептон NaCl KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ · 5H ₂ O | 20 2 1 0,1 0,05 | 89 | 13,47 | Культивування проводять при t °= 23-25° С, n = 180 об/хв; | В.Ю,Секова.,Н.А,Корнилова.,А.В,Васильева / Глубинное культивирование энтомопатогенно гриба <i>Beauveria bassiana</i> /Успехи в химии и в химической технологии / Том XXIV IV, 2010 №11 (116) / УДК 579.64 |
| <i>Beauveria bassiana</i> ВКПМ F-145 | молочна сироватка пивна дробина дизель паливо NaCl MgSO ₄ KNO ₃ KH ₂ PO ₄ CaCO ₃ | 35 35 0,1 0,05 0,05 0,1 0,1 0,05 | 96 | 18,2 | Культивування проводять при t °= 22° С; рН=6,0-7,0; аерація при 200-220 об/хв | ШАРАПОВА И.Э./ Биопестицидная композиция на основе Адрес для переписки: 167982, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 24, Коми НЦ УрО РАН, патентнолицензионный отдел лигноуглеводных субстратов и энтомопатогенного гриба // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем: Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 1-2 декабря 2015. Киров, 2015. Книга 1, с. 162-164. RU 2421995 С1, 27.06.2011. RU (см. прод.) |
| <i>Lecanicillium muscarium</i> Г-033ВИЗР | глюкоза пептон KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ | 20 10 2 1 | 72 | 66,25 | Культивування проводять при t °= 28°С, рН середовища 5-7,5 | Mitina G. V.,Borisov B. A. ,Pervushin A. L.,Hoglokoва A. A.,Pavlyushin V. A. <i>Lecanicillium muscarium</i> / Fungus strain having insecto-acaricidal and antibiotic activity for fighting against sucking pests, Fungal and bacterial diseases / 2015135955/10, 25.08.2015 |
| <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch) Sorokin ВКМ F-3873 | глюкоза KNO ₃ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O NaCl | 30 2 1 0,5 0,5 | 24 | 6,75 | Культивування проводять при t °= 34 °С, n = 180 об/хв; | А.В. Васильева, Н.С. Марквичёв//Физиология развития гриба <i>Metarhizium anisopliae</i> при культивированиина среде Чапека-Доска/ Том XXV, 2011 №10 (126) / УДК 579.24 |

Вартість поживних середовищ для культивування штамів

| Продуцент | Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Ціна компонента, грн/кг | Вартість компонента (грн) на 1 л середовища | Джерело інформації |
|--|---------------------------------------|-------------------|-------------------------|---|--------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| <i>Beauveria bassiana</i> САСВ | глюкоза | 20 | 27,75 | 0,55 | 1 |
| | пептон | 2 | 1060 | 2,12 | 1 |
| | NaCl | 1 | 5 | 0,005 | 1 |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,1 | 50 | 0,005 | 1 |
| | MgSO ₄ · 5H ₂ O | 0,05 | 9 | 0,00045 | 1 |
| Вартість 1 л середовища – 2,68 грн | | | | | |
| <i>Beauveria bassiana</i> ВКПМ F-145 | молочна сироватка | 35 | 11,10 | 0,3885 | 1 |
| | пивна дробина | 35 | 1 | 0,035 | 1 |
| | дизель паливо | 0,1 | 24 | 0,0024 | 1 |
| | NaCl | 0,05 | 5 | 0,00025 | 1 |
| | MgSO ₄ | 0,05 | 9 | 0,00045 | 1 |
| | KNO ₃ | 0,1 | 68 | 0,068 | 1 |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,1 | 50 | 0,005 | 1 |
| | CaCO ₃ | 0,05 | 12,90 | 0,000645 | 1 |
| Вартість 1 л середовища – 0,50 грн | | | | | |
| <i>Lecanicillium muscarium</i> Г-033ВІЗР | глюкоза | 20 | 27,75 | 0,55 | 1 |
| | пептон | 10 | 1060 | 10,6 | 1 |
| | KH ₂ PO ₄ | 2 | 50 | 0,1 | 1 |
| | MgSO ₄ | 1 | 9 | 0,009 | 1 |
| Вартість 1 л середовища – 11,25 грн | | | | | |
| <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch) Sorokin ВКМ F-3873 | глюкоза | 30 | 27,75 | 0,8325 | 1 |
| | KNO ₃ | 2 | 68 | 0,136 | 1 |
| | KH ₂ PO ₄ | 1 | 50 | 0,05 | 1 |
| | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0,5 | 9 | 0,0045 | 1 |
| | NaCl | 0,5 | 5 | 0,0025 | 1 |
| Вартість 1 л середовища – 1,02 грн | | | | | |

Примітка. * - Ціни наведено станом на січень 2021 р. 1 – <http://prom.ua>

Аналізуючи табл. 2.2 можна прийти до таких висновків, що вартість поживного середовища гриба *Beauveria bassiana* ВКПМ F-145 є дешевшим в порівнянні з іншими.

Умовна вартість 1 г цільового продукту

| Біологічний агент | Концентрація біомаси, г/л | Тривалість культивування, г/год | Концентрація біомаси за годину, г/год | Вартість 1 л середовища, грн/л | Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г |
|---|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| <i>Beauveria bassiana</i> САСВ | 13,47 | 89 | 0,152 | 2,68 | 0,199 |
| <i>Beauveria bassiana</i> ВКПМ F-145 | 18,2 | 96 | 0,190 | 0,5 | 0,027 |
| <i>Lecanicillium muscarium</i> Г-033ВИЗР | 66,25 | 72 | 0,920 | 11,25 | 0,169 |
| <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch) Sorokin ВКМ F-3873 | 6,75 | 24 | 0,282 | 1,02 | 0,151 |

Дані, наведені у табл. 2.3, засвідчують, що умовна вартість біомаси, синтезованих штамом *Beauveria bassiana* ВКПМ F-145, є найнижчою (0,027 грн).

2.2 Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Beauveria bassiana ВКПМ F-145. Біомаса – 18,2 г/л.

Джерелом Карбону виступає лактоза.

Вміст Карбону у 18,2 г/л біомаси: $18,2 \times 0,5 = 9,1$

Концентрація молочної сироватки – 35 г

М(лактоза) – 342 г/моль

М(C) – 144

$342 \text{ г/л (лактоза)} - 144 \text{ (C)}$

$9,1 - x \text{ (C)}$

$9,1 \times 144 / 342 = 3,83 \text{ г/л}$

В 35 г молочної сироватки міститься лише 17,5 лактози

$342 \text{ г/моль (лактоза)} - 144 \text{ (C)}$

$17,5 - x \text{ (C)}$

$$17,5 \times 144/342 = 7,3 \text{ г}$$

Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 18,2 г/л біомаси у середовище необхідно внести:

$$(7,3 \times 0,4) + 7,3 = 10,22 \text{ г (C)}$$

Необхідна кількість молочної сироватки:

$$7,3 + 9,1 + 3,83 = 20,23 \text{ г}$$

Отже, концентрації молочної сироватки 35 г/л достатньо для отримання 18,2 г/л біомаси.

Вміст Нітрогену. Біомаса – 18.2 г/л. Пивна дробина – 35 г/л

У біомасі міститься приблизно 10% Нітрогену. Таким чином у 18,2 г/л вміст азоту (за елементом N) становить 1,82 г.

$$100 - 33 \text{ г}$$

$$1,82 - X \text{ г}$$

$$33 \times 1,82 / 100 = 0,6 \text{ г}$$

2.2. Морфолого-культуральні ознаки

Beauveria bassiana відноситься до недосконалих грибів. При вирощуванні штаму (*Beauveria bassiana* Vuill) на щільному агаризованому середовищі Сабуро протягом 15 днів при 26-28 °С гриб утворює круглі колонії, притиснуті до субстрату з валиком по периферії. Не має вторинного росту. Конідіальний шар крейдяної консистенції, пігментація конідіального шару кремового кольору, нижня частина – жовтувато-руда. Розмір колоній від $86 \pm 0,37$ до $90 \pm 0,2$ мм. інтенсивність споруляції 1155-1038 $\frac{\text{млн.спор}}{\text{мл}}$ середовища. Повітряний міцелій розгалужений, септований, білий. Гіфи міцелію в діаметрі 3,5-5,0 мкм. Конідієносці формуються поодинокі, попарно або мутовками, конідії утворюються на стерігмах. Розмір конідій 2,8-3,5 мкм, одноклітинні, одноядерні.

У гемолімфі уражених комах гриб утворює специфічні гіфальні тіла, бластоспори, які розмножуються поділом. Проростають конідії через 12 год (на агаризованому середовищі при 24-26 °С) 1-2 паростковими трубками. Початок конідії-освіти через 24 ч. На сусло-агарі утворює ідентичний тип колоній. [11]

Під мікроскопом гриб виглядає наступним чином: гіфи тонкі, септіровані, 1.5 - 2.0 мкм в діаметрі, безбарвні. Конідіеносці розташовані побільше частини мутовчато, розширені біля основи і закінчуються до вершини спороносящих зигзагоподібною тонкою витягнутою частиною (Литвинов, 1967).

Спори на тонких стерігах, кулясті, 2.4 мкм в діаметрі (рис.1.3).



Рис.2.4. Beauveria bassiana под мікроскопом. Спори на стерігах [13]



Рис.2.5. Гриби роду Боверия (Beauveria) вплив на комах [13]

2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки

Ставлення до джерела вуглецю: засвоює сахарозу, глюкозу, лактозу, мальтозу, фруктозу, рамнозу. Не засвоює целюлозу. Крохмаль гідролізує. Засвоює оцтову, щавлеву кислоти. Не засвоює бурштинову кислоту. Засвоює дульцит, сорбіт, гліцерин. Не засвоює н-бутанол, ізобутанол.

Як джерело азоту використовує казеїн, пептони, амонійний азот, нітрати. Амінокислоти стимулюють масове збільшення конідій.

Протеолітична активність 3,42 °д/г, ліпазна активність 1960,6 °д/г

По відношенню до кисню - гриб аероб.

Гриб утворює антибіотики - боверіцин, бассіанолід.

Температурний діапазон зростання культури гриба від 10 до 30°C. Оптимальна для даного штаму температура 26-28°C, рН 4,8-6, оптимальна рН 5,4-5,5.

Фаги не встановлені. Зберігає стабільність до 8 генерацій. Зберігається в пробірках на скошеному сусло-агарі при 4 °С протягом 2 років. Препарат боверин на основі гриба *B. bassiana* не токсичний для теплокровних і людини. ГДК в повітрі робочої зони 0,3 мг/м³, клас небезпеки 2. [11]

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Beauveria bassiana* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [14]:

Домен: *Eukaryota*

Царство: *Fungi*

Відділ: *Ascomycota*

Клас: *Sordariomycetes*

Порядок: *Hypocreales*

Родина: *Cordycipitaceae*

Рід: *Beauveria*

Вид: *B. Bassiana*

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба у цільовому продукті

Кожен сезон городні культури піддаються негативному впливу шкідливих комах, що призводить до слабкого розвитку, втрати декоративного виду і навіть відсутності врожаю. Для вирішення даної проблеми використовуються спеціальні препарати – біопестициди, які підходять для профілактики та активної боротьби з шкідниками.[1]

Біологічний препарат для захисту рослин від шкідливих організмів (біопестицидів) - це біологічний засіб контролю чисельності шкідників, збудників хвороб рослин і бур'янів, активним інгредієнтом якого є агенти біологічної природи (мікроорганізми, їх метаболіти, нематоди і т.д.)

Переваги біологічних засобів боротьби полягають в наступному:

- висока ефективність при правильному застосування;
- вибірковість дії щодо широкого спектра шкідливих комах і фітопатогенів;
- більш висока екологічність;
- мікробіологічні засоби захисту рослин можуть з легкістю вирішити проблему стійкості більшості популяцій комах і фітопатогенів до пестицидів;
- можуть застосовуються як з хімічними, так і з біологічними пестицидами;
- шкідники можуть знищуватися на початкових фазах розвитку;
- не шкідливі для людей;
- вирощувана продукція виходить екологічно чистою.

Але у біопестицидів є і ряд недоліків:

- найчастіше їх дія залежить від кліматичних умов;

| | | | | | | | | |
|------------------|-----------------------|----------|---------------|-------------|--------------------------------|--------------------|--------------|---------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.16КР ПЗ</i> | | | |
| <i>Зм</i> | <i>Арк.</i> | <i>№</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | <i>Розділ 3</i> | <i>Літера</i> | <i>Аркцш</i> | <i>Аркцшв</i> |
| <i>Розробник</i> | <i>Ярієва Г.А.</i> | | | | | | <i>2</i> | <i>57</i> |
| <i>Керівник</i> | <i>Воранцов О.О.</i> | | | | | | | <i>23</i> |
| <i>Н. контр</i> | | | | | | <i>Кафедра БТМ</i> | | |
| <i>Консульт</i> | | | | | | | | |
| <i>Зав. каф.</i> | <i>Стадніков В.П.</i> | | | | | | | |

- для досягнення більшої ефективності, відповідно, потрібні великі концентрації речовини;
- як правило не вимагають для свого виробництва великих фінансових вкладень.

Особливою ефективністю в боротьбі з комахами володіють біопестициди на основі ентомопатогенних грибів, особливо у гриба роду *Боверія*, завдяки його виділяє токсину боверіцину можна легко контролювати чисельність комах-шкідників без загрози для навколишнього середовища.

Боверін — мікробіологічний препарат інсектицидної дії, призначений для біологічного контролю шкідників сільськогосподарських, плодово-ягідних і овочевих культур відкритого та закритого ґрунту. [3] Пригнічує чисельність шкочинних комах: попелиці, білокрилки, п'явиці, коники, трипси, терміти, вогняні мурашки, чорні мурахи, грибні комарики, плодови мушки, москїти, колорадський жук, мексиканський жук, японський жук, довгоносики, листовїйки, короїди, чорний виноградний жук, полуничний кореневої довгоносик, гусениці молей, європейський кукурудзяний метелик, кліщі плодови.

Діюча речовина: спори ентомопатогенних гриба – гіфоміцета *Beauveria bassiana* роду *Beauveria*, титр не менше з титром не менше $2 \cdot 10^9$ КУО в 1 мл препарату.

Біологічна ефективність – 70 % - 95 %.

Умови зберігання:

- препарат зберігати за t° від $+2^\circ\text{C}$ до $+6^\circ\text{C}$ - 3 місяці;
- за t° від $+6^\circ\text{C}$ до $+15^\circ\text{C}$ - 1 місяць[2]

3.2. Розрахунок річної потреби

Розрахуємо кількість біопестицидного препарату, яку необхідно виробити в рік, щоб забезпечити потреби населення.

Спосіб застосування

Використовується на сільськогосподарських культурах на присадибних ділянках у період вегетації від сходів рослин (при появі шкідника) до цвітіння і збору врожаю. На більшій частині території України вегетаційний період

починається в кінці березня, а закінчується в кінці жовтня. Перед застосуванням препарат розводять водою у співвідношенні 1:100 (робочий розчин). Зберігання робочого розчину більше 6 годин не допускається.

Норма використання в залежності від чисельності шкідників складає від 5 л на гектар. Кількість обробок на рік 52.

Таблиця 3.1

Вихідні дані для розрахунку робочої потреби у препараті

| Сільсько-господарська культура | Площі посівів, тис.га | Кількість розчину препарату для однієї обробки 1 га поля, л/га | Кількість обробок на рік,шт. | Сумарна кількість препарату для 1 га поля, л/га | Необхідний л препарату для річної обробки поля, м ³ /рік |
|--------------------------------|-----------------------|--|------------------------------|---|---|
| Капуста | 69,2 | 5 | 52 | 260 | 17 992 |
| Помідори | 70,8 | 5 | 52 | 260 | 18 408 |
| Баклажани | 5,2 | 5 | 52 | 260 | 1352 |
| Всього: | | | | | 37 750 м ³ /рік |

Дані щодо площ на сезон 2020 року в Україні наведено згідно Державної служби статистики:

[http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2019/sg/ppsgk/arh_ppsgk_u.html

Публікація документів Державної служби Статистики України]

З статистичних даних відомо, що щороку в Україні необхідно 37 750 м³/рік розчину пестицидного препарату [3].

Враховуючи потреби присадибних ділянок 6,6 %

$$37\,750\text{ м}^3 \times 0,064 = 2\,500\text{ м}^3 \text{ розчину пестициду.}$$

Оскільки розчин для обробки готується із розрахунку 1:100, то відповідно кількість прпарату на рік становить $2500/100 = 25\text{ м}^3$. Приймаємо 25 м^3

3.3 Розрахунок потужності виробництва $V_{\text{гп}} = 25 \text{ м}^3$ препарату боверіну на рік

Прийmemo кількість робочих трудоднів $T_{\text{рд}} = 90$.

Визначаемо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{\text{ц}} = 24 \times T_{\text{рд}} / T_{\text{цф}} = 24 \times 90 / 102 = 21,2 \text{ цикли}$$

Приймаемо 22 цикли.

де $T_{\text{цф}} = 102$ год, цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 1,5 год, завантаження поживного середовища – 0,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 96 год).

Далі розрахуемо кількість продукту за один цикл $V_{\text{ц}}$:

$$V_{\text{ц}} = V_{\text{гп}} / N_{\text{ц}} = 25 / 22 = 1,136 \text{ м}^3$$

Кількість культуральної рідини за цикл

$$V_{\text{крц}} = K_1 \cdot V_{\text{ц}} / (1 - E_{\text{св}}) = 1,05 \cdot 1,136 / (1 - 0,01) = 1,20 \text{ м}^3 = 1200 \text{ л}$$

де $K_1 = 1,1$ - коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій; втрати при виділенні продукту $E_{\text{св}} = 0,01$.

Геометричний об'єм ферментера для отримання $1,2 \text{ м}^3$ культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зап}}$ має становити:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{крц}} / K_{\text{зап}} = 1,2 / 0,6 = 2 \text{ 000 л}$$

Вибираемо ферментер геометричним об'ємом 2 м^3 .

де $K_{\text{зап}} = 0,6$; коефіцієнт заповнення ферментера.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Для вирощування пестицидного препарату використовують ферментери загальним об'ємом $2,0 \text{ м}^3$. Коефіцієнт заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$. Отже, робочий об'єм ферментера:

$$V_{\text{роб.}} = V_{\text{заг.}} \times K_{\text{зап.}} = 2 \times 0,6 = 1,2 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання $1,2 \text{ м}^3$ культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб.1}} = 1,2 \cdot 0,1 = 0,12 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування грибів в посівному апараті (інокуляторі) об'ємом $0,2 \text{ м}^3$ (200 л) з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для засіву посівного апарату (одержання $0,12 \text{ м}^3$ культуральної рідини) необхідно:

$$V_{\text{роб.2}} = 0,12 \cdot 0,1 = 0,012 \text{ м}^3 \text{ (12 л) посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування грибів у посівному апараті об'ємом $0,02 \text{ м}^3$ (20 л) з коефіцієнтом заповнення 0,6.

1096 л культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{\text{роб.3}} = 12 \cdot 0,1 = 2 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом 5 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для одержання 2 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб.4}} = 2 \cdot 0,1 = 0,2 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням грибів у колбах на качалці.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу пестициду ферментері об'ємом 2 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити чотири етапи.

3.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез проводиться у ферментері об'ємом 1 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Робочий об'єм ферментера:

$$V_{\text{роб}} = V_{\text{г.ф}} \times K_{\text{зап}}$$

$$V_{\text{роб}} = 1 \times 0,6 = 0,6 \text{ м}^3$$

де: $V_{\text{г.ф}}$ – геометричний об'єм ферментера;

$K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення, 0,6.

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 0,6 м³ культуральної рідини потрібно:

$$V_{роб1} = 0,6 \times 0,1 = 0,06 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу}$$

Таку кількість посівного матеріалу (60 л) можна отримати у процесі вирощування штаму ИМВ В-7023 у стандартному інокуляторі об'ємом 0,1 м³

50 л культуральної рідини можна одержати використанням:

$$V_{роб2} = 60 \times 0,1 = 6 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту готують в інокуляторі об'ємом 0,01 м³.

Для одержання 6 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{роб3} = 6 \times 0,1 = 0,6 \text{ дм}^3 \text{ посівного матеріалу}$$

Дану кількість інокуляту можна отримати культивуванням в колбах Ерлемейєра (об'єм 1 л).

Для зручності висновки стосовно кількості стадій і об'ємів підготовки посівного матеріалу представимо у вигляді таблиці 3.1:

Таблиця 3.2

Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу

| Об'єм ферментера, м ³ | Коефіцієнт заповнення | Робочий об'єм ферментера, м ³ | Об'єм посівного матеріалу (10%), м ³ | Конденсат (10%), м ³ | Об'єм поживного середовища, м ³ |
|----------------------------------|-----------------------|--|---|---------------------------------|--|
| 1 | 0,6 | 0,6 | 0,06 | 0,06 | 0,48 |
| 0,1 | 0,6 | 0,06 | 0,006 | 0,006 | 0,048 |
| 0,01 | 0,6 | 0,006 | 0,0006 | 0,0006 | 0,0048 |
| 0,001 | 0,6 | 0,0006 | 0,0006 | - | 0,00048 |

3.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу

Для виробничого біосинтезу *Beauveria bassiana* ВКПМ F-145 використовується середовище такого складу (г/л):

- молочна сироватка – 35;
- пивна дробина – 35;
- NaCl – 0,05,
- MgSO₄ – 0,05,
- CaCO₃ – 0,05,
- KNO₃ – 0,1,
- KH₂PO₄ – 0,1;
- дизель паливо – 0,1;
- рН середовища 6,0-7,0.

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Підготовка посівного матеріалу відбувається у три стадії (в колбах на качалці, у посівних апаратах об'ємом 10 та 100 л).

На етапі культивування внесення дизпалива забезпечує інтенсифікацію процесу спороношення ентомопатогенного гриба, а також продукування токсинів і комплексу ферментів, в тому числі і целюлозолітичних, для успішної адаптації і розмноження на твердому носії, так як відомо, що різка зміна субстрату для всіх живих організмів призводить до стресу, затримки в розвитку і навіть до загибелі. [22]

Використання висушеної пивної дробини забезпечує збереження початково містяться в ній поживних компонентів, а також легкість і рівномірність розподілу біоагентам при отриманні препарату і при подальшому його використанні.

Стерилізацію середовища для культивування посівного матеріалу в колбах на качалках здійснюється в автоклаві, так як його об'єм невеликий (0,6 л) для вирощування в інокуляторах і виробничого біосинтезу – у самих апаратах.

РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

4.1 Обґрунтування до ферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1 Обґрунтування умов і способу культивування *BEAUVERIA BASSIANA*

Культивування мікроскопічних грибів з метою накопичення біомаси передбачає:

- 1) наявність чистої високопродуктивної культури;
- 2) підготовку посівного матеріалу;
- 3) вибір умов ферментації;
- 4) підготовку і стерилізацію живильних середовищ.

Для росту грибів і прояви їх біосинтетичної активності необхідні:

- джерела живлення - вуглець, азот, водень, неорганічні сполуки, містять калій, натрій, фосфор, магній, кальцій, сірку і залізо;
- мікроелементи - марганець, цинк, молібден, кобальт, мідь, бор і ін.; стимулятори росту;
- оптимальні температура, вологість, ступінь аерації, освітлення та інші фактори.

Джерелами живлення можуть бути природні поживні субстрати невизначеного складу і штучні поживні середовища чітко визначеного складу, що містять необхідні елементи в засвоюваній формі. Як поживних субстратів використовують шматочки овочів, плодів, дрібно нарізані гілки і стебла рослин, зерно в натуральному вигляді або у вигляді екстрактів, настоянок або відварів (пивне сусло, дріжджова вода, кукурудзяний екстракт, картопляний екстракт), що додаються до штучних живильних середовищ. [16]

Живильні речовини засвоюються мікробами тільки при певній кислотності середовища, так як проникність оболонки мікробних клітин залежить від цього фактора. Більшість грибів розвивається при рН 4,5-6,0. Реакція середовища в процесі росту культури грибів може значно змінюватися.

| | | | | | | | | |
|------------------|-------------|-----------------------|---------------|-------------|--------------------------------|--------------------|--------------|----------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.16КР ПЗ</i> | | | |
| <i>Зм</i> | <i>Арк.</i> | <i>№</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | | | | |
| <i>Розробник</i> | | <i>Ярієва Г.А.</i> | | | <i>Розділ 4</i> | <i>Літера</i> | <i>Аркцш</i> | <i>Аркцшів</i> |
| <i>Керівник</i> | | <i>Воронцов О.О.</i> | | | | | 2 | 57 |
| <i>Н. кантр</i> | | | | | | <i>Кафедра БТМ</i> | | |
| <i>Консульт</i> | | | | | | 30 | | |
| <i>Зав. каф.</i> | | <i>Стадніков В.П.</i> | | | | | | |

Кожна стадія розвитку гриба (проростання спор, вегетативне розвиток міцелію, спорообразование) вимагає певних значень рН. Для деяких видів характерні два оптимуму кислотності. Оптимальні значення рН середовища можуть змінюватися для одного і того ж виду гриба як в сторону підкислення, так і в бік підлужнення в залежності від джерел харчування. Не менше значення для росту грибів має температура вирощування. [17]

Температурний оптимум визначається видовими властивостями грибів та умовами культивування. Мінімальна температура для розвитку грибів 0-5 ° С. Оптимальна для культивування *Beauveria bassiana* 22 ° С, рН 6-7.

Зростання грибів залежить також від умов освітлення. При недостатньому освітленні спостерігається затримка спорооутворення. Прямі сонячні промені негативно впливають на ріст грибів і їх активність при тривалому зберіганні.

Виробниче культивування мікроорганізмів – основна стадія технологічного процесу, багато в чому визначає техніко-економічні показники виробництва біопрепаратів. У біотехнологічній практиці знаходять застосування різні методи культивування мікроорганізмів, в основі яких лежить глибинне або поверхневе культивування.

Поверхневий спосіб культивування застосуємо тільки для аеробних мікроорганізмів, яких вирощують на поверхні рідкої або твердої (щільні або сипучої) середовища. У промислових умовах поверхневе культивування мікроорганізмів знаходить обмежене застосування (наприклад, вирощування міцеліальних грибів у виробництві ферментних препаратів, органічних кислот) по ряду причин:

- низький рівень механізації і автоматизації технологічного процесу (великі витрати ручної праці);
- невисока продуктивність ферментаційного обладнання;
- не виключається контакт працюючих з поверхневою культурою (міцеліальні гриби і їх конідії), що неприпустимо за санітарно-гігієнічним вимогам;

- низький ступінь використання компонентів живильного середовища.

При глибинному (суспензійному) культивуванні мікробні клітини ростуть у всьому обсязі рідкої живильного середовища, в якій вони суспендировані і знаходяться в підвішеному стані. Глибинний метод придатний для вирощування як аеробних, так і анаеробних мікроорганізмів. Переважна більшість виробничих продуцентів - аеробні культури, що вимагають інтенсивної примусової аерації середовища. Глибинний спосіб культивування має ряд очевидних переваг перед поверхневим:

- дозволяє виключити важкий непродуктивний ручний працю і значно скоротити виробничі площі;
- забезпечує високий рівень стерильності процесу;
- покращує гігієну праці;
- спрощує автоматизацію виробництва;
- дає можливість здійснювати безперервний процес ферментації;
- забезпечує більш повне використання поживних речовин середовища.

Глибинний метод культивування мікроорганізмів вимагає більш високого рівня культури виробництва, проте зазначені вище гідності методу зумовили його широке поширення. У виробничій практиці глибинне культивування мікроорганізмів здійснюють в періодичному або безперервному режимі. [18]

Біотехнологічні процеси відтворення мікроорганізмів можуть бути організовані в періодичному або безперервному режимах.

Періодичний режим культивування включає:

- стерилізацію середовищ, біореакторів і допоміжного обладнання; завантаження апарату живильним середовищем;
- внесення посівного матеріалу (клітин, суперечка);
- зростання культури, який може збігатися в часу з наступним етапом або передувати йому;
- синтез цільового продукту;
- відділення та очищення готового продукту.

Мова йде про тимчасову послідовності етапів, після закінчення останнього етапу проводиться чистка та мийка біореактора і його підготовка до нового циклу.

Зростання культури має вигляд S-подібної кривої і включає кілька фаз (різні дослідники виділяють від 4 до 9 фаз).

У безперервних процесах біоб'єкт постійно підтримується в експоненційній фазі росту: забезпечується постійний приплив свіжої живильного середовища в біореактор і відтік з нього культуральної рідини, що містить клітини і продукти їх життєдіяльності. Фундаментальним принципом безперервних процесів служить рівновагу між приростом біомаси за рахунок поділу клітин і їх зменшенням в результаті розведення свіжої середовищем.

Боверин отримують глибинним і поверхневим культивуванням гриба. Однак при глибинному культивуванні головне завдання - забезпечити утворення конідіоспор, оскільки в рідкому середовищі гриб розмножується вегетативно, утворюючи тільки гіфальні тільця, які називають гонідіями. Гонідії менш стійкі до термічного впливу при сушінні препарату і менш вірулентніші. Підбором складу живильного середовища можна забезпечити перехід 90-92% клітин в конідіоспор.

Культивування промислових мікроорганізмів здійснюється в біореакторах. Повноцінний склад живильного середовища, своєчасне додавання тих чи інших компонентів в процесі росту клітин і оптимальні умови культивування забезпечують максимальний вихід продукту. [19]

Використання рідкого середовища показало хороші результати у виробництві *Beauveria bassiana*, оскільки на ній утворюються різні морфологічні форми (міцелій, конідії і бластоспори). В цьому випадку утворюються бластоспори, які бажані завдяки своїй вірулентності та мають більш короткий час необхідного для виникнення інфекції. Таким чином, біореактор грає фундаментальну роль в розвитку рідкої культури, спрощуючи виробництво (вимагаючи більш короткого часу) і забезпечуючи оптимізовані умови для культивування.

Глибинно-рідинна ферментація дозволяє добре контролювати поживні і екологічні умови, необхідні для виробництва бластоспор *Beauveria*. Використання

біореакторів з мішалкою дозволяє створити однорідне живильне середовище, в якій можна відстежувати і контролювати температуру, розчинений кисень і рН, що підвищує вихід бластоспор і знижує забруднення. [див. рис. 3.1] Маніпулювання складом середовища і фізичними характеристиками, такими як швидкість аерації, температура, осмотичний тиск і рН, дозволяє легко оцінити належні поживні і екологічні умови для швидкого вирощування великої кількості активних, стабільних бластоспор *Beauveria*. [20]

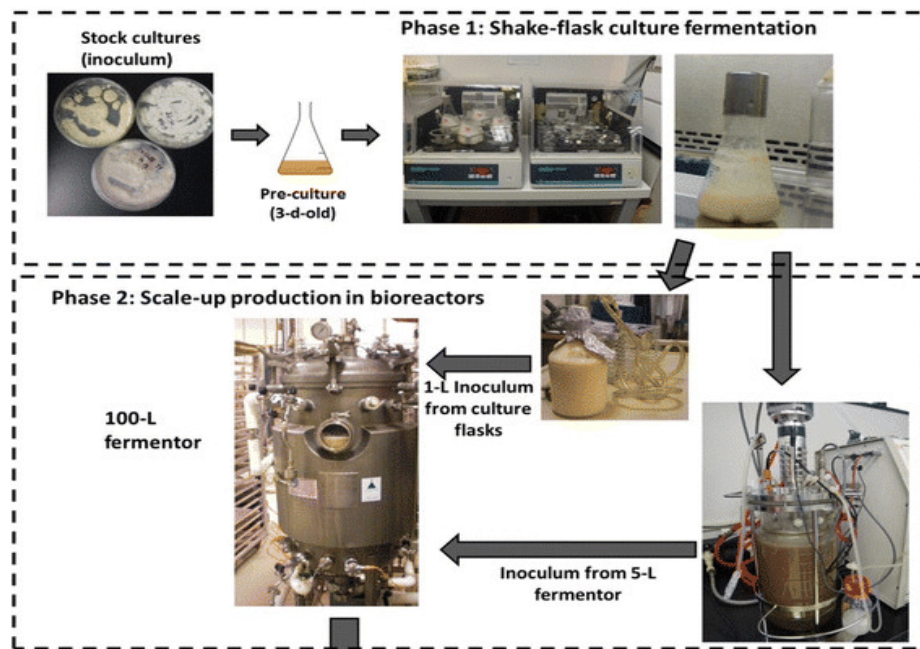


Рис. 4.1 Схема культивування *Beauveria bassiana*

Економічно ефективні компоненти середовища є ключовим елементом для успіху рідкої ферментації. Бластоспори можуть бути краще пристосовані для використання проти дрібних комах, які живуть в прикордонному шарі філлоплани з високою вологістю (білокрилки, попелиці та псіллиди), оскільки ці спори проростають і заражають господаря швидше, ніж повітряні конідії, знижуючи схильність несприятливих впливів навколишнього середовища. І навпаки, повітряні конідії можуть бути більш придатними для великих комах, таких як коники і гусениці, що живуть в більш сухий навколишньому середовищу, де бажані склади на масляній основі.

Щоб уникнути зараження промислової культури іншими мікроорганізмами всі операції по можливості проводяться в стерильних умовах. [3]

4.2 Вибір типу ферментера

У біотехнології використовується велика кількість обладнання і апаратури, значна частина з якої знаходить своє застосування в хімічній, харчовій та інших видах промисловості. Найбільш специфічним біотехнологічним обладнанням, в якому протікає стадія ферментації, є біореактор. Біореактор (ферментер, ферментатор, культиватор) являє собою закриту або відкриту ємність, в якій при певних умовах (тиск, температура, концентрація сухих речовин, рН середовища і т.д.) протікає на клітинному або молекулярному рівні контрольована реакція, здійснювана за допомогою мікроорганізмів або збільшення їх біомаси.

Біореактори поділяються на:

- апарати для вирощування посівного матеріалу - інокулятори;
- апарати для культивування мікроорганізмів - культиватори, ферментатори, ферментери великих обсягів;
- апарати для вирощування рослинних клітин - фітатрей - мембранний контейнер для вирощування рослинних клітинних культур.
- біореактори для вирощування тварин клітин відносно невеликого обсягу з вібромешалками або повільними (щадними) пропелерними мішалками.

Правильний розрахунок конструкції біореактора так само важливий для здійснення економічно вигідного процесу ферментації, як і відомості про біологічні характеристики використовуваних мікроорганізмів, отримані при біологічних і біохімічних дослідженнях. Основні цілі удосконалення біореакторів полягають у підвищенні безпеки проведення ферментації і мінімізації промислових витрат.

При оптимізації конструкції біореактора розглядаються такі найважливіші аспекти:

- перемішування середовища росту мікроорганізмів;
- дотримання температурного режиму;
- постачання клітин киснем в разі аеробного ферментації. [16]

Отже, визначившись із способом культивування та фізіолого-біохімічними особливостями продуцента, робимо вибір оснащення для ферментера, яке забезпечувало б необхідні умови для вирощування мікроорганізма.

1. У процесі культивування *Beauveria bassiana* аеробні умови створюються в результаті присутності подачі повітря в ферментер. Тобто для нормального росту аеробів у глибоких шарах рідкої культури необхідна аерація. Мікроорганізми здатні використовувати тільки розчинений кисень, але розчинність його дуже низька. Для 1 л води при 22 С за умови рівноваги з атмосферним повітрям містить 6,2 мл кисню (0,28 моль). Швидкість аерації встановлюється на $1 v / v / m$ (обсяг повітря / обсяг рідини.хв). Швидкість розчинення кисню підвищується зі збільшенням поверхні розділення між газовою та рідкою фазою, а також зі збільшенням парціального тиску кисню в газовій фазі. Тому для збільшення поверхні розділення фаз здійснюють перемішування. Отже, обираємо ферментери оснащені перемішувачами з частотою обертів 200-220 об/хв.

2. Інтенсивна аерація рідких середовищ, що містять білки, часто супроводжується небажаним піноутворенням. Для запобігання цьому в середу додають хімічні піногасники (наприклад, ерукової кислоти або силікони). Однак слід пам'ятати, що присутність хімічних реагентів може значно ускладнювати процедуру очищення продукту, тому намагаються використовувати мінімальні кількості піногасників. В нашому випадку піноутворення придушували за допомогою стерильного Antifoam Type "A" (Dow Corning Production, США). Або ж можна використати механічний спосіб піногасіння, принцип дії якого полягає у встановленні мішалки у верхній частині апарата, яка по команді датчика буде обертатися і розбивати піну.

3. Регулювання рН на рівні 5,5 автоматично контролювалася блоком управління ферментера (датчик рН). Необхідна умова для оптимального перебігу процесу ферментації.

4. При зростанні мікроорганізмів вивільняється велика кількість енергії у вигляді тепла, перемішують пристрої також виділяють тепло. Крім того, певний внесок вносять процеси загальної теплопередачі і теплообміну на кордонах фаз. Зазвичай системи охолодження за допомогою змішувачів або охолоджуючих сорочок досить для підтримки температури ферментації на певному рівні. [17]

Для забезпечення сталої температури ферментер оснащується датчиком температури.

Ферментер з потрібним оснащенням може бути запропонований Шанхайською компанією «Baohing Bio-Engineering Equipment Co., Ltd. (BXBIO)». Вони є досвідченим виробником біореакторів (ферментер), контролерів біопроцесу та постачальником послуг з інженерної біології. BXBIO та його інженерна команда, що мають досвід проектування та виробництва ферментерів, присвячують себе вивченню, вдосконаленню та розробці ферментерів, ферментатори та контролери серії BIOTECH задовольнили своїх користувачів у всьому світі завдяки передовій та якісній продукції. Продукція BXBIO широко використовується в освіті, наукових дослідженнях, біовиробництві тощо, і існує понад 6 тисяч продуктів BXBIO, які чудово працюють.

4.2.1 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Beauveria bassiana є аеробом, тому для розвитку і синтезу цільового продукту необхідною умовою є подача до ферментеру стерильного аераційного повітря. Підготовка повітря проводиться з метою очистки повітря від механічних часток, джерел контамінації та стабілізації термодинамічних показників.

Одним зі способів стерилізації повітря є опромінення ультрафіолетовими променями. Цей метод використовується для знезараження повітря в боксах. Проте в нього є ряд недоліків, які не дозволяють використовувати його для підготовки аераційного повітря, це, перш за все, утворення молекул озону з кисню.

Технологічно й економічно виправданим є очищення повітря за допомогою волокнистих і пористих матеріалів. Таким способом вдається отримати повітря з дуже високим ступенем очистки, що дозволяє його використання для керування культуральної рідини. Завислі в повітрі частки затримуються волокнистим матеріалом завдяки інерційному та дифузійному механізму осадження.

Для очищення повітря застосовується головний та індивідуальний фільтри. Індивідуальні фільтри встановлюються безпосередньо перед кожним ферментером. Головні фільтри заповнюються грубішим волокном і на цих

фільтрах видаляється близько 98 % мікроорганізмів-контамінантів. Використання ж індивідуальних фільтрів, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, дозволяє отримати повітря зі ступенем очистки 99,95% [4].

4.2.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Загальні нормативні вимоги, що пред'являються до миючих та дезінфікуючих засобів

Всі миючі засоби повинні виготовлятися за рецептурами, погодженим з Міністерством охорони здоров'я. До них пред'являються певні гігієнічні вимоги.

Миючі засоби повинні бути:

- нешкідливими для здоров'я людини і не надавати токсичну, алергічне і шкірно-резорбтивна дія, а компоненти, що входять до складу миючих засобів не чинити на організм мутагенну, тератогенну, канцерогенну, ембріотоксичну дію;
- добре розчинятися у воді;
- володіти високими миючими властивостями
- легко і швидко змиватися з посуду, інвентарю тощо;
- біологічно руйнуватися у воді (більше 80%), тому що вони негативно впливають на процеси природного самоочищення і водні організми.

Миючі засоби не повинні:

- кумулюватися (накопичуватися) в організмі людини;
- мати різкий і стійкий запах;
- впливати на якість продуктів;
- надавати шкідливої дії на миються об'єкти.

В якості миючих засобів використовуються мила, лужні і кислотні миючі препарати, синтетичні миючі засоби та мийно-дезінфікуючі засоби. [1]

Миючі засоби

Класифікація за методом застосування :

Гігієнічні. У цю категорію входять усі засоби після відходу за гігієною людини (шампуні, мило, гелі для душу, зубні паста і тому подібне).

Господарські. Цю категорію ми частіше все називаємо побутовою хімією. Сюди відносяться чистячі і миючі засоби для миття і чищення підлог, посуду, поверхонь, меблів, вікон і тому подібне.

Спеціальні. Засоби, розроблені для боротьби із складними забрудненнями або під потреби конкретної промислової галузі (медичні дезінфекатори, пасти для видалення слідів машинної олії, миючі засоби для підприємств і тому подібне)

Пральні порошки. Ці засоби для прання відносяться до окремої групи, оскільки їх призначення і способи застосування дуже різноманітні. Під кожен тип тканини, температурний режим і спосіб прання (ручний або машинний) варто використати спеціальний порошок, щоб уникнути ушкодження одягу. [2]

Класифікація за агрегатним станом

Цей тип визначає миючий засіб в групу, в залежності від його агрегатного стану: порошкоподібний, пастоподібний, твердий або рідкий.

Порошкоподібні миючі засоби

В основному їх використовують для очищення кахлю, емалі та інших поверхонь, яким не шкодить тертя. Недоліком концентратів в цьому виді є можливість пошкодження поверхні подряпинами. Щоб уникнути цього, слід уважно читати інструкцію, перед нанесенням засобу на поверхню.

Пастоподібні миючі засоби

Найчастіше використовуються на автомийках, так як засоби у вигляді пасти не залишають подряпин на поверхні, а навпаки здатні відполірувати її до природного блиску.

Тверді засоби для миття

Найбільш поширеним серед них є мило. Цікавий факт – у всьому світі з кожним роком скорочується використання мила в господарських цілях. Люди віддають перевагу порошкам і рідкому милу для рук, а про час, коли тверде мило використовували як засіб для миття посуду багато навіть і не згадують.

Рідкі засоби для миття

Найбільш популярний вид концентратів, який найчастіше застосовують на великих виробничих підприємствах і в домашньому господарстві – це рідкі засоби для миття. Ці концентрати дозволяють відмити забруднення будь-якої складності,

і гарантують при цьому відсутність пошкоджень поверхні. Звичайно, є засоби, які можна застосовувати на тій чи іншій поверхні. Щоб уникнути неприємних ушкоджень, слід уважно вивчити інструкцію перед використанням засобу.[3]

З органікою краще всього справляються:

Засоби на основі каустичного лугу. Основна складова подібної побутової хімії - це гідроксид натрію, з додаванням поверхнево-активних речовин, ароматизаторів і барвників. Зверніть увагу, що використати подібні засоби варто у край акуратно, надіваючи захисні рукавички і в окремих випадках побутовий респіратор.

Для боротьби з неорганічними забрудненнями підійдуть:

Кислотні засоби. Основним чистячим елементом в їх складі є фосфорна кислота, яка при змішуванні з хлорвмісними речовинами утворює небезпечний для здоров'я газоподібний хлор. Тому, перш ніж використати декілька засобів одночасно перевіряйте склад кожної упаковки.

Універсальний варіант:

Нейтральні миючі засоби. Є сумішшю поверхнево-активних речовин універсального використання. Вони безпечніші для здоров'я людини і залежно від складу подібного засобу зможуть впоратися з будь-яким типом забруднення. [2]

Види миючих засобів

1. Мила - солі натрію і калію і жирних кислот (пальмітинової, стеаринової, олеїнової, лляної). Іноді замість жирних кислот використовують нафтені кислоти. Виготовлення мила проводять шляхом омилювання жирів і масел рослинного і тваринного походження. Для отримання мила гідровані жири обмилюють розчином каустичної соди при нагріванні в котлах. При впливі солей натрію виходить тверде натроном мило, солей калію - рідке калійне мило, а нафтені кислот - нафтені мило. У туалетні мила додають барвники, ефірні масла, есенції і т.д.

Мила мають цілу низку цінних якостей: вони прекрасно змочують поверхні, є хорошими емульгаторами, сприяють механічному очищенню від забруднень (у тому числі видаляється 60-90% мікрофлори), мають деяким бактерицидною дією (особливо при збільшенні температури миючих розчинів).

2. Лужні миючі засоби

Каустична сода (їдкий натр, гідроксид натрію) - біла кристалічна речовина без кольору і запаху, добре розчинний у воді. Гарячі 2-3% розчини добре гідролізують білок, розщеплюють вуглеводи, діють згубно на вегетативні форми мікроорганізмів. Недолік - викликає корозію металів.

Кальцинована сода Na_2CO_3 (карбонат натрію безводний) - більш слабке лужний засіб. Являє собою дрібно кристалічний порошок, добре розчинний у воді. Гарячі розчини кальцинованої соди добре обмилюють жири і гідролізують білки. У жорсткій воді утворює тверді опади карбонату кальцію та інших нерозчинних солей. Застосовується при виготовленні мила, миючих порошоків, для замочування яєць, забрудненої білизни, столового та кухонного посуду і т.д.

Кристалічна сода $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$ (вуглекислий натрій), містить 63% води. Застосовується для замочування і чищення кухонного посуду та ін

Тринатрійфосфат - володіє високим емульгуючим і пептизуючим дією, пом'якшує воду.

Застосовується для миття обладнання, інвентарю, столового посуду.

Метасілікат натрію - водні розчини його мають миючі, знезаражуючими і отбеливаючими властивостями. Є постійним компонентом багатьох миючих композицій з рН 11,9-12,9. Однак він викликає знебарвлення фарб, гумових виробів, на склі залишає незмивні плями.

3. Кислотні миючі засоби. Широко застосовуються для очищення обладнання на молочних заводах, т.к. дуже активно з'єднуються з солями молока. Для цього використовується 0,3-0,5% азотна і сульфамінова кислоти. У слабких концентраціях застосовуються при проведенні профілактичної дезінфекції в харчовій промисловості.

4. Синтетичні миючі засоби (СМС). Займають основна питома вага серед миючих засобів і багато в чому перевершують інші засоби. До складу СМС входять ПАР і різні хімічні добавки, що надають їм специфічні властивості: ензими (протеолітичні і інші ферменти); речовини, пом'якшувальні воду (кальцинована сода, тринатрійфосфат та ін.); дезінфікуючі засоби; відбілюючі

речовини; освіжувачі фарб; ароматизатори; інгібітори корозії металів; барвники; поліпшувачі піноутворення та ін

СМС роблять сильний миючий дію як у м'якій, так і в жорсткій воді. Вони не вступають в реакції з кальцієм і магнієм і не утворюють з ними нерозчинні з'єднання.

СМС можуть чинити негативний вплив на організм людини і навколишнє середовище. Вони знежирюють шкіру, змінюють фізіологічні, біохімічні та біофізичні процеси в ній, викликають дерматити, а також алергічні захворювання верхніх дихальних шляхів. СМС при попаданні у водойми зі стічними водами призводять до порушення природних процесів самоочищення.

СМС випускається у вигляді порошків, рідин, паст і гранул. Призначення, способи приготування і застосування СМС вказуються в інструкціях.

Перелік вітчизняних та імпортованих СМС, використовуваних на відповідних харчових підприємствах, повинен мати дозвіл органів держсанепіднагляду.

5. Миючі дезінфікуючі засоби. Для санітарної обробки харчових об'єктів широко застосовують суміші, що складаються з різних хімічних речовин, підсилюють дію один одного, в результаті чого загальна ефективність суміші значно перевершує ефективність кожного компонента окремо. Крім того, спектр дії композицій значно ширше, ніж окремих хімічних засобів.

В даний час проводиться велика кількість різного роду миючих, чистячих, відбілюючих і дезінфікуючих засобів з антимікробну дію, за рахунок введення в них бактерицидних речовин. Так, з добавками хлораміну випускають порошки «Блиск», «Дезус», «Посудомой»; з включення щавлевої кислоти - порошок і рідина «Санітарний»; з вмістом калієвої солі дихлорізоціанурової кислоти - порошок ПЧД; з метасиликат натрію - паста «Саніта» і «Східна»; з гіпохлоритом кальцію - порошки «Білка», «Блиск» та ін.

Для виробництва мийно-дезінфекційних засобів широко використовуються катіонні речовини з класу четвертинних-амонієвих сполук (ЧАС). Водні розчини ЧАС мають низький поверхневий натяг, що обумовлює їх пенообразующие, емульгуючі, миючі та змочуючі властивості. ЧАС мають виражені бактериостатичними і деякими бактерицидними властивостями, вони не мають

запаху і кольору, не викликають корозії металевих поверхонь. У лужному середовищі вони діють активніше, ніж у кислот.

Для посилення бактерицидних властивостей дезінфікуючих засобів широко використовують додавання мила. Воно розчиняє жири, змиває забруднення разом з мікроорганізмами, знижує поверхневий натяг, що сприяє кращому проникненню дезінфектанта в мікробну клітину. У медичні та гігієнічні мила додають лікарські або хімічні дезінфікуючі речовини (триклозан, гексахлорофен, фенол, дьоготь та ін.)[1]

Критерії вибору дезінфікуючого засобу:

- широкий спектр антимікробної дії
- поєднання мийної і дезінфекційної дії; можливість використання теплих робочих розчинів (при цьому підвищується антимікробна і мийна дія)
- відсутність пошкоджуючої дії на матеріали об'єктів обробки
- коротка експозиція дезінфекції для економії часу на всю процедуру обробки
- легке змивання залишків засобу з оброблюваної поверхні й наявність доступних методів контролю якості змивання; стабільність засобу і його робочих розчинів при зберіганні
- зручність приготування робочих розчинів
- ступінь піноутворення
- різноманітність методів застосування робочих розчинів (протирання, зрошування, замочування, ручне миття, механізоване миття (в т.ч. в СІР)
- наявність доступних методів контролю вмісту активно діючих речовин в засобі і його робочих розчинах тощо.

2.3. Обґрунтувати вибір миючого засобу для оброблювальних об'єктів

Санітарна підготовка виробництва є одним з головних заходів боротьби з мікробною контамінацією та забезпечення асептичних умов на підприємстві.

Приміщення слід прибирати та дезінфікувати відповідно до докладних письмових методик. Миючі і дезінфікуючі засоби необхідно контролювати щодо мікробіологічної чистоти [6].

При проведенні дезінфекції об'єкта (поверхні приміщення, технологічне обладнання, комунікації, прибиральний інвентар тощо) найчастіше

використовують хімічні, рідше фізичні й механічні засоби. Сучасні вимоги до дезінфекційних речовин включають:

- широкий спектр антимікробної дії;
- бактерицидний ефект;
- добру розчинність у воді;
- відсутність пошкоджуючої дії на оброблювані об'єкти;
- низьку токсичність і алергенність.

При виборі дезінфікуючого засобу необхідно враховувати не тільки його бактерицидні властивості і спектр дії, але і можливу токсичність для людини. Тривале використання будь-якого дезінфікуючого засобу приводить до утворення стійких штамів. Тому дезінфікуючий засіб повинен змінюватися через кожні 14 днів [6].

«Дезосепт» — комбінований препарат для дезінфекції різних видів технологічного обладнання.

Суттєві переваги препарату:

- широкий спектр антимікробної дії: препарат має високу бактерицидну, туберкулоцидну, віруліцидну, спороцидну та фунгіцидну дію;
- сильна біоцидна та спороцидна дія завдяки високій окислюючій здатності надоцтової кислоти;
- відсутність ефекту при звичаєння мікроорганізмів до препарату;
- швидкість і надійність мікробіологічної дії внаслідок специфічної високої швидкості дифузії надоцтової кислоти через кліткову мембрану;
- препарат не викликає осадження білків;
- препарат добре розчиняється у воді, розчини препарату не піняться;
- широкий температурний інтервал застосування, в тому числі при низьких температурах;
- низькі концентрації робочого розчину препарату та низькі температури застосування;
- препарат на поверхні обладнання розкладається на нешкідливі продукти;
- залишки препарату легко та швидко змиваються водою;

- продукти розкладу надоцтової кислоти — оцтова кислота, вода, кисень — не токсичні та не шкідливі і не забруднюють навколишнього середовища [5].

Таблиця 4.1 Характеристика дезінфікуючого засобу

| Назва засобу | Склад | Призначення | Фізико-хімічні властивості | Вплив на організм | Ціна грн./л (кг) |
|--------------|---|---------------------------------------|--------------------------------------|---|------------------|
| «Дезосепт» | надоцтова кислота 15–20%, пероксид водню 15–25%, оцтова кислота 15–25%. | дезінфекція технологічного обладнання | випускається у формі водного розчину | належить до 3 класу помірно небезпечних речовин | 33 |

«Неохлор» — це концентрований хлорактивний засіб, багатокомпонентний препарат, для дезінфекції та санітарної обробки, що містить також миючий засіб, ароматизатор, інгібітор корозії і стабілізатор вмісту активного хлору [45].

Активно діюча речовина — гіпохлорит натрію (початкова концентрація активного хлору 7–9%) [4].

Таблиця 4.2 Характеристика препарату «Неохлор»

| Назва засобу | Склад | Призначення | Фізико-хімічні властивості | Вплив на організм | Ціна грн./л (кг) |
|--------------|---|--------------------------------------|---|---|------------------|
| «Неохлор» | гіпохлорит натрію, миючі, антикорозійні, стабілізуючі і ароматизуючі добавки. | для знезараження поверхонь приміщень | випускається у вигляді рідкого концентрату жовтуватого кольору з характерним запахом хлору і ароматизатора. | належить до речовин III класу безпеки (помірно небезпечні речовини) | 29 |

Основні переваги препарату:

- поєднання дезінфікуючої, миючої і дезодоруючої дії;
- відсутність необхідності в застосуванні активаторів;
- пожежо-вибухобезпечність препарату і робочих розчинів;
- знижена, порівняно із звичайними хлорактивними препаратами, корозійна дія;

- просте і швидке приготування робочих розчинів шляхом розведення концентрату питною водою;
- економічність, зумовлена порівняно невисокою ціною, низькими концентраціями і питомою витратою робочих розчинів;
- загальнодоступність засобів контролю вмісту активно діючої речовини в концентраті, робочих розчинах і на оброблених поверхнях;
- універсальність в застосуванні [4].

Представлені розчини відповідають усім вимогам до дезінфікуючих засобів. Найголовніше те, що вони не шкодять здоров'ю людини та відносно дешеві і зручні у використанні. Не потребують додаткових зусиль у приготуванні та використанні.

Дезінфікуючі засоби

Дезінфекція (від фр. *des* – «зnezараження, знищення» і лат. *infection* – інфекція) – це процес знищення або видалення з об'єктів навколишнього середовища збудників інфекційних хвороб, вегетативних форм збудників бактеріальних інфекційних хвороб, а також вірусів, рикетсій, токсинів, найпростіших, грибів.

Дезінфекція або зnezараження – це сукупність способів повного, часткового або селективного знищення потенційно патогенних для людини 5 мікроорганізмів на об'єктах зовнішнього середовища з метою розриву шляхів передачі інфекційних захворювань.

Основна мета дезінфекції – це запобігання чи ліквідація процесу накопичення, розмноження і поширення збудників інфекційних захворювань на об'єктах навколишнього середовища. Дезінфекція широко застосовується в комплексі профілактичних і протиепідемічних заходів. У закладах охорони здоров'я дезінфекція здійснюється з метою знищення на об'єктах даної установи збудників інфекційних захворювань – мікроорганізмів, вірусів, бактерій (включаючи мікобактерії туберкульозу), грибів, а при необхідності – їх переносників.

Розрізняють такі дезінфекційні заходи:

- 1) власне дезінфекція – знищення патогенних мікроорганізмів на об'єктах навколишнього середовища;
- 2) дезінсекція – знищення членистоногих-переносників;
- 3) дератизація – винищування гризунів;
- 4) стерилізація – повне знищення на об'єктах навколишнього середовища мікроорганізмів та їх спор.

Обґрунтування вибору методу дезінфекції

Дезінфекцію проводять за допомогою механічного, фізичного, хімічного, біологічного та комбінованого методів.

Механічний метод дезінфекції забезпечує видалення патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів з об'єктів зовнішнього середовища шляхом струшування, вологого протирання, провітрювання, вентиляції, прання, вологого прибирання, чищення предметів.

Перевагами механічного методу є простота і доступність виконання, недоліком – відсутність можливості досягти повного знезараження об'єкту.

Механічний метод не призводить до повного звільнення від мікроорганізмів, тому його зазвичай поєднують із фізичним та хімічним методами.

Фізичний метод дезінфекції забезпечує видалення мікроорганізмів з об'єктів шляхом дії таких фізичних чинників:

- висушування;
- високої температури;
- гарячого повітря;
- пари;
- ультрафіолетових променів;
- ультразвуку.[1]

4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу *Beauveria bassiana* ВКПМ F-145 використовується середовище такого складу (г/л):

- молочна сироватка – 35;
- пивна барда – 35;
- NaCl – 0,05,
- MgSO₄ – 0,05,
- CaCO₃ – 0,05,
- KNO₃ – 0,1,
- KH₂PO₄ – 0,1;
- дизель паливо – 0,1;
- pH середовища 6,0-7,0.

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Підготовка посівного матеріалу відбувається у три стадії (в колбах на качалці, у посівних апаратах об'ємом 10 та 100 л). На етапі культивування внесення дизпалива забезпечує інтенсифікацію процесу спороношення ентомопатогенного гриба, а також продукування токсинів і комплексу ферментів, в тому числі і целюлозолітичних, для успішної адаптації і розмноження на твердому носії, так як відомо, що різка зміна субстрату для всіх живих організмів призводить до стресу, затримки в розвитку і навіть до загибелі. [22]

Використання висушеної пивної дробини забезпечує збереження початково містяться в ній поживних компонентів, а також легкість і рівномірність розподілу біоагентам при отриманні препарату і при подальшому його використанні.

Стерилізацію середовища для культивування посівного матеріалу в колбах на качалках здійснюється в автоклаві, так як його об'єм невеликий (0,6 л) для вирощування в інокуляторах і виробничого біосинтезу – у самих апаратах.

4.3.1. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Beauveria bassiana* ВКПМ F-145 умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: молочна сироватка, пивна барда (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв)

Композиція Б: NaCl, MgSO₄, KNO₃, (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: КН₂РО₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Г: СаСО₃ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Молочна сироватка, яка містить цукри, вітаміни стерилізують при темпе-

ратурі 112—115 °С і тиску 0,05 МПа впродовж 20-30 хв. Солі композиції В стерилізують при стандартній для солей температурі. Композицію В стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію. Стерилізацію А, Б, В, Г здійснюють в автоклаві.

4.3.2. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 20 л

Стерилізація 6 л поживного середовища, необхідних для цих стадій, здійснюють у відповідних посівних апаратах:

Композиція А: молочна сироватка, пивна барда (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: NaCl, MgSO₄, KNO₃, КН₂РО₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: СаСО₃ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Б стерилізується в посівному апараті, тому що умови її стерилізації є жорстокішими, ніж композиції А.

4.3.3. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 200 л

Стерилізація 60 л поживного середовища, необхідних для цих стадій, здійснюють у відповідних посівних апаратах:

Композиція А: молочна сироватка, пивна барда (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: NaCl, MgSO₄, KNO₃, КН₂РО₄, (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: СаСО₃ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Б стерилізується в посівному апараті, тому що умови її стерилізації є жорстокішими, ніж композиції А.

4.3.4. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 2 м³

Стерилізація поживного середовища, необхідних для цієї стадії, здійсню-

ється у ферментері:

Композиція А: молочна сироватка, пивна барда (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: NaCl, MgSO₄, CaCO₃, KNO₃, KH₂PO₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

На основі проведених розрахунків підбираємо обладнання, характеристику яких наводимо у вигляді таблиці 3.1

Таблиця 5.1

| Найменування | Кількість | Технічна характеристика |
|--|-----------|---|
| 2 | 3 | 4 |
| Повітрязабірник | 1 | Оснащений металевою сіткою для видалення забруднень |
| Фільтр грубої очистки повітря | 1 | Гофрований фільтр з волокнистим фільтруючим матеріалом, витрати повітря 2380 м ³ /год./м ² , E= 85% |
| Компресор | 1 | Гвинтовий електричний компресор Seccato CSL 10/8-200, робочий тиск 0,8 МПа |
| Теплообмінник-охолоджувач | 1 | [9] |
| Теплообмінник нагрівач | 1 | [10] |
| Ресивер | 1 | Поверхня виготовлена з нержавіючих марок сталі, може бути шліфована або полірована, має зовнішнє антикорозійне покриття |
| Фільтр тонкої очистки | 1 | Фільтруючий матеріал – міроскловолокно, E= 95,9995% |
| Реактор змішувач для приготування та стерилізації NaCl (750) | 1 | Оснащений мішалкою [13] |
| Насос центробіжний | 1 | [14] |
| Інокулятор об'ємом 0,02 м ³ | 1 | Оснащений мішалкою, датчиками контролю температури, рН, контроль тиску [15] |
| Інокулятор об'ємом 0,2 м ³ | 1 | Оснащений мішалкою, датчиками контролю температури, рН, контроль тиску [15] |
| Інокулятор об'ємом 2 м ³ | 1 | Оснащений мішалкою, датчиками контролю температури, рН, контроль тиску [15] |
| Фільтри індивідуальної очистки | 1 | Ступінь очищення, E= 99,9995% [16] |
| Ферментер об'ємом 2 м ³ | 1 | Модель BIORUS-SJA, виробник «BIORUS®», робочий об'єм 2 м ³ [17] |

| | | | | |
|--------------------------------|----------------------|----------|---------------|---------------|
| <i>НУХТ БТЕК 04.01.16КР ПЗ</i> | | | | |
| <i>Зм</i> | <i>Арк.</i> | <i>№</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> |
| <i>Розробник</i> | <i>Ярієва Г.А.</i> | | | |
| <i>Керівник</i> | <i>Воронцов О.О.</i> | | | |
| <i>Н. контр</i> | | | | |
| <i>Консульт</i> | | | | |
| <i>Зав. каф.</i> | <i>Стадніков В.П</i> | | | |
| <i>Розділ 5</i> | | | | |
| | | | <i>Літера</i> | <i>Аркцш</i> |
| | | | | <i>Аркцив</i> |
| | | | | 2 |
| | | | 57 | |
| <i>Кафедра БТМ</i> | | | | |
| 51 | | | | |

РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу цільового продукту

ДР 3. Підготовка титрувальних розчинів

ДР 3.1 Підготовка HCl

Для приготування 2 л 6% розчину HCl, у колбу об'ємом 5 л додаємо 220 мл HCl та 1,8 л води.

ДР 3.2 Підготовка та стерилізація розчину NaOH

Для приготування 10 мл 6% розчину NaOH, у колбу об'ємом 50 мл додаємо 0,6 г NaOH та 9,4 мл води.

ДР 3.3 Підготовка та стерилізація розчину NaOH

Для приготування 100 мл 6% розчину NaOH, у колбу об'ємом 500 мл додаємо 6 г NaOH та 94 мл води.

ДР 3.4 Підготовка та стерилізація розчину NaOH

Для приготування 1 л 6% розчину NaOH, у колбу об'ємом 2 л додаємо 60 г NaOH та 940 мл води.

ДР 4. Підготовка поживних середовищ

ДР 4.1 Підготовка поживного середовища для вирощування в колбах

Розрахунок компонентів для приготування поживного середовища для культивування посівного матеріалу в колбах на качалках

| | | | | | | | | |
|------------------|-------------|-----------------------|---------------|-------------|--------------------------------|-----------------------|--------------|----------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.16КР ПЗ</i> | | | |
| <i>Зм</i> | <i>Арк.</i> | <i>№</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | | <i>Літера</i> | <i>Аркцш</i> | <i>Аркцшів</i> |
| <i>Розробник</i> | | <i>Ярієва Г.А.</i> | | | <i>Розділ 6</i> | | | |
| <i>Керівник</i> | | <i>Воронцов О.О.</i> | | | | | <i>2</i> | <i>57</i> |
| <i>Н. контр</i> | | | | | | <i>Кафедра БТМ 52</i> | | |
| <i>Консульт</i> | | | | | | | | |
| <i>Зав. каф.</i> | | <i>Стадніков В.П.</i> | | | | | | |

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

| Компонент поживного середовища | Вміст, г\л | Кількість для приготування 200 мл середовища, г | Композиції | Об'єм композиції, V, л |
|---------------------------------|------------|---|------------|------------------------|
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> |
| Молочна сироватка | 35 | 7 | А | 0,03 |
| Пивна барда | 35 | 7 | | |
| Вода | | 16 мл | | |
| NaCl | 0,05 | 0,01 | Б | 0,01 |
| MgSO ₄ | 0,05 | 0,01 | | |
| KNO ₃ | 0,1 | 0,02 | | |
| Вода | | 20 мл | | |
| KH ₂ PO ₄ | 0,1 | 0,02 | В | 0,08 |
| Вода | | 60 мл | | |
| CaCO ₃ | 0,05 | 0,01 | Г | 0,08 |
| Вода | | 80 мл | | |
| Усього | | | | 0,2 |

ДР 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 7 г молочної сироватки, 7 г пивної барди. Наважку поміщають у колбу об'ємом 200 мл, додають 16 мл питної води, переміщують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 112^{\circ}\text{C}$, 30 хв.

ДР 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 10 мг—NaCl; 10 мг —MgSO₄; 10 мг— KNO₃ . Наважку поміщають у колбу об'ємом 50 мл, додають 20 мл питної води, переміщують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131^{\circ}\text{C}$, 40 хв.

ДР 4.1.3 Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 20мг– K_2HPO_4 . Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають 60 мл питної води, перемішують, ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131^\circ\text{C}$, 40 хв.

ДР 4.1.4. Приготування і стерилізація композиції Г

На технічних терезах зважують 10мг CaCO_3 Наважку поміщають у колбу об'ємом 10 мл, додають 80 мл питної води, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують при $t = 131^\circ\text{C}$, 40 хв.

ДР 4.1.5. Змішування компонентів

В колбу композиції Б (Від ДР 4.1.2) в асептичних умовах вносимо стерильні компоненти з композицій А, В, Г (Від ДР 4.1.1, ДР 4.1.3, ДР 4.1.4). Перемішуємо. Проводимо мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 4.2 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в 2 л інокуляторі. Враховуємо 10% посівного матеріалу від ДР 4.1

Таблиця 6.2

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в 2 л інокуляторі

| Компонент поживного середовища | Вміст, г\л | Кількість для приготування 1,98 л середовища, г | Композиції | Об'єм композиції, V, л |
|---------------------------------|------------|---|------------|------------------------|
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> |
| Молочна сироватка | 35 | 69,3 | А | 0,3 |
| Пивна барда | 35 | 69,3 | | |
| Вода | | 288 | | |
| NaCl | 0,05 | 0,1 | Б | 1 |
| MgSO ₄ | 0,05 | 0,1 | | |
| KNO ₃ | 0,1 | 0,2 | | |
| KH ₂ PO ₄ | 0,1 | 0,2 | | |
| Вода | | 840 | | |
| Конденсат | | 100 | В | 0,6 |
| CaCO ₃ | 0,05 | 0,1 | | |
| Вода | | 590 | | |
| Усього | | | | 1,98 |

ДР 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 69,3 г молочної сироватки, 69,3 г пивної барда. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають 300 мл питної води, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і поміщають в автоклав. Стерилізують у ньому при $t = 112^{\circ}\text{C}$, 30 хв.

ДР 4.2.2 Приготування в стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 0,1 г—NaCl; 0,1—MgSO₄; 0,2—KNO₃, 0,2—KH₂PO₄. Наважку поміщають у инокулят об'ємом 2 л, додають 840 мл питної води з врахуванням 10%-го конденсату при подальшій стерилізації. До розчину добавляють 6% розчин HCl (Від ДР 3.1) до рН 4,5. За допомогою перемішувального пристрою розчиняють компоненти. Далі насосом перекачують отриманий розчин у простерилізований инокулятор. Стерилізація гострим паром при $t = 131^{\circ}\text{C}$, 40 хв.

ДР 4.2.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 0,1 г CaCO₃ поміщають у колбу на 750 мл, далі додають 500 мл питної води, перемішують. Стерилізація при $t = 131^{\circ}\text{C}$, 40 хв.

ДР 4.3 Підготовка поживного середовища для 20 л ферментера

Таблиця 6.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в 20 л инокуляторі

| Компонент поживного середовища | Вміст, г\л | Кількість для приготування 19,8 л середовища, г | Композиції | Об'єм композиції, V, л |
|--------------------------------|------------|---|------------|------------------------|
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> |
| Молочна сироватка | 35 | 693 | А | 2 |
| Пивна барда | 35 | 693 | | |
| Вода | | 1,68 | | |
| Конденсат | | 0,2 (л) | | |
| NaCl | 0,05 | 1 | Б | 12 |
| MgSO ₄ | 0,05 | 1 | | |
| KNO ₃ | 0,1 | 2 | | |

| | | | | |
|---------------------------------|------|----------|---|-------------|
| КН ₂ РО ₄ | 0,1 | 2 | | |
| Вода | | 10,2 (л) | | |
| Конденсат | | 1,2 (л) | | |
| СаСО ₃ | 0,05 | 1 | В | 5,8 |
| Вода | | 5,12 (л) | | |
| Конденсат | | 0,58 (л) | | |
| Усього | | | | 19,8 |

ДР 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 693 г молочної сироватки, 693 г пивної барди. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 1 л, додають 613мл питної води (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішувальний пристрій до повного розчинення компонентів. Стерилізують у ньому при $t = 112^{\circ}\text{C}$, 30 хв.

ДР 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 1 г—NaCl; 1 г —MgSO₄; 2 г — KNO₃, 2 г — КН₂РО₄, наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 20 л, додають 4,8 л питної води з врахуванням 10%-го конденсату при подальшій стерилізації. Далі додають 6% розчин НСІ(ДР 3.1) до рН 4,5. Вмикають перемішувальний пристрій до повного розчинення компонентів. Отриманий розчин перекачують насосом у попередньо простерилізований ферментер. Стерилізують у ньому при $t = 131^{\circ}\text{C}$, 40 хв.

ДР 4.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 1 г СаСО₃ поміщають у реактор-змішувач об'ємом 10 л, далі додають 4,68 л питної води з врахуванням 10%-го конденсату при подальшій стерилізації. Перемішують за допомогою перемішуючого пристроя до повного розчинення компонентів. Стерилізація у ферментері при $t = 131^{\circ}\text{C}$, 40 хв.

ДР 4.4 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 2 м³

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу ферментері 0,2 м³

| Компонент поживного середовища | Вміст, г\л | Кількість для приготування 198 л середовища, г | Композиції | Об'єм композиції, V, л |
|---------------------------------------|-------------------|---|-------------------|-------------------------------|
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> |
| Молочна сироватка | 35 | 6 930 | А | 30 |
| Пивна барда | 35 | 6 930 | | |
| Вода | | 16,8 (л) | | |
| Конденсат | | 3 (л) | | |
| NaCl | 0,05 | 10 | Б | 120 |
| MgSO ₄ | 0,05 | 10 | | |
| KNO ₃ | 0,1 | 20 | | |
| KH ₂ PO ₄ | 0,1 | 20 | | |
| Вода | | 102 (л) | | |
| Конденсат | | 12 (л) | | |
| CaCO ₃ | 0,05 | 10 | В | 58 |
| Вода | | 51,2 (л) | | |
| Конденсат | | 5,8 (л) | | |
| Усього | | | | 198 |

ДР 4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 6 930 г молочної сироватки, 6 930 г пивної барди. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 200 л, додають 16,8 л питної води (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішувальний пристрій до повного розчинення компонентів. Стерилізують при $t = 112^{\circ}\text{C}$, 30 хв.

ДР 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 10 г—NaCl; 10 г —MgSO₄; 20 г — KNO₃, 20 г – KH₂PO₄, наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 200 л, додають 102 л питної води з врахуванням 10%-го конденсату при подальшій стерилізації. Далі додають 6% розчин HCl(ДР 3.1) до рН 4,5. Вмикають перемішувальний

пристрій до повного розчинення компонентів. Отриманий розчин перекачують насосом у попередньо простерилізований ферментер. Стерилізують у ньому при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40 хв.

ДР 4.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 10 г CaCO_3 поміщають у реактор-змішувач об'ємом 100 л, далі додають 51,2 л питної води з врахуванням 10%-го конденсату при подальшій стерилізації. Далі перемішують за допомогою перемішувача пристроя до повного розчинення компонентів. Стерилізація у ферментері при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40 хв.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 2 м^3

| Компонент поживного середовища | Вміст, г\л | Кількість для приготування 1980 л середовища, г | Композиції | Об'єм композиції, V, л |
|---------------------------------------|-------------------|--|-------------------|-------------------------------|
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> |
| Молочна сироватка | 35 | 69300 | А | 300 |
| Пивна барда | 35 | 69300 | | |
| Вода | | 168 (л) | | |
| Конденсат | | 30 (л) | | |
| NaCl | 0,05 | 100 | Б | 1200 |
| MgSO_4 | 0,05 | 100 | | |
| KNO_3 | 0,1 | 200 | | |
| KH_2PO_4 | 0,1 | 200 | | |
| Вода | | 1020 (л) | | |
| Конденсат | | 120 (л) | | |
| CaCO_3 | 0,05 | 100 | В | 580 |
| Вода | | 512 (л) | | |
| Конденсат | | 58 (л) | | |
| Усього | | | | 1980 |

ДР 4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 69300 г молочної сироватки, 69300 г пивної барди. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 2000 л, додають 168 л питної води (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішувальний пристрій до повного розчинення компонентів. Стерилізують при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 хв.

ДР 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 100 г—NaCl; 100 г —MgSO₄; 200 г —KNO₃, 200 г – KH₂PO₄, наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 2000 л, додають 1020 л питної води з врахуванням 10%-го конденсату при подальшій стерилізації. Далі додають 6% розчин HCl(ДР 3.1) до рН 4,5. Вмикають перемішувальний пристрій до повного розчинення компонентів. Отриманий розчин перекачують насосом у попередньо простерилізований ферментер. Стерилізують у ньому при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40 хв.

ДР 4.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 100 г CaCO₃ поміщають у реактор-змішувач об'ємом 100 л, далі додають 512 л питної води з врахуванням 10%-го конденсату при подальшій стерилізації. Далі перемішують за допомогою перемішувального пристроя до повного розчинення компонентів. Стерилізація у ферментері при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1 Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Beauveria bassiana* ВКІМ F-145 отримуємо в ліофілізованому стані, зберігаємо при температурі +4°C..+6°C. Термін зберігання до 3-х місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах. Проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.2 Одержання робочої культури

Колекційну культуру після відновлення пересівають на чашку Петрі (середовище Сабуро) методом виснажувального штриха для одержання

ізолюваних колоній. Культивування в термостаті при $t = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 96 год. Далі проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.3 Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Отримані ізолювані колонії з чашки Петрі (ТП 5.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним агаризованим середовищем Сабуро (одна колонія для засіву однієї пробірки). Культивування в термостаті при $t = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 96 год. Далі проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 2 л змішане поживне середовище композицією (від ДР 4.1.5) розливають по 150 мл у колби об'ємом 750 мл. (коефіцієнт заповнення - 0,2)

У пробірку з робочою культурою *Beauveria bassiana* ВКПМ F-145 (від ТП 5.4) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочці колби з поживним середовищем. Культивують на качалках (220 об/хв) при $t = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 96 год. Проводять КМ на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л

В асептичних умовах у попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 20 л, що містить стерильну композицію Б вносять стерильні композиції А і В (від ДР 4.2.1, 4.2.3), охолоджують, вмикають перемішуючий пристрій та за допомогою стерилізованого 6%-го NaOH (Від ДР 3.2) доводять рН до 7,0. Через засівний стакан вносять 1,2 л посівного матеріалу (від ТП 5.4). Культивують при $t = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів мішалки 220 об/хв і постійною аерацією впродовж 96 год. Проводять КМ на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.6 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 200 л

В асептичних умовах у попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 100 л зливають стерильні поживні середовища композиції А і В (від ДР 4.2.1-4.2.3), вмикають перемішуючий пристрій та за допомогою стерилізованого 6%-го NaOH (Від ДР 3.2) доводять рН до 7,0. Далі через трубу перетискування зливають з інокулятора в інокулят від ТП 5.5. Культивують при $t = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів

мішалки 220 об/хв і постійною аерацією впродовж 96 год. Проводять КМ на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1 Виробничий біосинтез (отримання культуральної рідини)

У попередньо простерилізований ферментер об'ємом 1 м³ вносять простерилізоване поживне середовище композиції А і В (від ДР4.3.1, 4.4.3). Охолоджують. Вмикають перемішуючий пристрій. Доводять стерилізованим 6% розчином NaOH (Від ДР 6.2) рН до 7. Через трубу перетискування подають вносять з інокулятора інокулят від ТП 6.6. Культивують до концентрації біомаси 18,2 г/л при $t = 22^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів перемішуючого пристрою 220 об/хв і постійною аерацією впродовж 96 год. Проводять КМ на відсутність сторонньої мікробіоти

РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва

7.1 Визначення біомаси

Гравіметричним методом. Міцелій актиноміцетів і грибів відокремлюють фільтруванням. Паперовий фільтр поміщають у скляну лійку й фільтрують через нього точно виміряний обсяг культури, від 5 до 10 мл. Осад на фільтрі багаторазово промивають підкисленою дистильованою водою.

Визначення біомаси. Щоб визначити масу сухих клітин, центрифужну пробірку або фільтр із осадом клітин мікроорганізмів поміщають у сушильну шафу, висушують і зважують. Режим висушування й зважування той же, що використовується й при визначенні маси пробірок або фільтрів. Суху біомасу визначають за формулою:

$$M = \frac{(A-B)1000}{V}$$

де M – суха біомаса в г/л;

A – маса центрифужної пробірки (фільтра) з осадом у г;

B – маса центрифужної пробірки (фільтра) без осаду в г;

V – обсяг культуральної рідини, узятий для центрифугування (фільтрування) у мл. Точність методу визначається повнотою відмивання клітин від компонентів середовища й старанністю зважування.

Матеріали, реактиви й устаткування: Чашки Петрі з культурою мікроорганізмів, культуральна рідина з деякою концентрацією мікроорганізмів, фільтри, центрифужні пробірки, чашки Петрі, центрифуга, аналітичні ваги, сушильна шафа, ексікатор.

Методика проведення аналізу:

1. Довести масу центрифужних пробірок та фільтрів до постійної.
2. З поверхні щільного поживного середовища чашок Петрі провести змив культури мікроорганізмів великою кількістю дистильованої води. Далі провести фільтрування через паперовий фільтр. Далі фільтр кладуть у сушильну шафу

| | | | | | | | | |
|------------------|-------------|-----------------------|---------------|-------------|--------------------------------|-----------------------|-------------|---------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.16КР ПЗ</i> | | | |
| <i>Зм</i> | <i>Арк.</i> | <i>№</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | | | | |
| <i>Розробник</i> | | <i>Ярієва Г.А.</i> | | | <i>Розділ 7</i> | <i>Літера</i> | <i>Арқш</i> | <i>Арқшів</i> |
| <i>Керівник</i> | | <i>Варонцов О.О.</i> | | | | | <i>2</i> | <i>57</i> |
| <i>Н. контр</i> | | | | | | <i>Кафедра БТМ 62</i> | | |
| <i>Консульт</i> | | | | | | | | |
| <i>Зав. каф.</i> | | <i>Стадніков В.П.</i> | | | | | | |

і доводять б3огом асу до постійної. Масу культури визначають за формулою.

3. Із колби в центрифужну пробірку наливають точно вимірний обсяг ретельно перемішаної рідкої культури в обсязі 5 мл. Проводять центрифугування при 3000 об/хв. На протязі 25 хв. Далі надосадову рідину зливають. Осад промивають підкисленою водою і пробірки знову ставлять на центригування. Потім масу пробірки доводять до постійної. Масу культури визначають за формулою.

7.2 Визначення КУО

Кількість КУО визначають методом послідовних розведень з подальшим висівом на агаризоване середовище. З досліджуваного матеріалу готують ряд послідовних десятиразових розведень на стерильному рідкому живильному середовищі в пробірках ($10^{-1} \dots 10^{-10}$) [23]

1. Досліджуваний матеріал в невеликій кількості вносять до пробірки з рідким поживним середовищем, перемішують,

2. Потім краплю живильного середовища переносять в другу пробірку і т.д.

3. Вміст кожної пробірки виливають в стерильні чашки Петрі, після посіви поміщають в термостат.

Визначення концентрації вуглею

Андога 1030W ТОС. Аналізатор загального органічного вуглецю методом персульфатного окислення

Характеристики:

- Широкий робочий діапазон (2 ppb-30 000 ppm C)
- Обумовлені показники: загальний вуглець / загальний неорганічний вуглець / органічний вуглець / загальний звязаний вуглець (ТС / ТІС / ТОС / НРОС)
- Можливість установки двох паралельних камер для більш швидкого проведення вимірювань
- Можливість установки додаткового модуля для твердофазного окислення
- Лабораторні моделі
- Вимірювання засноване на «вологій» взаємодії проби з нагрітим персульфатом натрію

Принцип роботи

Аналізатор Aurora 1030W реалізує багатоступеневу методику аналізу для кількісного визначення різних видів вуглецю, присутніх в матриці зразка. Визначення проводиться прямим методом шляхом кислотного розкладання неорганічних вуглецевмісних солей і подальшої реєстрації вмісту неорганічного вуглецю, а потім окислення персульфат натрію для визначення органічного вуглецю (ТОС). Зміст загального неорганічного вуглецю визначається шляхом додавання до зразка 5% фосфорної кислоти до рН <2. Карбонати і бікарбонати в зразку диссоціюють і виділяють CO₂.

Кількість останнього вимірюється твердотільним недисперсійним ІК-аналізатором (SSNDIR) і перераховується в значення маси і концентрації. Після видалення неорганічного вуглецю в реакційну камеру додається персульфат натрію при температурі 98° С. Нагрівання і реакція протікають протягом трьох хвилин. При взаємодії з нагрітим персульфат натрію відбувається окислення органічних сполук з виділенням CO₂, який, в свою чергу, реєструється недисперсійним ІК-детектором. В результаті виробляється визначення масового вмісту і розрахунок кількості і концентрації ТОС в зразку. Аналізатор Aurora 1030W також підтримує і інші методики аналізу, включаючи визначення загального органічного вуглецю диференціальним методом за різницею між вмістом загального та неорганічного вуглецю (ТС-ТІС). Загальний вуглець визначається після одночасного введення в камеру зразка, кислоти і персульфата при 100 ° С.

Визначення концентрації амінного азоту

Метод формального і йодометричного титрування

Принцип методу полягає у блокуванні формальдегідом при рН 7,0 вільних аміногруп і титруванні лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп[18].

Хід визначення. У склянку місткістю 50 мл наливають необхідний обсяг аналізованого розчину препарату, містить 1,5 - 5,0 мг амінного азоту, і доводять загальний обсяг дистильованої водою до 20 мл. Електроди потенціометра занурюють в досліджуваний розчин, рН якого доводять до значення 7,0 з

допомогою розчину натрію гідроксиду (0,1 моль/л) або розчину соляної кислоти (0,1 моль/л).

У ході визначення електроди повинні весь час залишатися зануреними в розчин. До нейтралізованого розчину додають 2 мл нейтрального формаліну, перемішують і, невиймаючи електроди, титрують вміст розчином натрію гідроксиду (0,1 моль/л) до рН 9,1. Проводять два паралельних вимірювання.

При титруванні слід використовувати бюретку місткістю 5 мл.

Амінний азот розраховують за формулою:

$$X = V \times K \times 1,4 \times 100 A \times 1000$$

де А - кількість рідкого зразка (мл), взятого на аналіз; 100 - коефіцієнт перерахунку міліграмів в відсотки; 1000 - коефіцієнт перерахунку міліграмів в грами. [17]

ВИСНОВКИ

1. Біопестициди – речовини які застосовуються для біологічної боротьби з комахами. Їх дія заснована на використанні таких мікроорганізмів, як бактерії, недосконалі гриби і віруси. Ще для створення препаратів можуть використовуватися продукти життєдіяльності цих організмів. Біологічні засоби захисту класифікуються на наступні типи речовин: фунгіциди, гербіциди та інсектициди. З трьох мова піде про інсектицидах. Інсектицидні препарати виробляються в основному на основі ентомопатогенних грибів.

2. Боверін — мікробіологічний препарат інсектицидної дії, призначений для біологічного контролю шкідників сільськогосподарських, плодово-ягідних і овочевих культур відкритого та закритого ґрунту.

3. *Beauveria bassiana* вбиває членистоногих в результаті контакту комахи з конідіями (грибковими спорами). Механізм дії: конідіоспори гриба, потрапивши на тіло комахи, проростають і проникають в порожнину тіла, розчиняючи ферментами кутикулу, при цьому виділяють токсини, викликаючи загибель шкідників.

4. Ефективність гриба *Beauveria bassiana* забезпечується завдяки різних факторів вірулентності цього патогенна. Даний гриб викликає у комах захворювання – мікоз, що сприяє полегшенню його промислового виробництва. Спори даного гриба легко переносять різні умови. Чим вище вологість навколишнього середовища, тим легше спорах поширяться і заражати комах. При низькій або високій температурі спори гриба можуть зберезуватися доволі довгий час, що полегшує виробництво препаратів. Якщо ж зберігати препарат при температурі +8 °С, спори гриба здатні вичавити більше трьох років. Гриб мінімально вимогливий до складу середовища, потрібно не менше 3-4 компонентів для його культивування.

| | | | | | | | |
|-----------|------|----------------|--------|------|----------------------------|-------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 04.01.16КР ПЗ | | |
| Зм | Арк. | № | Підпис | Дата | | | |
| Розробник | | Ярієва Г.А. | | | Літера | Аркцш | Аркцшів |
| Керівник | | Воронцов О.О. | | | | 2 | 57 |
| Н. контр | | | | | Висновки Кафедра БТМ 66 | | |
| Консульт | | | | | | | |
| Зав. каф. | | Стадніков В.П. | | | | | |

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. М.В. Штерншис и др./ Биологическая защита растений / – М.: Колос, 2004.
2. Гештовт Н.Ю. Энтомопатогенные грибы (биотехнологические аспекты). – Алматы, 2002. – 288
3. Патент №1688820 А1. «Всесоюзный научно-исследовательский институт биотехнологии / И.Ю.Гальвидис, Э.В.Кононова, В.И.Дубова, А.И.Баласова, А.В.Наконечная, Г.Н.Коновалова. Опубликовано 07.11.91, Бюл. №41
4. Боверин на основе гриба – *Beauveria bassiana* [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://ahc.in.ua/p932213996-biologicheskij-insektitsid-boverin.html>
5. Бовери Бассиана (*Beauveria bassiana*) представник роду недосконалих грибів сімейства Clavicipitaceae [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://metarhizin.ru/blog/boverin-i-ego-analogi-kupit-cena/>
6. Захист рослин. Бовери. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://agromag.dp.ua/catalog/Insektitsidi-akaritsidi/borba-s-medvedkoyi/boverin-200g>
7. Гриб *Beauveria bassiana* [Електронний ресурс] Режим доступу: https://sadorod.biz.ua/catalog/sredstva_zashchity_ot_medvedki/boverin_200gr/
8. Сообщество Клубов Природного и Органического Земледелия. Боверин. [Електронний ресурс] Режим доступу:
9. <http://zemledelie.org/spravochniki/biopreparaty/ot-vreditelei-bioinsekticydy/boverin.html#:~:text=%D0%91%D0%BE%D0%B2%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BD>
10. GHERKASY BIOZAKHYST. БОВЕРИН [Електронний ресурс] Режим доступа: <https://cherkasybiozakhyst.com/ru/boverin/p92>
11. Биологический инсектицид на основе энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*. [Електронний ресурс] Режим доступу:
12. <https://prom.ua/p543367288-boverin-bioinsektitsid-biotehnika.html>
13. Патент №1688820 А1. «Всесоюзный научно-исследовательский институт биотехнологии / И.Ю.Гальвидис, Э.В.Кононова, В.И.Дубова, А.И.Баласова, А.В.Наконечная, Г.Н.Коновалова. Опубликовано 07.11.91, Бюл. №41

14. Growth and metabolism of *Beauveria bassiana* spores and mycelia/November 2015BMC Microbiology 15(1):267 / DOI: 10.1186/s12866-015-0592-4/ Hongxia Liu, Xusheng Zhao, Mingxin Guo, Hui Liu and Zhiming Zheng
15. Рис.5.1 [*Beauveria bassiana* под микроскопом], Рис.5.2 [Грибы рода Боверия (*Beauveria*) в影响 на комах] [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://mycology.su/beauveria-bassiana.html>
16. Чарыкова И.В., Кравченко Н.Л., Балпанов Д.С., Тен О.А. Технология получения биопестицида, предназначенного для подавления численности саранчовых вредителей // Биотехнология. Теория и практика, 2012. – № 4. – С. 25–29.
17. Биологический препарат на основе гриба *Beauveria bassiana* для защиты растений от вредителей/ [Электронный ресурс] <https://cherkasybiozakhyst.com/ru/boverin/p92>
18. ВЕРТИЦИЛЛИН – М [Электронный ресурс] <https://agropolis-store.com/product/%D0%B2%D0%B5%D1%80%D1%82%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%BB%D0%BB%D0%B8%D0%BD-%D0%BC/>
19. Препарат Метаризин [Электронный ресурс] https://sezon.com.ua/product/metarizin-1-l-bioinsektitsid-sistemnogo-deystviya-biotekhnika/?gclid=Cj0KCQjwgtWDBhDZARIsADEKwgNVk6iUnQ9haHaTjf2GH1OrKc6I4t9zXV57Xt9oZ5HQiluuSirFqrgaAgi2EALw_wcB
20. Блажевич О. В. Культивирование клеток: Курс лекций /– Мн.: БГУ, 2004. – 78 с. ISBN 985-485-293-8.
21. Факультативні метилотрофи [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://lifelib.info/microbiology/general/149.html>
22. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии // Под ред. А.И. Нетрусова. - М.: Академия, 2005. - 604.
23. Minaeva O.M., Akimova E.E., Zyubanova T.I., Tereshchenko N.N. /Bioformulations for Plant Protection: Evaluating the Quality and Effectiveness Textbook Томск Издательский Дом Томского государственного университета – 2018

24. 22.Н. С. Ручай, И. А. Гребенчикова/ТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА /Электронный курс лекций для студентов специальности 1-48 02 01 «Биотехнология» Минск 2014
25. Н. А. Ткаченко, О. П. Чагаровський, Н.О. Дец, Л.О. Ланженко, О. А. Кручек «ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНА ТА ТЕХНОЛОГІЧНА ЕКСПЕРТИЗА МОЛОКА»/ УДК 619:614.31:637.12.05(075) ББК П817.2:Ж607:Л95я7/ Одеса – 2018.
26. Біопестициди [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://svitroslyn.ua/ua/articles/chto-takoe-insektitsidy-chem-oni-opasny-tablitsa-sovmestimosti.html>
27. Мікробіологічний препарат [Електронний ресурс] Режим доступу <https://biotekhnika.od.ua/uk/produksiia/mikrobiolohichni-preparaty/boveryn-bt>
28. Публікація документів Державної служби Статистики України [Електронний ресурс] Режим доступу http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2019/sg/ppsgk/arh_ppsgk_u.html
29. Калунянц К. А., Голгер Л. И. Оборудование микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1987. – 398 с. Кіндзерський Ю.В. Потенціал національної промисловості: цілі та механізми ефективного розвитку. – К.: НАН України; Ін-т екон. та прогноз., 2009. – 928 с.
30. Патент №1688820 А1. «Всесоюзный научно-исследовательский институт биотехнологии / И.Ю.Гальвидис, Э.В.Кононова, В.И.Дубова, А.И.Баласова, А.В. Наконечная, Г.Н.Коновалова. Опубликовано 07.11.91, Бюл. №41
31. Боверин на основе гриба – *Beauveria bassiana* [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ahc.in.ua/p932213996-biologicheskij-insektitsid-boverin.html>
32. Бовери Бассіана (*Beauveria bassiana*) представник роду недосконалих грибів сімейства Clavicipitaceae[Електронний ресурс] Режим доступу: <https://metarhizin.ru/blog/boverin-i-ego-analogi-kupit-cena/>
33. Захист рослин. Бовери. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://agromag.dp.ua/catalog/Insektitsidi-akaritsidi/borba-s-medvedkoyi/boverin-200g>
34. Гриб *Beauveria bassiana* [Електронний ресурс] Режим доступу: https://sadorod.biz.ua/catalog/sredstva_zashchity_ot_medvedki/boverin_200gr/

35. Сообщество Клубов Природного и Органического Земледелия. Боверин. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://zemledelie.org/spravochniki/biopreparaty/ot-vreditelei-bioinsekticydy/boverin.html#:~:text=%D0%91%D0%BE%D0%B2%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BD>
36. GHERKASYBIOZAKHYST. БОВЕРИН [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://cherkasybiozakhyst.com/ru/boverin/p921>
37. Биологический инсектицид на основе энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://prom.ua/p543367288-boverin-bioinsektitsid-biotehnika.html>
38. Патент №1688820 А1. «Всесоюзный научно-исследовательский институт биотехнологии / И.Ю.Гальвидис, Э.В.Кононова, В.И.Дубова, А.И.Баласова, А.В.Наконечная, Г.Н.Коновалова. Опубликовано 07.11.91, Бюл. №41
39. Growth and metabolism of *Beauveria bassiana* spores and mycelia/November 2015 BMC Microbiology 15(1):267 / DOI: 10.1186/s12866-015-0592-4/ Hongxia Liu, Xusheng Zhao, Mingxin Guo, Hui Liu and Zhiming Zheng
40. Чарыкова И.В., Кравченко Н.Л., Балпанов Д.С., Тен О.А. Технология получения биопестицида, предназначенного для подавления численности саранчовых вредителей // Биотехнология. Теория и практика, 2012. – № 4. – С. 25–29/
41. Биологический препарат на основе гриба *Beauveria bassiana* для защиты растений от вредителей/ [Электронный ресурс] <https://cherkasybiozakhyst.com/ru/boverin/p92>
42. ФС.1.2.3.0022.15 Определение аминного азота методами формольного и йодометрического титрования
43. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум / Уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 127 с.
44. Т.М. Дроздова. Санітарія та гігієна харчування, 2005
45. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://vitus-lviv.com.ua/ru/novynu/klassifikatsiya-myyuchyh-zasobiv>

46. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://spicetech.com.ua/klasifikaciya-miyuchix-zasobiv/>
47. «Неохлор» лучшее средство дезинфекции, методические указания [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://soda.kiev.ua/a110676-neohlor-luchshee-sredstvo.html>.
48. Дезосепт форте [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.datonal.org/?m0prm=3&m1prm=4&showItem=27>.
49. Нормативне забезпечення: Метод. вказівки для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. форм. навч. / Уклад: С.В. Ігнатенко - К.: НУХТ, 2008. – С