

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

«До захисту допущено»

Директор інституту (декан факультету)

Завідувач кафедри

Грегірчак Н.М.

Пирог Т.П.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

« » _____ 2020 р.

« » _____ 2020 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Біосинтез поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB
Ac-5017 для контролю чисельності фітопатогенних бактерій

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

Ярова Ганна Анатоліївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Пирог Тетяна Павлівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти Клименко О.М.

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент

Ястремська Л.С.

(прізвище та ініціали)

(підпис)

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

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(шифр і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Яровій Ганні Анатоліївні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 для контролю чисельності фітопатогенних бактерій

керівник роботи Пирог Т.П., професор, д.б.н.

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017,
цільовий продукт: поверхнево-активні
речовини

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
РОЗДІЛ 1. Антимікробна дія на фітопатогенні мікроорганізми поверхнево-активних речовин. РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи досліджень. РОЗДІЛ 3. Біологічна дія поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017, синтезованих за наявності бактеріальних індукторів. РОЗДІЛ 4. Ділянка до ферментаційних процесів та біосинтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 для контролю чисельності фітопатогенних бактерій. РОЗДІЛ 5. Автоматизація ділянки виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва поверхнево-активних речовин – 1 аркуш формату А1.

Апаратурна схема виробництва поверхнево-активних речовин – 1 аркуш формату А1.

Схема автоматизації ділянки біосинтезу поверхнево-активних речовин – 1 аркуш формату А3.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
5	Клименко Олег Миколайович, доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	23.03.2020	11.05.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Антимікробна дія на фітопатогенні мікроорганізми поверхнево-активних речовин	20.03.2020-30.03.2020	
2	Матеріали і методи досліджень	01.04.2020-11.04.2020	
3	Біологічна дія поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017, синтезованих за наявності бактеріальних індукторів.	12.04.2020-21.04.2020	
4	Ділянка до ферментаційних процесів та біосинтез поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017 для контролю чисельності фітопатогенних бактерій.	22.04.2020-01.05.2020	
5	Автоматизація ділянки виробництва	02.05.2020-11.05.2020	
6	Оформлення пояснювальної записки	12.05.2020-22.05.2020	
7	Виконання графічної частини проекту	23.05.2020-31.05.2020	

Здобувач

(підпис)

Ярова Г.А.

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

(підпис)

Пирог Т.П.

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена дослідженню впливу бактеріальних індукторів у середовищі культивування *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 на біологічну активність синтезованих поверхнево-активних речовин (ПАР), а також розробці проекту виробництва мікробного препарату штаму ІМВ Ас-5017 з антимікробними властивостями для застосування у рослинництві.

Так, встановлено, що мінімальні інгібуючі концентрації ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, синтезованих за наявності як живих, так і інактивованих клітин *Escherichia coli* ІЕМ-1 і *Bacillus subtilis* БТ-2 становили 3-12 мкг/мл і були у 4-32 рази меншими, ніж МІК ПАР, отриманих без цих індукторів. Ступінь руйнування як бактеріальних (*Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *E.coli* ІЕМ-1, *B. subtilis* БТ-2) так і дріжджових (*Candida albicans* Д-6 і *Candida utilis* БВС-65) біоплівки, за дії ПАР штаму ІМВ Ас-5017 утворених за присутності індукторів, був досить високим (39,4-94%), у порівнянні з ПАР, одержаних без індукторів (31,9-65%). Обробка поверхонь (кахель, сталь та скло) ПАР штаму ІМВ Ас-5017, синтезованими за наявності бактеріальних індукторів, забезпечувала нижчий (7-39%) ступінь адгезії клітин *S.aureus* БМС-1 та *C.albicans* Д-6, ніж ПАР, отримані у середовищі без конкурентних мікроорганізмів (ступінь адгезії становив 33-87%).

На основі експериментально отриманих даних було розроблено проект виробництва мікробного препарату з антимікробною активністю для обробки капусти від бактеріозів, річна потужність становить 12 м³.

Кваліфікаційна робота складається зі 142 сторінок машинописного тексту, 30 таблиць, 96 літературних джерел та 3 аркушів креслень формату А1 та А3.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, фітопатогени, антимікробна активність, *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, культивування.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	3
ВСТУП.....	7

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. АНТИМІКРОБНА ДІЯ НА ФІТОПАТОГЕННІ МІКРООРГАНІЗМИ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН.....	9
1.1. Ліпопептиди як ефективні антимікробні агенти.....	9
1.2. Використання гліколіпідів для боротьби з фітопатогенними мікроорганізмами.....	21

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	33
2.1. Об'єкти досліджень.....	33
2.2. Культивування продуцента поверхнево-активних речовин.....	33
2.3. Визначення концентрації поверхнево-активних речовин.....	34
2.4. Визначення біологічних властивостей поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB Ac-5017.....	35
2.4.1. Дослідження антимікробної активності ПАР.....	35
2.4.2. Визначення антиадгезивної активності ПАР.....	36
2.4.3. Дослідження ступеня деструкції біоплівки за дії ПАР.....	37
РОЗДІЛ 3. БІОЛОГІЧНА ДІЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> IMB AC-5017, СИНТЕЗОВАНИХ ЗА НАЯВНОСТІ БАКТЕРІАЛЬНИХ ІНДУКТОРІВ.....	38
3.1. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB Ac-5017.....	38
3.2. Руйнування біоплівок за дії поверхнево-активних речовин, отриманих за наявності бактерій-індукторів.....	43
3.3. Вплив бактерій-індукторів на антиадгезивну активність поверхнево- активних речовин <i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB Ac-5017.....	48

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 4. ДІЛЯНКА ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА БІОСИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ІМВ АС-5017 ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЧИСЕЛЬНОСТІ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ.....	51
4.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	51
4.2. Техніко-економічне обґрунтування.....	57
4.2.1. Потреба у цільовому продукті.....	57
4.2.2. Розрахунок річної потреби.....	62
4.2.3. Розрахунок потужності виробництва поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017.....	63
4.2.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері.....	64
4.3. Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва.....	67
4.3.1. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору мийних та дезінфікувальних засобів для виробничого біосинтезу поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017.....	67
4.3.2. Обґрунтування стадії підготовки обладнання та комунікацій.....	73
4.3.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	76
4.3.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.....	77
4.4. Продуктовий розрахунок, розрахунок технологічного обладнання, матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу.....	80
4.4.1. Розрахунок кількості виробничих циклів.....	80
4.4.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу.....	81
4.4.3. Розрахунок матеріального балансу.....	93
4.4.4. Розрахунок та підбір ферментаційної та ємнісної апаратури.....	96
4.5. Специфікація обладнання.....	100

4.6. Опис технологічної схеми одержання поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017.....	103
4.7. Контроль виробництва поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017.....	115
4.7.1. Мікробіологічний контроль.....	120
4.7.2. Показники росту і синтезу.....	121
4.7.3. Визначення концентрацій джерела вуглецю та азоту.....	122
РОЗДІЛ 5. АВТОМАТИЗАЦІЇ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА.....	124
5.1. Опис функціональної схеми автоматизації.....	125
5.2. Специфікація засобів автоматизації.....	126
ВИСНОВКИ.....	129
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	131
ДОДАТКИ.....	143

ВСТУП

В умовах інтенсифікації сільськогосподарського виробництва проблема боротьби з фітопатогенними мікроорганізмами стоїть особливо гостро. Провідне місце в захисті рослин на сьогодні займає хімічний метод, який, з одного боку, дозволяє швидко та ефективно пригнічувати розвиток збудника хвороби, а з іншого – призводить до забруднення оточуючого середовища та сільськогосподарської продукції. Одним із найбільш перспективних шляхів скорочення об'ємів застосування небезпечних хімічних препаратів є розробка біологічних методів боротьби [1]. На сьогодні ринок України представлений здебільшого препаратами фунгіцидної дії, а проблема боротьби з бактеріозами сільськогосподарських рослин, які знищують 2-5% урожаю, досі залишається гострою [2].

У 2004 році із забруднених нафтою зразків ґрунту було виділено штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. Штам ЕК-1 зареєстрований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України за номером ІМВ Ас-5017. Було встановлено його здатність синтезувати поверхнево-активні речовини (ПАР) на різноманітних гідрофільних (етанол, глюкоза) та гідрофобних субстратах (гексадекан, рідкі парафіни) [3].

Окрім цього, встановлено, що ПАР штаму ІМВ Ас-5017 проявляють антимікробну та антиадгезивну дію, а також здатність до деструкції бактеріальних та дріжджових біоплівки [4].

В той час відомі методи підвищення антимікробної активності мікробних метаболітів, зокрема внесення конкурентних мікроорганізмів у середовище їх культивування [5].

					НУХТ БТЕК 04.01.03 ДР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ярова Г.А.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пирог Т.П.					7	2
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

У зв'язку з викладеним вище, **метою даної роботи** є дослідження можливості посилення біологічної активності поверхнево-активних *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 внесенням у середовище культивування конкурентних мікроорганізмів, а також розробка апаратурної та технологічної схем виробництва мікробного препарату ПАР штаму ІМВ Ас-5017 з антимікробною активністю для застосування у рослинництві.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. АНТИМІКРОБНА ДІЯ НА ФІТОПАТОГЕННІ МІКРООРГАНІЗМИ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

1.1. Ліпопептиди як ефективні антимікробні агенти

Ліпопептиди складаються з ліпідної частини, з'єднаної з коротким лінійним або циклічним олігопептидом. Продуцентами ліпопептидів є як бактерії (зокрема представники родів *Pseudomonas* та *Bacillus*), так і гриби [6]. Синтезовані даними представниками ліпопептиди проявляють антимікробну активність щодо фітопатогенних мікроорганізмів грибного та бактеріального походження.

Дія ліпопептидів на фітопатогенні гриби

У доступній літературі є багато робіт щодо дії ліпопептидів, синтезованих представниками роду *Bacillus* [7-22] та *Pseudomonas* [23] на фітопатогени грибного походження. Наявність такої великої кількості публікацій обумовлена тим, що такі патогенні гриби порушують нормальний перебіг фізіологічних процесів у рослинах, викликають некрози і в'янення, гнилі плодів, що призводить до часткової або повної загибелі рослини. Як наслідок, світове сільськогосподарське виробництво зазнає до 30% збитків щорічно. Найбільш розповсюдженими фітопатогенами є представники роду *Aspergillus*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Pythium* та інші.

Варто зазначити, що у роботах [7-23] автори встановлювали можливість використання як очищених розчинів ліпопептидів, так і супернатантів. Окрім цього, дослідники використовували різні методи визначення антифунгальної активності таких метаболітів.

Інгібування росту фітопатогенних грибів під дією ліпопептидів. У більшості робіт [7-15] антимікробну активність ліпопептидів визначали за інгібуванням зони росту фітопатогенних тест-культур.

					НУХТ БТЕК 04.01.03 ДР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. АНТИМІКРОБНА ДІЯ НА ФІТОПАТОГЕННІ МІКРООРГАНІЗМИ ПОВЕРХНЕВО- АКТИВНИХ РЕЧОВИН	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Ярова Г.А.					9	24
Перевір.		Пирог Т.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		

Так, в роботі [7] автори встановили, що супернатант культуральної рідини *B. subtilis* SSE4 (концентрацію не наведено) у кількості 10, 20 та 30% (об'ємна частка) пригнічував ріст *Colletotrichum gloeosporioides* DOAC1690 на 88,9%, 94,4% та 100% відповідно, а *Sclerotium rolfsii* DOAC 1521 – 83,8%, 88,2% та 92,6% відповідно (див. табл. 1.1).

Інші автори [8] показали ефективність використання ліпопептидвмісного супернатанту, отриманого після культивування *B. subtilis* GA1 на середовищі з сахарозою (20 г/л), щодо фітопатогенів роду *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. oxysporum*), *Aspergillus* (*A. flavus* MUCL14109, *A. niger*), *Trichoderma* (*T. harzanium*, *T. reesei*) та інших (*Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Gaeumannomyces* sp. , *Mucor* sp., *Penicillium expansum*). Встановлено, що інгібування міцеліального росту вищезазначених тест-культур становило 24-70%.

Відомо, що представники роду *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus* та *Botrytis* наносять тяжкі збитки сільському господарству України, вражаючи такі цінні культури як озима пшениця, соя, картопля, горох, які гинуть внаслідок розвитку кореневої гнилі, а також викликаючи суху гниль корзинки соняшника. Так, дослідники у роботі [9] повідомили, що супернатант, отриманий після культивування *B. subtilis* M4 у середовищі з такою ж кількістю сахарози (20 г/л), володів антимікробною активністю щодо *F. oxysporum*, *P. ultimum*, *R. solani*, *Rhizopus* sp., *B. cinerea* та зумовлював зони затримки росту цих тест-культур від 1-4 до 5-9 мм.

У статті [10] автори встановлювали здатність до прояву антифунгальної активності синтезованих ліпопептидів під час культивування на середовищі LB декількох продуцентів – *B. subtilis* ATCC 6633 та *B. subtilis* BBG100. Варто зазначити, що обидва штами синтезують два типа ліпопептидів – мікосубтилін та сурфактин. Відповідно, їх кількість у супернатанті штаму ATCC 6633 становила 4,35 та 1,15 мг/л відповідно та була меншою, у порівнянні з їх кількістю у супернатанті штаму BBG100 – 66 та 3,35 мг/л відповідно. Окрім цього, ліпопептиди, синтезовані штамом BBG100 виявились кращими, адже

спричиняли зони затримки міцеліального росту фітопатогенів *B. cinerea*, *F. oxysporum* та *Pythium aphanidermatum* від 8-9 до 10 мм, у той час як за дії супернатанту штаму ATCC 6633 зони інгібування міцелію вищенаведених тест-культур становили всього 1-4 мм (див. табл. 1.1).

У іншій роботі [11] автори культивували три штами *B. subtilis* (BS119m, BS113c та N3dn) на середовищі з глюкозою (40 г/л) та виділяли поверхнево-активні ліпопептиди. Було встановлено, що за різних концентрацій (20, 40, 80 та 160 мг/л) штами BS119m, BS113c та N3dn по-різному пригнічували ріст фітопатогену *A. flavus*, який вражає рослини з підвищеним вмістом крохмалю – пшениця, рис, просо, кукурудза. Так, за найбільшої концентрації (160 мг/л) ліпопептиди на 100% інгібували ріст тест-культури (див. табл. 1.1).

У роботі [12] дослідники за однакових умов культивування вирощували кілька продуцентів ліпопептидів роду *Bacillus* (*B. subtilis* CPMC1, *B. subtilis* UMAF6614, *B. subtilis* UMAF6639) та встановлювали дію поверхнево-активних речовин на збудників коричневої гнилі персиків роду *Monilinia*, які негативно впливають на їх врожайність та наносять значних збитків. Показано, що ефективними є як виділені ліпопептиди, так і ліпопептидвмісний супернатант. Так, інгібування *M. laxa* CPML1 та *M. fructicola* CPMC1 за дії супернатанту штаму CPA-8 становило 90 та 82,1%, штаму UMAF6614 – 64,1 та 63,3%, штаму UMAF6639 – 81,2 та 79,6% відповідно. Варто зазначити, що екстраговані з супернатанту ПАР пригнічували ріст вищенаведених тест-культур на 65,2-93,4%. Однак, концентрація супернатанту та виділених ліпопептидів авторами не наведена.

Вплив ліпопептидів, синтезованих *Bacillus* sp. P34, *B. licheniformis* P40, *Bacillus* sp. P7, *Bacillus* sp. P11 та *B. subtilis* P45B за однакових умов на середовищі з глюкозою (2,5 г/л), на ріст фітопатогенів роду *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. phoenicis*), *Fusarium* (*F. oxysporum* f. *lycopersici*, *F. graminearum*) та інших (*B. sorokiniana*) було описано у статті [13]. Встановлено, що зони затримки росту вищезазначених тест-культур становили від 5-15 мм (див. табл. 1.1).

Автори статті [14] повідомили, що ліпопептиди *B. subtilis* B-FS01 спричиняють зони затримки росту тест-культур *B. cinerea*, *P. capsici*, *Physalospora piricola*, *F. graminearum*, *A. alternate*, *Colletotrichum musae*, *R. solani*, *Fulvia vulva*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *F. oxysporum* f sp. *niveum*, *F. moniliforme* Sheldon ATCC 38932 від 4,5 до 17,9 мм.

Встановлено, що збудником пирикуляріозу рису є *Magnaporthe grisea*, який спричиняє ураження всіх частин рослини та призводить до втрат 40% врожаю. Так, ефективність ліпопептидів, синтезованих *Bacillus* sp. CS30, щодо такого фітопатогену показано у роботі [15]. Зазначимо, що дослідниками було виділено два типи ліпопептидів – сурфактин CS30-1 та CS30-2. Встановлено, що за дії сурфактину CS30-1 у концентраціях 25, 50, 100 та 200 мкг/мл спостерігався рівень інгібування росту тест-культури 40, 25, 15 та 10% відповідно, а при дії сурфактину CS30-2 – 50, 30, 25 та 18% відповідно (див. табл. 1.1).

Диско-дифузійний метод визначення антимікробної активності. Значно меншою є кількість робіт [16-19], у яких автори визначали антимікробну активність диско-дифузійним методом, який заснований на встановленні зон затримки росту мікроорганізму навколо паперового диску, просоченого розчином очищених метаболітів чи супернатанту у певних концентраціях.

Так, у роботі [16] показано, що ліпопептиди синтезовані *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 на середовищі з глюкозою (2 г/л) є ефективними щодо фітопатогенів плодкових дерев, таких як яблуня, груша, а також декоративних рослин (айстри, мальви, гвоздики, хризантеми), якими є представники роду *Aspergillus* (*A. niger* ATCC 16404, *A. phoenicis*, *A. flavus*), *Fusarium* (*F. oxysporum* f. *licopersici*, *F. graminearum*) та інші (*Apiosordaria* sp., *Bipolaris sorokiniana*, *Cercosporina sojina*, *Diplodia* sp.). Встановлено, що використання очищеного розчину ліпопептидів виявилось ефективнішим, зони інгібування росту вищенаведених тест-культур становили 10-17,5±3,5 мм. Окрім цього, авторами була показана антимікробна активність не тільки розчину ліпопептидів, а й супернатанту. При цьому зони інгібування росту

вищенаведених тест-культур становили $0-21,0\pm 1,4$ мм. Концентрація ліпопептидів у досліджуваних препаратах авторами не наведена.

У іншій роботі [17] автори показали ефективність використання ліпопептидів і супернатанту, отриманого при вирощуванні *B. subtilis* ABS-S14 на середовищі LB, щодо збудника зеленої цвілі цитрусових. Так, використання супернатанту (концентрація не наведена) зумовлювало пригнічення росту *Penicillium digitatum* на 90,9%, у порівнянні з контрольним зразком (стерилізована вода), при застосуванні якого інгібування тест-культури не спостерігали. У той час, екстраговані ПАР у концентраціях 5 та 10 мг/мл пригнічували ріст фітопатогену на 81,6 та 94,1% відповідно (див. табл. 1.1).

Аденіжі з авторами [18] повідомили, що ліпопептиди, отримані після культивування *B. velezensis* NWUMFkBS10.5 на середовищі LB, пригнічують ріст фітопатогенних грибів роду *Fusarium*, які є збудниками борошнистої роси та гнилей багатьох сільськогосподарських рослин. У роботі використовували розчин ліпопептидів у концентраціях 30, 50, 70, 90 та 100 мкг/мл. Так, при заданих концентраціях ПАР зони інгібування росту *F. graminearum* становили 1,4-2,9 см, а *F. culmorum* – 0,9-2,4 см.

У іншій роботі [19] наведено, що зони затримки росту тест-культур роду *Fusarium* (*F. oxysporum* SC7.1, *F. verticillioides* SC8.1, *Fusarium* sp. SC9.1), *Curvularia* (*C. senegalensis* SC4.1, *C. lunata* SC5.1) та інших (*Saccharicola bicolor* SC1.4, *Neodeighonia subglobosa* SC2.1, *Cochliobolus hawaiiensis* SC2.3, *Phomopsis* sp. SC4.2, *A. alternata* SC6.2) становили $9,0\pm 1 - 15,67\pm 0,58$ мм за дії ліпопептидів, синтезованих *B. subtilis* SCB-1 на середовищі з колоїдним хітином (0,5% об'ємна частка).

Мінімальна інгібуюча концентрація ліпопептидів. У доступній літературі нам вдалось знайти лише кілька робіт [17-19], у яких антимікробну активність ліпопептидів визначали за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК).

Так, у роботі [20] автори виявили ефективність ліпопептидів, отриманих після культивування *B. subtilis* 109GGC020, щодо фітопатогену *Phytophthora*

capsici, який завдає величезних втрат врожаю фермерам, вражаючи помідори, огірки, квасолі та перець солодкий. Таким чином, МІК поверхнево-активних речовин штаму 109GGC020 щодо вищезазначеної тест-культури становила 0,0013 мкг/мл.

Мніф у статті [21] встановив дію ліпопептидів, синтезованих *B. subtilis* SPB1, на фітопатогенну тест-культуру *F. solani*. Так, МІК ліпопептидів щодо вищезазначеного фітопатогена становила 3 мг/мл. Продовженням роботи автора стало визначення антимікробної активності ліпопептидів на фітопатогени роду *Rhizoctonia* [22]. Встановлено, що мінімальні інгібуючі концентрації ПАР щодо *R. bataticola* та *R. solani* становили 0,04 та 4 мг/мл відповідно.

Незважаючи на наявність великої кількості робіт, присвячених антифунгальній дії ліпопептидів, синтезованих представниками роду *Bacillus*, публікацій щодо дії поверхнево-активних речовин, отриманих після культивування представників роду *Pseudomonas*, вкрай мало. Нам вдалось знайти лише одну роботу [23], автори якої показали ефективність дії ліпопептидів, отриманих після культивування *P. fluorescens* BRG100 у середовищі з глюкозою (2 г/л), на фітопатогени грибного походження – *Phoma lingam* BJ 125, *Alternaria brassicae* AB 11-1, *S. sclerotiorum*, *R. solani* AG 2-1. У роботі автори зазначили, що ефективнішою виявилась суміш екстрагованих ПАР, у порівнянні з окремо виділеними сполуками. Так, за дії псевдофоміну 1 у концентрації 0,5 мг/мл інгібування росту вищезазначених тест-культур становило 31, 23, 13 та 19%, а за аналогічної концентрації псевдофоміну 2 – 65, 51, 60 та 18%. У той час, при дії суміші ПАР (псевдофоміну 1 та 2) вищої концентрації (2 мг/мл) інгібування вищенаведених фітопатогенів становило 46-76%.

Використання ліпопептидів щодо фітопатогенних бактерій

В останні два десятиліття захист овочевих культур від бактеріозів є однією з нагальних проблем у зв'язку з їх високим поширенням і шкідливістю.

Бактеріальні хвороби спричиняють великі економічні збитки сільському господарству, вражаючи майже всі культурні види рослин.

На відміну від великої кількості публікацій, присвячених вивченню впливу поверхнево-активних речовин ліпопептидної природи на фітопатогенні гриби, кількість робіт з вивчення їх активності щодо бактерій обмежена. Відомо, що серед збудників та шкідників рослин нараховується більше ніж 600 вірусів та віроїдів; близько 250 видів мікоплазм, понад 20 тис. видів грибів, а також декілька тисяч представників комах. Але лише близько 2% від усіх відомих захворювань рослин спричиняють бактерії [24].

Так, бактерії роду *Agrobacterium* є збудниками захворювань винограду, плодових дерев, фітопатогени роду *Xanthomonas* викликають бактеріози капусти, ріпаку, буряка цукрового, а представники роду *Pseudomonas* є фітопатогенами таких сільськогосподарських культур як помідори, морква, перець солодкий, кукурудза, цибуля, а також злакових культур.

Оскільки в доступній літературі робіт з вивчення антибактеріальної активності ліпопептидів щодо фітопатогенів мало, нам вдалось знайти лише кілька статей, у яких здебільшого антимікробну активність визначали за показником мінімальної інгібуючої концентрації [25-27], і лише в одній роботі використовували диско-дифузійний метод [7].

Так, автори статті [25] визначали антимікробну активність поверхнево-активних речовин *B. subtilis* 6051 щодо збудника бактеріальної крапчастості томатів *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 за показником мінімальної інгібуючої концентрації. Встановлено, що МІК ліпопептидів становила 25 мкг/мл.

Інші дослідники у роботі [26] визначали МІК поверхнево-активних речовин *B. subtilis* OG щодо фітопатогенів роду *Xanthomonas*, які є збудниками судинного бактеріозу капусти та виразок цитрусових. Показано, що мінімальні інгібуючі концентрації ліпопептидів штаму OG щодо *X. campestris* pv. *campestris* та *X. axonopodis* pv. *citri* становили 14 мг/мл (ітуруну 10 ммоль/л) та 68 мг/мл (ітуруну 50 ммоль/л) відповідно (див. табл. 1.2).

Антимікробну активність ліпопептидів *B. amyloliquefaciens* 32a за показником МІК щодо фітопатогенів роду *Agrobacterium*, які вражають більшість плодових та трав'янистих рослин, наведено у статті [27]. Встановлено, що при культивуванні продуцента у середовищі з сахарозою (25 г/л) відбувається синтез ПАР, мінімальні інгібуючі концентрації яких щодо *A. tumefaciens* C58 та *A. tumefaciens* B6 становили 0,002 мг/мл та 0,004 мг/мл відповідно.

У статті [7] антимікробну активність ліпопептидів щодо *X. campestris* визначали диско-дифузійним методом. Встановлено, що при застосуванні ПАР *B. subtilis* SSE4 зона затримки росту фітопатогена становила 30 мм.

Узагальнена інформація щодо антимікробної активності ліпопептидів проти фітопатогенних бактерій наведена в таблиці 1.2.

Таблиця 1.1

Узагальнені літературні дані щодо антимікробної активності ліпопептидів проти фітопатогенних грибів

Продуцент	Фітопатогенні тест-культури	Антимікробна активність		Література
		Супернатанту	Розчину ліпопептидів	
Показник інгібування зони росту				
<i>Bacillus subtilis</i> SSE4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> DOAC1690	100%*	н. в.	[5]
	<i>Sclerotium rolfsii</i> DOAC 1521	92,6%*		
<i>Bacillus subtilis</i> GA1	<i>Botrytis cinerea</i>	70%	н. в.	[8]
	<i>Fusarium graminearum</i>	63%		
	<i>Fusarium oxysporum</i>	58%		
	<i>Rhizoctonia solani</i>	56%		
	<i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus flavus</i> MUCL14109	55%		
	<i>Aspergillus niger</i>	51%		
	<i>Mucor</i> sp.	46%		
	<i>Pythium ultimum</i> , <i>Rhizopus</i> sp.	45%		
	<i>Trichoderma harzanium</i>	43%		
	<i>Trichoderma reesei</i>	42%		
	<i>Gaeumannomyces</i> sp.	30%		
<i>Penicillium expansum</i>	24%			
<i>Bacillus subtilis</i> M4	<i>Pythium ultimum</i>	1-4 мм	н. в.	[9]
	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Rhizopus</i> sp., <i>Botrytis cinerea</i>	5-9 мм		
<i>Bacillus subtilis</i> BBG100	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Pythium</i> <i>aphanidermatum</i>	8-9 мм	н. в.	[10]
	<i>Botrytis cinerea</i>	10 мм		
<i>Bacillus subtilis</i> BS119m	<i>Aspergillus flavus</i>	н. в.	94%**	[11]
<i>Bacillus subtilis</i> CPA-8	<i>Monilinia fructicola</i> CPMC1	82,1%	93,4%	[12]
	<i>Monilinia laxa</i> CPML1	90 %		
<i>Bacillus subtilis</i> P45B	<i>Aspergillus niger</i>	5-10 мм	н. в.	[13]
	<i>Aspergillus phoenicis</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	10-15 мм		
	<i>Bipolaris sorokiniana</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f.	15 мм		

<i>Bacillus subtilis</i> B-FS01	<i>lycopersici, Fusarium graminearum</i>			
	<i>Botrytis cinerea</i>	4,5 мм	H. B.	[14]
	<i>Fulvia vulva</i>	5,9 мм		
	<i>Fusarium oxysporum</i> f sp. <i>niveum</i>	8 мм		
	<i>Rhizoctonia solani</i>	10,4 мм		
	<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon ATCC 38932	12 мм		
	<i>Colletotrichum musae</i>	12,5 мм		
	<i>Fusarium graminearum</i>	12,8 мм		
	<i>Phytophthora capsici, Sclerotinia sclerotiorum</i>	14,4 мм		
	<i>Physalospora piricola</i>	14,9 мм		
<i>Alternaria alternate</i>	17,9 мм			
<i>Bacillus sp.</i> CS30	<i>Magnaporthe grisea</i>	H. B.	10%	[15]
			18%	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> BRG100	<i>R. solani</i> AG 2-1	H. B.	46%	[23]
	<i>Alternaria brassicae</i> AB 11-1		47%	
	<i>Phoma lingam</i> BJ 125		62%	
	<i>S. sclerotiorum</i>		76%	
Диско-дифузійний метод				
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LBM 5006	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	10,5 мм	10 мм	[16]
	<i>Aspergillus phoenicis</i>	0 мм	16,5 мм	
	<i>Aspergillus flavus</i>	13,5 мм	14 мм	
	<i>Apiosordaria sp.</i>	13,5 мм	13 мм	
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	13,5 мм	15 мм	
	<i>Cercosporina sojae</i>	21 мм	17,5 мм	
	<i>Diplodia sp.</i>	15,5 мм	15 мм	
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>licopersici</i>	0 мм	15,5 мм	
	<i>Fusarium graminearum</i>	0 мм	12,5 мм	
<i>Bacillus subtilis</i> ABS-S14	<i>Penicillium digitatum</i>	90,9%	94,1%	[17]
<i>Bacillus velezensis</i> NWUMFkBS10.5	<i>Fusarium graminearum</i>	2,9 см	H. B.	[18]
	<i>Fusarium culmorum</i>	2,4 см		
<i>Bacillus subtilis</i> SCB-1	<i>Fusarium verticillioides</i> SC8.1	9 мм	H. B.	[19]
	<i>Fusarium oxysporum</i> SC7.1	9,67 мм		

	<i>Fusarium sp.</i> SC9.1	10 мм		
	<i>Cochliobolus hawaiiensis</i> SC2.3	11,67 мм		
	<i>Curvularia senegalensis</i> SC4.1	12,67 мм		
	<i>Saccharicola bicolor</i> SC1.4	13,33 мм		
	<i>Phomopsis sp.</i> SC4.2	13,67 мм		
	<i>Neodeighonia subglobosa</i> SC2.1	15 мм		
	<i>Alternaria alternata</i> SC6.2	15,33 мм		
	<i>Curvularia lunata</i> SC5.1	15,67 мм		
Мінімальна інгібуюча концентрація				
<i>Bacillus subtilis</i> 109GGC020	<i>Phytophthora capsici</i>	н. в.	0,0013 мкг/мл	[20]
<i>Bacillus subtilis</i> SPB1	<i>Fusarium solani</i>	н. в.	3 мг/мл	[21]
<i>Bacillus subtilis</i> SPB1	<i>Rhizoctonia bataticola</i> ,	н. в.	0,04 мг/мл	[22]
	<i>Rhizoctonia solani</i>		4 мг/мл	

Примітка: * - за об'ємної частки супернатанту 30%; ** - за концентрації ПАР 80 мг/л.

**Узагальнені літературні дані щодо антимікробної активності
ліпопептидів проти фітопатогенних бактерій**

Продуцент	Фітопатогенні тест-культури	Антимікробна активність ліпопептидів	Література
Мінімальна інгібуєча концентрація			
<i>Bacillus subtilis</i> 6051	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> DC3000	25 мг/мл	[25]
<i>Bacillus subtilis</i> OG	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	14 мг/мл (ітуруну 10 ммоль/л)	[26]
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 32a	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	68 мг/мл (ітуруну 50 ммоль/л)	[27]
Диско-дифузійний метод			
<i>Bacillus subtilis</i> SSE4	<i>Xanthomonas campestris</i>	Зона затримки росту 30 мм	[7]

Отже, ліпопептиди, синтезовані представниками родів *Pseudomonas* та *Bacillus*, володіють антимікробною активністю щодо фітопатогенних грибів та бактерій. Однак кількість робіт з вивчення ліпопептидів як агентів проти бактеріозів рослин є значно меншою, що обумовлено недостатньою кількістю інформації. Оскільки більшу частину захворювань сільськогосподарських та декоративних рослин причиняють гриби, відповідно і кількість публікацій з їх вивчення є на порядки більшою.

1.2. Використання гліколіпідів для боротьби з фітопатогенними мікроорганізмами

Гліколіпіди – це низькомолекулярні поверхнево-активні речовини, які здатні знижувати міжфазний та поверхневий натяг та мають різноманітну структуру. Серед гліколіпідів широкого поширення набули рамноліпіди та софороліпіди, типовими продуцентами яких є представники родів *Pseudomonas* та *Candida* відповідно [28].

Рамноліпіди, синтезовані представниками роду *Pseudomonas*, являють собою амфіфільні молекули, що складаються з 3-гідроксижирних кислот, пов'язаних β -глікозидним зв'язком з моно- або ди-рамнозами. Завдяки своїй будові вони знайшли широке використання у біоремедіації вуглеводнів, органічних забруднювачів та очищення ділянок, забруднених важкими металами. Окрім цього, завдяки антимікробній активності дані метаболіти можуть бути використані для захисту рослин від патогенів [29].

Перші згадки про рамноліпіди датуються 1946 роком, коли Bergström зі співавторами у своїй роботі [30] встановили здатність *P. aeruginosa* синтезувати такі сполуки на середовищі з глюкозою. Протягом наступних років з'явилися роботи інших дослідників, присвячені визначенню структурних одиниць такого рамноліпиду [31], якими виявились L-рамноза та β -гідроксидеканова кислота, дослідженню α -1,2-глікозидних зв'язків між фрагментами рамнози [32], вивченню можливості синтезу моно-рамноліпідів за культивування декількох штамів *P. aeruginosa* в однакових умовах на н-парафінах [33], а також визначенню відсоткового складу компонентів рамноліпідів, синтезованих представниками роду *Pseudomonas* [34].

За результатами досліджень останніх років було встановлено, що рамноліпіди проявляють антимікробну активність щодо фітопатогенних мікроорганізмів грибного [35-48] та бактеріального [35] походження.

У більшості доступної літератури представлені роботи, у яких антимікробну активність рамноліпідів визначали як для їх очищених розчинів, так і для супернатантів різноманітними методами – за показником

мінімальної інгібуючої концентрації [35, 36, 37, 43-45] та інгібуванням росту фітопатогенів [37, 39-42, 46-48].

Більшість робіт присвячені встановленню антимікробної активності рамноліпідів, отриманих як за культивування продуцентів на традиційних субстратах [35-42], так і на нетрадиційних, в тому числі на промислових відходах [43-48].

Дія рамноліпідів, синтезованих на традиційних субстратах, на фітопатогенні гриби. Так, у роботі [35] автори встановлювали ефективність рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa* B5 щодо ряду фітопатогенів (*Alternaria mali*, *B.cinerea*, *Cercospora kikuchii*, *Cladosporium cucumerinum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Cylindrocarpon destructans*, *Didymella bryoniae*, *F. oxysporum f sp cucumerinum*, *M. grisea*, *P. capsici*, *R. solani*), які є збудниками різноманітних захворювань рослин, серед яких антракноз, що спричиняє ураження надземної частини рослини у вигляді коричневих або білих плям з подальшим її гниттям та загибеллю. Встановлено, що МІК синтезованих рамноліпідів проти вищенаведених тест-культур були низькими та становили 10-50 мкг/мл (див. табл. 1.3).

Антифунгальну активність рамноліпідів *P.aeruginosa* DS9 щодо збудника червоної гнилі цукрової тростини визначали у роботі [36] . Автори порівнювали антимікробну активність метаболітів штаму DS9 зі стандартним рамноліпідом RL-R95 за ефективної концентрації обох речовин 100 мкг/мл. Встановлено, що рамноліпід *P.aeruginosa* DS9 виявились ефективнішими, при цьому спостерігали пригнічення фітопатогену на 86,6%, у той час як контрольний зразок RL-R95 спричиняв інгібування на 83,3% за аналогічної концентрації.

Відомо, що ґрунтова хвороба кореня, збудниками якої є представники родів *Pythium* та *Phytophthora*, спричиняє значні втрати багатьох сільськогосподарських рослин, серед яких помідори та полуниця. Так, у статті [37] антимікробну активність рамноліпідів *P. aeruginosa* IGB 83 визначали за інгібуванням таких фітопатогенів, а саме *P. aphanidermatum*

КАСС 40156, *P. ultimum* КАСС 40705, *P. capsici*, *P. nicotianae* КАСС 40906, *P. infestans* КАСС 40718. Автори показали, що лише при концентрації рамноліпідів 100 мкг/мл спостерігали пригнічення *P. ultimum* КАСС 40705 на 90%, у той час як використання рамноліпідів у концентрації удвічі більшій спричиняло інгібування росту інших тест-культур на 80%.

Збудником кореневої гнилі цикорію є *Phytophthora cryptogea* PD2009, цей фітопатоген вражає 40-50% коренеплодів, які відбраковуються при здачі на переробні підприємства, що наносить значних збитків виробникам. Автори роботи [38] показали ефективність рамноліпідів, синтезованих *P. aeruginosa*, щодо вищезазначеного збудника. Антифунгальну активність визначали як для синтезованих рамноліпідів, так і для рамноліпідвмісного препарату PRO-1, який є розчином рамноліпідів в олії у кількості 25 мкг/мл, при цьому кінцева концентрація препарату становила 25%. Встановлено, що мінімальна інгібуюча концентрація ПАР щодо *P. cryptogea* PD2009 становила 25 мкг/мл, що відповідає 100 мкг/мл препарату PRO-1.

Інші дослідники у роботі [39] встановили, що рамноліпіди *P. aeruginosa* 41В пригнічують ріст збудника захворювання виноградної лози. Так, за концентрації 0,025 мкг/мл загибель *B. cinerea* T4 становила 12%, у той час, як за удвічі більшої концентрації спостерігалось повне інгібування фітопатогену.

Goswami зі співавторами у роботі [40] показали, що супернатант та виділені рамноліпіди, отримані після культивування *P. aeruginosa* DS9 у середовищі з глюкозою, проявляли антифунгальну активність щодо *Fusarium sacchari* – збудника захворювання цукрової тростини. Так, за концентрацій 0,5, 1,5 та 2 г/л супернатанту та ПАР інгібування вищезазначеного фітопатогену становило 34-55,3% та 51-62,3% відповідно (див. табл. 1.3).

Фітопатогеном кукурудзи є гриб *Fusarium verticillioides* FS7, який викликає гніль стебла рослини або безсимптомно колонізує її, що призводить до значних втрат урожаю. У роботі [41] автори зазначили, що культивування *P. aeruginosa* SS14 у середовищі з глюкозою (2%, об'ємна

частка) супроводжується синтезом рамноліпідів, ефективних щодо спор вищенаведеного фітопатогену у діапазоні концентрацій 5-100 мкг/мл, а міцелію 10-200 мкг/мл. Так, за ефективною концентрації ПАР 100 мкг/мл інгібування спор тест-культури досягло 98% у порівнянні зі стандартним зразком R-95, а при 200 мкг/мл спостерігали найвищий ступінь пригнічення міцелію – 82%.

У іншій роботі [42] дослідники навели залежність пригнічення міцелію збудника сірої плісняви *B. cinerea* В630 від тривалості дії на нього рамноліпідів *P. aeruginosa* 41В, отриманих після культивування продуцента на середовищі з сахарозою (30 г/л). Концентрація рамноліпідів становила 0,06 мкг/мл. Так, найбільше інгібування міцеліального росту фітопатогену спостерігалось після 24 год (54%), у той час як збільшення тривалості обробки супроводжувалось зменшенням пригнічення росту – після 144 год пригнічення росту становило лише 28%.

Окрім традиційних субстратів, актуальним є використання промислових відходів різноманітних виробництв як компонентів поживних середовищ для культивування мікроорганізмів та синтезу рамноліпідів.

Використання промислових відходів для отримання гліколіпідів.

На початку ХХІ ст. з'явилась робота [43] автори якої встановили антимікробну активність рамноліпідів, синтезованих *P.aeruginosa* АТ10 у середовищі з відпрацьованими жирними кислотами (5%, об'ємна частка), отриманими у процесі нафтопереробки, щодо збудників бурої гнилі сільськогосподарських рослин. Так, МІК таких рамноліпідів щодо *B. cinerea* та *R. solani* становили 18 мкг/мл.

У 2003 році в роботі [44] дослідники показали, що при вирощуванні *P.aeruginosa* 47Т2 на середовищі з сумішшю відпрацьованих олій (оливкової та соняшникової, 1:1) у кількості 40 г/л, відбувається синтез рамноліпідів, ефективних щодо фітопатогенів культурних рослин (*Chaetonium globosum* АТСС 6205, *Penicillium funiculosum* СЕСЕ 2914, *Gliocadium virens* АТСС

4645, *F. solani*). При цьому мінімальні інгібуючі концентрації рамноліпідів щодо таких тест-культур були в межах 16-75 мкг/мл (див. табл. 1.3).

Автори роботи [45] встановили можливість культивування *P. aeruginosa* LBI у середовищі із соапстоком (2%, об'ємна частка), який є відходом масложирового виробництва. Встановлено, що при цьому відбувався синтез рамноліпідів, що проявляють антимікробну активність щодо фітопатогенних грибів родів *Alternaria* та *Penicillium*, які є збудниками хвороб багатьох сільськогосподарських рослин, серед яких горох, цукровий буряк, озима пшениця та соняшник. Автори зазначили, що мінімальна інгібуюча концентрація рамноліпідів щодо *A. alternata* була на декілька порядків нижчою (4 мкг/мл), порівняно з МІК *P. funiculosum* СЕСТ 2914 (64 мкг/мл).

Відомо, що збудником кореневої гнилі кокосів є фітопатогенний грибок *Pythium myriotylum*. Так, автори у статті [46] показали ефективність рамноліпідів, синтезованих *P. aeruginosa* PNA1 у середовищі з гліцерином (1,5 %, об'ємна частка) щодо фітопатогену *P. myriotylum*. Встановлено, що за концентрацій рамноліпідів 0,025-2,5 мкг/мл міцеліальний ріст вищенаведеної тест-культури становив від 10,2 до 4,5 см² і був нижчим, у порівнянні з контрольним зразком без обробки (11,5 см²).

Інші дослідники [47] встановили, що при культивуванні *P. aeruginosa* ZJU211 на середовищі з рапсовою олією (6%, об'ємна частка) відбувається синтез рамноліпідів, ефективних щодо фітопатогенів роду *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. oxysporum*) та інших (*B. cinerea*, *M. circinelloides*, *Mucor* spp). Дослідники зазначили, що ефективним виявився як розчин ПАР, так і виділені ди-рамноліпіди у концентраціях 30 мкг/мл. Так, за використання розчину рамноліпідів інгібування становило 11,9-77,6%, а при дії виділених ди-рамноліпідів 27-71,2%.

Автори статті [48] показали, що рамноліпіди, отримані після культивування *P. aeruginosa* ZJU211 на середовищі з рапсовою олією (6%, об'ємна частка), за різних концентрацій володіють антимікробними властивостями щодо фітопатогенів помідорів – *Mucor circinelloides* ССТСС

M210113 та *Verticillium dahliae* ATCC 7611. Встановлено, що при концентрації 10 мкг/мл інгібування росту фітопатогенного штаму ССТСС M210113 становило всього 19%, а зі збільшенням концентрації до 200 мкг/мл ефективність рамноліпідів була вищою – інгібування становило 58%. Крім цього, рамноліпіди у концентрації 60 мкг/мл були ефективними і щодо штаму ATCC 7611 та пригнічували ріст цього фітопатогену на 73%.

Узагальнена інформація щодо антимікробної активності рамноліпідів проти фітопатогенних грибів наведена в таблиці 1.3.

Антибактеріальна активність рамноліпідів. Незважаючи на велику кількість робіт щодо антимікробної дії рамноліпідів на фітопатогени грибного походження, робіт з дослідження їх дії проти бактеріозів рослин значно менше [35], адже лише близько 2% від усіх відомих захворювань рослин спричиняють бактерії [24].

Так, у роботі [35] автори визначали антимікробну активність рамноліпідів *P. aeruginosa* B5 щодо фітопатогенів *E. carotovora* pv *carotovora*, *Ralstonia solanacearum* та *X. campestris* pv *vesicatoria*, які вражають більшість сільськогосподарських рослин. Встановлено, що мінімальні інгібуючі концентрації рамноліпідів щодо вищенаведених тест-культур становили 50 мг/мл.

Таким чином, рамноліпіди, синтезовані представниками роду *Pseudomonas* на промислових відходах, є більш ефективними щодо фітопатогенних грибів, у порівнянні з поверхнево-активними речовинами, отриманими на традиційних субстратах. Крім цього, показано можливість використання рамноліпідів щодо фітопатогенних бактерій.

Узагальнені літературні дані щодо антимікробної активності рамноліпідів щодо фітопатогенних грибів

Продуцент	Джерело вуглецю	Фітопатогенні тест-культури	Антимікробна активність розчину рамноліпідів	Література
Мінімальна інгібуюча концентрація (мкг/мл)				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B5	н.н.*	<i>Phytophthora capsici</i>	10	[35]
		<i>Cladosporium cucumerinum</i> , <i>Colletotrichum orbiculare</i>	25	
		<i>Alternaria mali</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cercospora kikuchii</i> , <i>Cylindrocarpon destructans</i> , <i>Didymella bryoniae</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f sp <i>cucumerinum</i> , <i>Magnaporthe grisea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	50	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	Відпрацьовані жирні кислоти (5%, об'ємна частка)	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	18	[43]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2	Суміш відпрацьованих олій (40 г/л)	<i>Penicillium funiculosum</i> CECE 2914	16	[44]
		<i>Gliocadium virens</i> ATCC 4645	32	
		<i>Chaetonium globosum</i> ATCC 6205	64	
		<i>Fusarium solani</i>	75	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	Соапсток (2%, об'ємна частка)	<i>Alternaria alternata</i>	4	[45]
		<i>Chaetonium globosum</i> ATCC 6205, <i>Gliocadium virens</i> ATCC 9645, <i>Penicillium crysogenum</i> CECT 2802	32	
		<i>Penicillium funiculosum</i> CECT 2914	64	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	н.н.	<i>Phytophthora cryptogea</i> PD2009	25	[38]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS9	н.н.	<i>Colletotrichum falcatum</i>	100	[36]
Показник інгібування зони росту				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IGB 83	н.н.	<i>Phytophthora capsici</i> , <i>Phytophthora nicotianae</i> KACC 40906, <i>Phytophthora infestans</i> KACC	80%	[37]

			40718, <i>Pythium aphanidermatum</i> KACC 40156		
			<i>Pythium ultimum</i> KACC 40705	90%	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 41B	н.н.		<i>Botrytis cinerea</i> T4	100%	[39]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ZJU211	Рапсова олія (6%, об'ємна частка)		<i>Fusarium graminearum</i>	11,9%	[47]
			<i>Mucor circinelloides</i>	31,4%	
			<i>Mucor spp</i>	41,7%	
			<i>Botrytis cinerea</i>	42,2%	
			<i>Fusarium oxysporum</i>	77,6%	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS9	Глюкоза		<i>Fusarium sacchari</i>	62,3%	[40]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SS14	Глюкоза (2%, об'ємна частка)		<i>Fusarium verticillioides</i> FS7	82%	[41]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ZJU211	Рапсова олія (6%, об'ємна частка)		<i>Mucor circinelloides</i> CCTCC M210113	58%	[48]
			<i>Verticillium dahliae</i> ATCC 7611	73%	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 41B	Сахароза (30 г/л)		<i>Botrytis cinerea</i> B630	54%	[42]

*Примітка: н.н. – не наведено.

Софороліпіди – це низькомолекулярні поверхнево-активні речовини гліколіпідної природи, що містять дисахарид софорозу, поєднаний глікозидним зв'язком з передостаннім атомом вуглецевого ланцюга жирної кислоти C₁₆–C₁₈, та здебільшого синтезуються дріжджами – представниками родів *Candida* та *Rhodotorula*. Софороліпіди успішно знайшли застосування у багатьох промислових секторах (біоремедіація та ін.), що обумовлює перспективність їх використання. Крім цього, ці метаболіти проявляють антимікробну активність щодо різноманітних мікроорганізмів [56-59].

Софороліпіди вперше відкрив Spencer у 1954 році [49], а впродовж наступних років безліч авторів встановили їх структуру, показали, що їх було отримано у вигляді суміші типу лактону та кислоти та досягли їх максимального синтезу у кількості більше 300 г/л [50-53]. Окрім цього, показана можливість синтезу софороліпідів на таких відновлюваних ресурсах як молочна сироватка [54]. Однак, антимікробна активність таких метаболітів була встановлена лише щодо фітопатогенних грибів для софороліпідів, отриманих на традиційних субстратах, таких як глюкоза [55-58], на відміну від даних щодо рамноліпідів, синтез яких здійснювали на середовищі з промисловими відходами.

Незважаючи на перспективність використання таких метаболітів, у доступній літературі робіт з вивчення їх дії щодо фітопатогенів вкрай мало.

Так, на початку XXI століття Kim зі співавторами у роботі [55] показали ефективність софороліпідів, синтезованих *S. bombicola* ATCC 22214 у середовищі з глюкозою (100 г/л), щодо збудника сірої гнилі рослин, серед яких як сільськогосподарські (бобові, буряк, салат), так і декоративні (троянди, гладіолуси), методом дифузії в агар. Встановлено, що за ефективною концентрації ПАР 300 ppm (проміле) діаметр росту *B. cinerea* KSTC 6973 становив 3,2 см, що відповідає 57% пригнічення росту, і був менший у порівнянні з контролем – 4,9 см.

Встановлено, що представники родів *Pythium* та *Phytophthora* є збудниками ґрунтової хвороби коріння багатьох сільськогосподарських

рослин, в числі яких помідори. Так, у статті [37] антимікробну активність софороліпідів *S. bombicola* ATCC 22214 визначали за інгібуванням фітопатогенів родів *Pythium* (*P. aphanidermatum* КАСС 40156, *P. ultimum* КАСС 40705) та *Phytophthora* (*P. capsici*, *P. nicotianae* КАСС 40906, *P. infestans* КАСС 40718). Автори показали, що лише при 100 мг/мл спостерігалось пригнічення *P. ultimum* КАСС 40705 на 90%, у той час як за вп'ятеро більшої концентрації інгібування інших тест-культур становило 80%.

Yuan зі співавторами у роботі [56] встановили ефективність софороліпідів, синтезованих *Wickerhamiella domercqiae* Y2A у середовищі глюкозою (80 г/л), щодо фітопатогенів родів *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis* та *Mucor*, які викликають плісняву яблук, груш, апельсинів, персиків та фініків. Так, за ефективної концентрації софороліпідів 10 г/л інгібування вищезазначених фітопатогенних тест-культур становило 95,8-100%.

Інші дослідники у роботі [57] показали ефективність софороліпідів, синтезованих *W. domercqiae* Y2A у середовищі глюкозою (8%, об'ємна частка) щодо фітопатогенів роду *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. concentricum*, *Fusarium* sp.), а також *R. solani*, *Pyricularia oryzae*, *P. ultimum*, *P. infestans* та *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Так, за ефективної концентрації ПАР 10 мг/мл інгібування росту вищезазначених тест-культур становило 68,16-98,12%. Крім цього, автори зазначили, що інгібування збудника фітофторозу картоплі *P. infestans* залежить від рН середовища. Встановлено, що зі зниженням рН з 8 до 4 протягом 2-5 днів пригнічення фітопатогену було вищим і становило 80,41-83,33%, у порівнянні з наявністю нейтрального середовища (77,33%-80,65%).

Відомо, що збудниками антракнозу суниці, фузаріозу помідорів та мішенеподібної плямистості огірків є *S. gloeosporioides*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, та *Corynespora cassiicola*, які вражають стебла та листя рослин, їх судинну систему, викликаючи загибель. Так, дослідники у роботі [58] визначали антимікробну активність софороліпідів, синтезованих

Rhodotorula babjevae YS3 у середовищі з глюкозою (10%, об'ємна частка), щодо вищезазначених фітопатогенів за показником мінімальної інгібуючої концентрації. Автори зазначили, що МІК софороліпідів щодо цих тест-культур становили 62, 125, 125 та 2000 мкг/мл відповідно.

Узагальнена інформація щодо антимікробної активності софороліпідів проти фітопатогенних грибів наведена в таблиці 1.4.

Отже, встановлено можливість використання софороліпідів, синтезованих на традиційних субстратах, у боротьбі з фітопатогенами рослин грибного та бактеріального походження. Однак незважаючи на те, що використання таких метаболітів є досить перспективним, у доступній літературі робіт з вивчення їх дії щодо фітопатогенів вкрай мало.

Узагальнені літературні дані щодо антимікробної активності софороліпідів проти фітопатогенних грибів

Продуцент	Джерело вуглецю	Фітопатогенні тест-культури	Антимікробна активність розчину софороліпідів	Література
Показник інгібування зони росту, %				
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	н.н.*	<i>Phytophthora capsici</i> , <i>Phytophthora nicotianae</i> КАСС 40906, <i>Phytophthora infestans</i> КАСС 40718, <i>Pythium aphanidermatum</i> КАСС 40156	80	[37]
		<i>Pythium ultimum</i> КАСС 40705	90	
<i>Wickerhamiella domercqiae</i> Y2A	Глюкоза (80 г/л)	<i>Aspergillus niger</i>	95,8	[56]
		<i>Botrytis cinerea</i>	96,9	
		<i>Penicillium</i>	97,3	
		<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Mucor</i>	100	
<i>Wickerhamiella domercqiae</i> Y2A	Глюкоза (8%, об'ємна частка)	<i>Fusarium concentricum</i>	68,16	[57]
		<i>Fusarium oxysporum</i>	69,70	
		<i>Fusarium</i> sp.	71,27	
		<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	73,06	
		<i>Phytophthora infestans</i>	74,98	
		<i>Rhizoctonia solani</i>	87,05	
		<i>Pyricularia oryzae</i>	89,50	
		<i>Pythium ultimum</i>	98,12	
Мінімальна інгібуюча концентрація (мкг/мл)				
<i>Rhodotorula babjevae</i> YS3	Глюкоза (10%, об'ємна частка)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	62	[58]
		<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>sp. pisi</i>	125	
		<i>Corynespora cassiicola</i>	2000	

*Примітка: н.н. – не наведено

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти досліджень

Основним об'єктом досліджень був виділений нами з забрудненого нафтою зразка ґрунту штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 [59]. Штам ЕК-1 зареєстрований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України за номером ІМВ Ас-5017. За хімічною природою позаклітинні ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 є комплексом гліко- (трегалозомоно- і диміколати), нейтральних (цетиловий спирт, пальмітинова кислота, метиловий ефір н-пентадеканової кислоти, міколові кислоти) і фосфоліпідів (фосфатидилгліцерин, фосфатіділетаноламін) [60].

Як тест-культури під час визначення антимікробної та антиадгезивної активності ПАР, а також їх ролі у руйнуванні біоплівки використовували штами бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas* sp. МІ-2) і дріжджів (*Candida albicans* Д-6, *Candida utilis* БВС-65) з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

2.2. Культивування продуцента поверхнево-активних речовин

Штам-продуцент ПАР вирощували у рідкому середовищі (г/л): NaNO_3 – 1,3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, NaCl – 1,0, Na_2HPO_4 – 0,6, KH_2PO_4 – 0,14, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001, рН 6,8–7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовували етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували культуру в експоненційній фазі, вирощену у середовищі наведеного складу з 0,5% етанолу. Інокулят, в якому чисельність бактерій становила 10^4 – 10^5 кл/мл, вносили у кількості 10% від

					НУХТ БТЕК 04.01.03 ДР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Ярова Г.А.					33	5
Перевір.		Пирог Т.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		

об'єму середовища.

Бактерії *Escherichia coli* IEM-1, вирошені на м'ясо-пептонному агарі (МПА) упродовж 14 год, або *Bacillus subtilis* БТ-2, вирошені на МПА упродовж 14 і 24 год, суспендували в 100 мл стерильної водопровідної води і вносили 2,5 мл суспензії на 100 мл середовища культивування продуцента ПАР у лаг- і експоненційній фазі росту. Інактивовані клітини (стерилізацією в автоклаві при 131°C упродовж 1 год) вносили з розрахунку 10 мл суспензії на 100 мл поживного середовища.

Культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за наявності *E. coli* IEM-1 і *B. subtilis* БТ-2 і без бактерій-індукторів здійснювали у 750 мл колбах з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30°C упродовж 5 діб.

2.3. Визначення концентрації поверхнево-активних речовин

Кількість позаклітинних ПАР визначали, використовуючи модифікований нами метод Блайя і Дайєра [61] після екстракції їх сумішню хлороформу і метанолу (2:1) з супернатанту культуральної рідини. Для отримання супернатанту культуральну рідину центрифугували при 5000 g упродовж 20 хв.

Оскільки *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 синтезує комплекс полярних і неполярних ліпідів, а відомий метод Блайя і Дайєра [61], використовуваний для виділення ПАР, дає змогу виділяти в основному неполярні ліпіди, ми модифікували класичну систему розчинників (суміш Фолча) додаванням до неї 1 М НСІ (хлороформ – метанол – вода = 4:3:2). Така система дозволяє максимально повно виділяти як полярні, так і неполярні ліпіди.

У циліндричну ділильну лійку об'ємом 100 мл поміщали 25 мл супернатанту, додавали 1 н розчин НСІ для досягнення рН 4,0–4,5 (близько 5 мл), воронку закривали шліфованої пробкою і струшували 3 хв, потім додавали 15 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і струшували (екстрагування ліпідів) протягом 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишали в ділильній воронці для поділу фаз, після чого нижню фракцію зливали (органічний екстракт 1), а водну фазу піддавали повторній

екстракції. При повторній екстракції до водної фази додавали 1 н розчин HCl для досягнення рН 4,0-4,5 (близько 5 мл), 15 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і екстрагували ліпіди протягом 5 хв. Після поділу фаз зливали нижню фракцію, отримуючи органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додавали 25 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і здійснювали екстракцію, як описано вище, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1-3 об'єднували і упарювали на роторному випарнику IP-1M2 при 50 °C і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

У дослідженнях як препарати використовували розчини поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 різної концентрації (3–192 мкг/мл). Для цього сухий залишок ПАР розчиняли в стерильному фосфатному буфері (0,1 М, рН 7,0) до вихідного об'єму (25 мл) і далі розводили цим буфером до необхідної концентрації. Розчини ПАР стерилізували в автоклаві при 112 °C впродовж 30 хв.

2.4. Визначення біологічних властивостей поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017

2.4.1. Дослідження антимікробної активності ПАР

Антимікробну активність поверхнево-активних речовин аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) [62]. Визначення МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій і рідкому суслі для дріжджів. У стерильних умовах у 10 пробірок вносили по 1 мл середовища, у першу додавали 1 мл розчину ПАР певної концентрації, після чого перемішували, відбирали 1 мл і переносили у наступну пробірку. Аналогічно проводили розведення для наступних дев'яти пробірок. З останньої пробірки відбирали 1 мл. Таким чином, кінцевий об'єм у кожній пробірці становив 1 мл (МПБ чи сусло і розчин поверхнево-активних речовин), а концентрація ПАР у кожній наступній пробірці знижувалася у 2 рази. Як контроль використовували 1 мл МПБ (для бактерій) або сусла (для дріжджів) без додавання розчину ПАР. Далі у кожну з пробірок вносили по 0,1 мл суспензії тест-культур (10^5 – 10^6

КУО/мл) та перемішували. Пробірки інкубували впродовж 24 год при 28–30 °С для бактерій та 24–26 °С для дріжджів. Результати оцінювали візуально за помутнінням середовища: (+) – пробірки, в яких спостерігали помутніння середовища (ріст тест-культури), (–) – помутніння не було (ріст відсутній). Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину ПАР визначали як концентрацію ПАР в останній пробірці, де ріст був відсутній.

2.4.2. Визначення антиадгезивної активності ПАР

Антиадгезивну активність ПАР визначали як описано у роботі [63]. Однакові пластинки (1 см²) досліджуваних матеріалів попередньо очищали мийним засобом, ополіскували дистильованою водою, висушували на повітрі та стерилізували (сталі пластини, кахель – при 121 °С, пластик, лінолеум – при 112 °С упродовж 30 хв). Після стерилізації пластини обробляли розчином ПАР (у контрольному варіанті – стерильним фосфатним буфером) та витримували при 30 °С протягом 18–24 год. Далі контрольні і попередньо оброблені препаратами ПАР матеріали ополіскували стерильним фосфатним буфером або дистильованою водою для видалення залишку препаратів.

Тест-культури мікроорганізмів суспендували у 100 мл стерильної водопровідної води, у суспензію поміщали попередньо оброблені і не оброблені (контрольні) матеріали і витримували 2 год при 30 °С. Контрольні і попередньо оброблені матеріали ополіскували фосфатним буфером, щоб змити неадгезовані клітини. Матеріали з адгезованими на них клітинами залишали до висихання на повітрі, після чого адгезовані клітини фіксували, поміщаючи матеріал спочатку у метанол (99 %) на 15 хв і фарбували у 1 % розчині генціанвіолету 5 хв. Пластини матеріалу ополіскували водопровідною водою і залишали при кімнатній температурі до висихання. Далі адгезовані клітини з барвником змивали з поверхні матеріалів 1 мл льодової оцтової кислоти, вносили 9 мл дистильованої води і вимірювали оптичну густину отриманої суспензії на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм.

Кількість адгезованих клітин визначали як відношення оптичної

густини суспензії, отриманої після оброблення матеріалів препаратами ПАР, до оптичної густини суспензії, отриманої після оброблення матеріалів фосфатним буфером (контроль), і виражали у відсотках.

2.4.3. Дослідження ступеня деструкції біоплівки за дії ПАР

Визначення впливу ПАР на руйнування біоплівки здійснювали як описано у роботі [64]. Для формування біоплівки у полістиролові мікропланшети вносили 180 мкл МПБ чи рідкого суслу та 20 мкл суспензії однодобової тест-культури, інкубували упродовж 24 год при оптимальній для тест-культури температурі, після чого зливали культуральну рідину і вносили 180 мкл свіжого МПБ чи суслу і 20 мкл суспензії тест-культури і ще інкубували впродовж наступних 24 год. Через 48 год культуральну рідину зливали, а в лунки мікропланшета (з попередньо сформованою на них біоплівкою тест-культури вносили по 200 мкл препаратів ПАР різної концентрації. У контрольні варіанти (лунки) замість препаратів ПАР вносили стерильну водопровідну воду (200 мкл). Через 24 год експозиції лунки тричі промивали 200 мкл дистильованої води і визначали кількість адгезованих клітин спектрофотометричним методом. Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених ПАР лунках полістиролового планшета.

Усі досліди проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали, як описано раніше [4]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

**РОЗДІЛ 3. БІОЛОГІЧНА ДІЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ
РЕЧОВИН *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ІМВ АС-5017,
СИНТЕЗОВАНИХ ЗА НАЯВНОСТІ БАКТЕРІАЛЬНИХ ІНДУКТОРІВ**

3.1. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин

***Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017**

Встановлено, що представники роду *Rhodococcus*, здатні до синтезу поверхнево-активних речовин, яким притаманна антимікробна активність. Однак відомості про таку біологічну активність є небагато чисельними, що може бути обумовлено нижчою, порівняно з іншими ПАР, антимікробною активністю. Так, зокрема, гліколіпіди, синтезовані *R. erythropolis* проявляють антимікробну дію щодо деяких грампозитивних і грамнегативних бактерій (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp., *Salmonella* spp. *Corynebacterium* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*), а також патогенних грибів (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*) [65]. При цьому зони затримки росту тест культур за дії таких гліколіпідів (концентрація не наведена) становили лише 3-4 мм.

У роботі [66] було показано ефективність метаболітів, синтезованих *R. fascians* BD8, щодо представників родів *Enterococcus* (*E. hirae* ATCC 10541, *E. faecalis* JA/3, *E. faecalis* ATCC 29212), *Escherichia* (*E. coli* 17-2, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 25922), *Proteus* (*P. vulgaris* ATCC 27973, *P. mirabilis* ATCC 21100), *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* SC5314) та інших (*Staphylococcus epidermidis* КСТС 1917, *Vibrio harveyi* ATCC 14126). Встановлено, що за концентрацій трегалозоліпідів 0,035-0,5 мг/мл інгібування росту вищенаведених тест-культур становило від 1 до 95%. При цьому автори зазначили, що найбільший антимікробний ефект спостерігався за найвищої (0,5 мг/мл) концентрація.

					НУХТ БТЕК 04.01.03 ДР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. БІОЛОГІЧНА ДІЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ІМВ АС- 5017, СИНТЕЗОВАНИХ ЗА НАЯВНОСТІ БАКТЕРІАЛЬНИХ ІНДУКТОРІВ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Ярова Г.А.					38	13
Перевір.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Тим не менше існують відомості, що антимікробну активність деяких метаболітів можна підвищити за рахунок внесення у середовище культивування продуцента конкурентних мікроорганізмів [68-70]. Це пов'язано з тим, що внаслідок імітації існування мікроорганізмів у складній мікробній спільноті та конкуренції, що між ними виникає, відбувається індукція синтезу або активності метаболітів [67].

Так, у роботі [68] автори зазначили, що спільне культивування представників роду *Lactobacillus* (*L. acidophilus* N2 та *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797) супроводжувалось синтезом бактеріоцину (лактацину В) з підвищеною активністю.

Інші автори у статті [69] встановили антимікробну активність антибіотику, синтезованого *Streptomyces endus* S-522 за наявності у середовищі культивування *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596, щодо деяких тест-культур (*B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*) при цьому МІК антибіотику щодо вищезазначених мікроорганізмів становили 40-50 мкг/мл. Автори зазначили, що при культивуванні за відсутності індуктора синтезований антибіотик не володіє антимікробною активністю щодо вищенаведених тест-культур.

Індукцію синтезу макролідних антибіотиків описано у роботі [70]. Так, авторами показано, що за спільного культивування представників роду *Penicillium* (*P. fuscum* та *P. camembertii/clavigerum*) відбувається синтез антибіотиків, мінімальні інгібуючі концентрації яких щодо представників родів *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. anthracis*), *Candida* (*C. glabrata*, *C. albicans*) та інших (*Staphylococcus aureus* 13709, *Streptococcus pyogenes*) становили 1-64 мкг/мл. Однак дані про антимікробну активність цих метаболітів, синтезованих за відсутності індуктора, авторами не наведено.

У табл. 3.1 наведено дані щодо антимікробної дії поверхнево-активних речовин штаму ІМВ Ас-5017, синтезованих у середовищі з бактеріальними індукторами, щодо ряду бактеріальних тест-культур.

Результати досліджень показали, що внесення клітин *E. coli* IEM-1 та *B. subtilis* БТ-2 у середовище культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 супроводжувалося синтезом ПАР з підвищеною антимікробною активністю. Так, з огляду на наведені у табл. 3.1 дані, можна зробити висновок, що незалежно від фази внесення клітин індукторів (початок культивування, експоненційна фаза), їх стану (живі, інактивовані) і фізіології (вегетативні, споріві клітини), спостерігали синтез поверхнево-активних речовин, мінімальні інгібуючі концентрації яких щодо досліджуваних бактеріальних тест-культур *E. coli* IEM-1, *B. subtilis* БТ-2 та *S. aureus* БМС-1 становили 3-12 мкг/мл та були на порядок нижчими, порівняно з МІК ПАР, одержаних у процесі культивування без індукторів.

Тим не менше, з точки зору реалізації процесу доцільніше використовувати живі клітини індукторів, внесені на початку процесу культивування, що дасть змогу зекономити ресурси виробництва та уникнути можливої контамінації.

Варто зазначити, що у доступній літературі нам не вдалося знайти інформацію про підвищення антимікробної активності ПАР, синтезованих представниками роду *Rhodococcus* за внесення конкурентних мікроорганізмів. Однак є відомості про посилення біологічної активності поверхнево-активних ліпопептидів [71]. Встановлено, що спільне культивування представників роду *Bacillus* (*Bacillus* sp.S3, *B. pumilus* S8, *B. licheniformis* D1) та *Serratia marcescens* V1 з патогенними бактеріями (*Pseudomonas aeruginosa* PA, *Bacillus pumilus* BP) та грибами (*Candida albicans* CA, *Yarrowia lipolytica* YL) супроводжувалось синтезом ліпопептидів з підвищеною антимікробною активністю. Так, наприклад, при застосуванні ліпопептидів, синтезованих за наявності *P. aeruginosa* PA та *B. pumilus* BP, зони пригнічення росту вищенаведених тест-культур досягали 23 мм. Автори зазначили, що при використанні ліпопептидів, синтезованих монокультурами продуцентів, не спостерігали пригнічення росту тест-

культури *Y. lipolytica* YL, у той час як за використання ПАР, отриманих у середовищі з індукторами, зони затримки росту становили 15-19 мм.

Антимікробна активність ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, синтезованих за наявності конкурентних мікроорганізмів

Конкурентний мікроорганізм (індуктор)	Стан клітин індуктора	Фаза росту <i>R. erythropolis</i> ІМВ Ас-5017, в якій вносили індуктор	Мінімальні інгібуючі концентрації (мкг/мл) щодо			
			<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спори)	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (вегетативні)
Контроль (без індуктора)	–	–	48	48	96	48
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спорова культура)	Живі	Лаг-фаза	3	6	3	6
		Експоненційна	3	12	3	12
	Інактивовані	Лаг-фаза	6	3	3	6
		Експоненційна	3	3	3	6
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	Живі	Лаг-фаза	6	6	6	6
		Експоненційна	3	3	6	6
	Інактивовані	Лаг-фаза	6	3	3	6
		Експоненційна	3	6	6	3
<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	Живі	Лаг-фаза	6	3	3	12
		Експоненційна	6	6	6	6
	Інактивовані	Лаг-фаза	6	3	6	6
		Експоненційна	3	3	6	6

Примітка. Під час визначення мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5 %. $P \leq 0,05$ відносно контролю (мінімальна інгібуюча концентрація ПАР, синтезованих у процесі культивування штаму ІМВ В-7241 на середовищі без індукторів).

3.2. Руйнування біоплівки за дії поверхнево-активних речовин, отриманих за наявності бактерій-індукторів

Окрім антимікробної активності, поверхнево-активні речовини, синтезовані *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, здатні до деструкції біоплівки. Так, раніше було показано здатність таких ПАР до руйнування бактеріальних (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1) та дріжджових (*Candida albicans* Д-6, *Candida utilis* ЕІ-8) біоплівок [4]. При цьому деструкція біоплівок *B. subtilis* БТ-2 та *E. coli* ІЕМ-1 становила 40-73% та 31-53% відповідно (ефективна концентрація ПАР 8 та 64 мкг/мл відповідно). У свою чергу, ступінь руйнування біоплівок *C. albicans* Д-6 та *C. utilis* ЕІ-8 за аналогічних концентрацій ПАР становив 55-65% та 55-60% відповідно.

Припустили, що ступінь руйнування біоплівок можна підвищити за рахунок використання поверхнево-активних речовин, отриманих за наявності бактерій-індукторів (табл.3.2-3.4).

Аналіз результатів наведених у табл. 3.2 показав, що ступінь руйнування біоплівки *B. subtilis* БТ-2 за дії поверхнево-активних речовин, отриманих за наявності індукторів не залежав від стану клітин індуктора, фази їх внесення і був досить високим, як за використання максимальної (192 мкг/мл) концентрації ПАР (ступінь руйнування 70-93,2%), так і досить низьких (3-6 мкг/мл) концентрацій (ступінь руйнування біоплівки до 72%).

В той же час, при зменшенні концентрації ПАР до 3-6 мкг/мл, ступінь руйнування біоплівки *C. utilis* БВС-65 також зменшувався і становив в середньому 41 % (табл. 3.3). Ймовірно внесення бактеріальних індукторів посилює руйнування біоплівки відповідно бактеріальних тест-культур.

Щодо дії поверхнево-активних речовин на інші мікроорганізми, то для різних тест-культур спостерігали відповідно різні ефективні концентрації (табл. 3.4). Так ПАР, синтезовані за наявності грампозитивного індуктора *B. subtilis* БТ-2, виявились ефективними щодо грампозитивної тест-культури *S. aureus* БМС-1 (ступінь руйнування біоплівки досягав 54,6%), а при дії ПАР, отриманих у середовищі з *E. coli* ІЕМ-1, руйнування біоплівок

грамнегативних *E. coli* IEM-1 та *Pseudomonas* sp. MI-2 становило 71,6% та 64,3% відповідно. При цьому ефективна концентрація поверхнево-активних речовин була у межах 3-25 мкг/мл. Руйнування біоплівки дріжджової тест-культури *C. albicans* Д-6 відбувалось за значно вищої концентрації – 50 мкг/мл. Причому за внесення живих клітин бактеріальних індукторів спостерігали дещо вищий ступінь руйнування біоплівки (54,2-56,2%), у порівнянні з інактивованими (48,6-52,7%).

У доступній літературі нам вдалося знайти інформацію про здатність гліколіпідів, синтезованих *Rhodococcus ruber* IEGM 231 без індукторів, до деструкції біоплівок [72], при цьому ефективна концентрація таких ПАР була дуже високою і становила 1000 мг/л (руйнування біоплівок *Arthrobacter simplex* IEGM 667, *Bacillus subtilis* ATCC 6613, *Brevibacterium linens* IEGM 1830, *Corynebacterium glutamicum* IEGM 1861, *Escherichia coli* K-12, *Micrococcus luteus* IEGM 401, *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 9046 на 4,5-57,2%) і лише одну роботу про можливість підвищення ступеня руйнування біоплівок, поверхнево-активних гліколіпідів, внесенням у середовище культивування продуцента конкурентних мікроорганізмів. Так, у роботі [73] дослідники встановили що гліколіпіди, синтезовані *Staphylococcus lentus* SZ2 за наявності *Vibrio harveyi*, є ефективнішими щодо *Vibrio harveyi*, порівняно з ПАР, отриманими у середовищі без індуктора. При цьому здатність до деструкції біоплівки тест-культури визначали протягом 6-72 год. Встановлено, що ступінь деструкції біоплівки *V. harveyi* за дії ПАР, синтезованих за наявності індуктора, був вищим і становив 42,43-83,95%, у той час як за обробки ПАР, отриманих без індуктора, відбулось руйнування біоплівки тест-культури на 11,84-82,69%.

Підсумовуючи вищеописане, можна зробити висновок, що існує можливість посилення здатності ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 до деструкції біоплівок мікроорганізмів шляхом внесення у середовище культивування біологічних індукторів.

Вплив ПАР, синтезованих за наявності у середовищі культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 конкурентних мікроорганізмів, на руйнування біоплівки *Bacillus subtilis* БТ-2

Індуктор	Стан клітин індуктора	Фаза росту <i>R. erythropolis</i> ІМВ Ас-5017, в якій вносили індуктор	Деструкція біоплівки (%) за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)						
			192	96	48	24	12	6	3
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	Живі вегетативні	Лаг-фаза	92,1	87,5	79,1	74,1	72,9	71,1	64,1
		Експоненційна	88,7	82,4	75,1	74,4	73,4	72,9	65,4
	Інактивовані вегетативні	Лаг-фаза	82,5	78,3	74,5	69,9	67,7	65,8	60,5
		Експоненційна	84,5	74,4	71,1	64,0	62,5	60,5	60,8
	Спорові	Лаг-фаза	93,9	90,5	84,1	75,0	72,9	72,0	70,2
		Експоненційна	92,1	86,7	80,4	78,8	70,8	67,8	62,5
	Інактивовані спорові	Лаг-фаза	89,2	87,4	80,5	75,5	71,8	65,9	63,7
		Експоненційна	88,4	79,3	79,1	73,3	69,1	64,8	63,0
<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	Живі	Лаг-фаза	70,0	75,1	69,1	67,9	65,4	63,1	60,4
		Експоненційна	81,6	77,0	72,6	66,6	61,2	60,7	58,7
	Інактивовані	Лаг-фаза	75,8	70,9	68,4	67,5	64,9	59,2	56,1
		Експоненційна	83,2	74,1	68,7	68,3	63,5	60,8	57,5
Без індуктора		–	65,0	63,7	62,7	59,1	57,4	50,1	48,1

Примітки. Табл. 2–4: під час визначення ступеня руйнування біоплівки похибка не перевищувала 5 %. $P \leq 0,05$ відносно контролю (деструкція біоплівки за дії ПАР, синтезованих у процесі культивування штаму ІМВ В-7241 на середовищі без індукторів).

Таблиця 3.3

Руйнування біоплівки *Candida utilis* БВС-65 під впливом ПАР, синтезованих за наявності у середовищі культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 клітин *Bacillus subtilis* БТ-2

Клітини індуктора	Фаза росту <i>R. erythropolis</i> ІМВ Ас-5017, в якій вносили індуктор	Деструкція біоплівки (%) за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)						
		192	96	48	24	12	6	3
Веgetативні	Лаг-фаза	87,2	66,7	65,8	63,9	59,4	56,9	43,0
	Експоненційна	81,6	64,4	57,1	55,1	52,8	44,7	44,4
Інактивовані вегетативні	Лаг-фаза	88,6	64,4	62,8	56,9	55,7	50,6	43,3
	Експоненційна	88,6	61,7	57,7	52,8	48,9	44,7	40,9
Спорові	Лаг-фаза	77,8	69,4	65,8	65,3	56,9	48,4	44,6
	Експоненційна	78,0	62,5	60,9	60,1	59,7	56,9	44,4
Інактивовані спорові	Лаг-фаза	71,1	59,7	56,9	54,7	48,9	43,3	42,7
	Експоненційна	76,1	67,8	66,7	61,1	59,7	56,7	42,8
Без індуктора	–	60,8	52,7	50,0	48,6	41,7	42,1	37,5

Деструкція бактеріальних і дріжджових біоплівки за наявності ПАР, синтезованих в різних умовах культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017

Тест-культура	*Концентрація ПАР, мкг/мл	Руйнування біоплівки за дії ПАР, синтезованих без індуктора, %	Деструкція біоплівки (%) за дії ПАР, утворених за наявності клітин індукторів					
			<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (вегетативні)		<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (споріві)		<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	
			живі	інактивовані	живі	інактивовані	живі	інактивовані
<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	3	31,9	54,6	50,8	48,9	50,6	40,6	39,4
<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2	25	39,3	55,9	54,8	59,6	58,3	64,3	62,7
<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	6	35,1	43,7	45,3	46,9	44,2	71,6	68,3
<i>Candida albicans</i> Д-6	50	32,5	54,2	48,6	55,5	49,2	56,2	52,7

Примітки. Живі та інактивовані клітини індукторів вносили у середовище культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 у лаг-фазі.

* - ефективна концентрація ПАР, що забезпечувала максимальне руйнування біоплівки.

3.3. Вплив бактерій-індукторів на антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017

Окрім описаних вище властивостей, поверхнево-активним речовинам притаманна і антиадгезивна дія. Тому на наступному етапі досліджували антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, синтезованих за присутності конкурентних мікроорганізмів.

Варто зазначити, що у доступній літературі представлено кілька робіт з дослідження антиадгезивної дії поверхнево-активних речовин, синтезованих представниками роду *Rhodococcus*. Так, у роботі [72] описано антиадгезивну активність трегалозоліпідів *Rhodococcus ruber* IEGM 231 щодо бактеріальних тест-культур (*Arthrobacter simplex* IEGM 667, *Bacillus subtilis* ATCC 6613, *Brevibacterium linens* IEGM 1830, *Corynebacterium glutamicum* IEGM 1861, *Escherichia coli* K-12, *Micrococcus luteus* IEGM 401, *Pseudomonas fluorescencens* NCIMB 9046) на полістироловій поверхні. Автори встановили, що при дії ПАР у діапазоні різних концентрацій (0,1-1000 мг/л) адгезія клітин тест-культур у стані спокою становила 3,9-19,9%.

Ефективність трегалозоліпідів, синтезованих *Rhodococcus fascians* BD8, щодо представників родів *Enterococcus* (*E. hirae* ATCC 10541, *E. faecalis* JA/3, *E. faecalis* ATCC 29212), *Escherichia* (*E. coli* 17-2, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 25922), *Proteus* (*P. vulgaris* ATCC 27973, *P. mirabilis* ATCC 21100), *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* SC5314) та інших (*Staphylococcus epidermidis* КСТС 1917, *Vibrio harveyi* ATCC 14126) описано у статті [66]. Так, ПАР у діапазоні концентрацій 0,035-0,5 мг/мл спричиняли інгібування адгезії вищенаведених мікроорганізмів на 10-95%.

Антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 встановили раніше на кафедрі біотехнології та мікробіології [4]. Показано, що за концентрації ПАР 5 мкг/мл адгезія тест-культур *Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1 та *Candida utilis* ЕІ-8 до абіотичних поверхонь (кахель, сталь, лінолеум) становила 15-71%, у той час

як за удесятеро більшої концентрації (50 мкг/мл) ступінь адгезії *Candida albicans* Д-6 й *Aspergillus niger* Р-3 спостерігали у межах 11-47 %.

Зважаючи на інформацію, викладену вище, можна зробити висновок, що антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин представників роду *Rhodococcus*, в тому числі і *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 можна посилити культивуванням продуцента у середовищі з конкурентними мікроорганізмами.

Так, з огляду на дані, представлені у табл. 3.5, можна зробити висновок, що ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 спричиняли ефективну антиадгезивну дію щодо бактеріальної (*S.aureus* БМС-1) та дріжджової (*C. albicans* Д-6) тест-культур у діапазоні менших концентрацій (3-24 мкг/мл), порівняно зі значеннями концентрацій, що зазначені у вищеописаних статтях [4, 62, 63, 66, 73].

Варто зазначити, що за обробки ПАР, отриманих у середовищі з конкурентними мікроорганізмами (*E. coli* ІЕМ-1, *B. subtilis* БТ-2), ступінь адгезії вищезазначених тест-культур до різних поверхонь (кахель, сталь, скло) був нижчий (7-39%), у порівнянні з показниками адгезії за обробки ПАР, отриманих за відсутності індукторів (33-87%).

Прикріплення дріжджових і бактеріальних клітин до абіотичних поверхонь після обробки поверхнево-активними речовинами, синтезованими за наявності конкурентних мікроорганізмів

Інактивовані клітини індуктора	Концентрація ПАР, мкг/мл	Адгезія (%) <i>Candida albicans</i> Д-6			Адгезія (%) <i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1		
		кахель	сталь	скло	кахель	сталь	скло
<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	24	13	7	24	32	23	33
	12	10	15	17	33	27	31
	6	10	15	10	34	33	23
	3	8	11	7	24	38	23
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	24	10	11	10	39	39	33
	12	16	15	17	29	29	26
	6	20	16	17	25	26	23
	3	32	19	21	29	21	20
Без індуктора	24	42	33	38	50	43	41
	12	49	37	55	54	45	42
	6	58	58	66	60	52	43
	3	87	76	83	72	64	46

Примітка. Інактивовані клітини бактерій-індукторів вносили у лаг-фазі (на початку процесу культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017). Під час визначення адгезії похибка не перевищувала 5 %. $P \leq 0,05$ відносно контролю (адгезія після обробки поверхонь ПАР, синтезованими у процесі культивування штаму ІМВ В-7241 на середовищі без індукторів)

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 4. ДІЛЯНКА ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА БІОСИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCUS* *ERYTHROPOLIS* ІМВ АС-5017 ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЧИСЕЛЬНОСТІ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ

4.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Незважаючи на переваги мікробних ПАР, істотним недоліком залишається висока вартість виробництва препаратів. Перш за все, це зумовлено цінами на поживні середовища для культивування мікроорганізмів. Таким чином, доцільно вирішувати у промислових масштабах цю проблему шляхом пошуку штамів-продуцентів, які при рості на дешевих та доступних середовищах дають високий вихід ПАР.

Для порівняння описаного в розділі 2 штаму ІМВ Ас-5017 з іншими представниками роду *Rhodococcus* було обрано таких продуцентів ПАР: *Rhodococcus erythropolis* SD-74, *Rhodococcus ruber* IEGM 231 та *Rhodococcus soli* 102-Na5 [74-76]. Для обґрунтування вибору біологічного агента були обрані саме ці штами завдяки їхній здатності синтезувати поверхнево-активні речовини на різних вуглецевих субстратах за різної тривалості процесу (72-168 год), крім цього, інформація про них з'явилась в останні роки. Продуцентів порівнювали за тривалістю утворення продукту, його концентрацією та аналізували особливості технологічного процесу.

Дані, наведені у табл. 4.1. показують, що найбільшу концентрацію ПАР (2 г/л) упродовж всього 72 год синтезував штамп 102-Na5, проте, середовище для культивування було дороговартісним та складним. Концентрація ПАР, синтезованих *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, *R. erythropolis* SD-74, *R. ruber* IEGM 231 була досить близькою (1,4-1,6 г/л), тому лише на основі даних

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.01.03 ДР ПЗ			
Розроб.		Ярова Г.А.			РОЗДІЛ 4. ДІЛЯНКА ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА БІОСИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО- АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>RHODOCOCCUS</i> <i>ERYTHROPOLIS</i> ІМВ АС-5017 ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЧИСЕЛЬНОСТІ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пирог Т.П.					51	73
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

табл. 4.1. ми не можемо обрати найефективнішого біологічного агента. Оскільки склад середовищ і ростових субстратів різний, то відповідно на наступному етапі розраховували їхню вартість (табл.4.2.).

Поживні середовища для культивування *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, *Rhodococcus erythropolis* SD-74, *Rhodococcus ruber* IEGM 231 та *Rhodococcus soli* 102-Na5 з метою одержання поверхнево-активних речовин

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація ПАР, г/л	Тривалість процесу, год	Особливості технологічного процесу	Використана література
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017	Етанол – 15,7 NaNO ₃ – 1,3 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,1 NaCl – 1,0 Na ₂ HPO ₄ – 0,6 KH ₂ PO ₄ – 0,14 FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,001 CaCl ₂ – 0,1	1,6	120	pH 6.8–7.0, t=28-30 ⁰ С.	<i>Pirog TP, Shevchuk TA, Petrenko NM, Paliichuk OI, Iutynska GO.</i> Influence of cultivation conditions of <i>Rhodococcus erythropolis</i> IMV Ac-5017 on the properties of synthesized surfactants // Mikrobiol. Z. – 2018. – 80, 4. – P. 13-27. https://doi.org/10.15407/microbiolj80.04.013 [4].
<i>Rhodococcus erythropolis</i> SD-74	Гас -16 KH ₂ PO ₄ , - 1 K ₂ HPO ₄ , -1 NH ₄ NO ₃ , - 1 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,2 CaCl ₂ ×2H ₂ O – 0,02 FeCl ₃ ×6H ₂ O – 0,05 .	1,5	168	t=20 ⁰ С	<i>Dang N.P., Landfald B., Willassen N.P.</i> Biological surface-active compounds from marine bacteria//Environ. Technol. – 2015. - doi:10.1080/09593330.2015.1103784 [74].
<i>Rhodococcus ruber</i> IEGM 231	n-Гексадекан – 23,2 Дріжджовий екстракт – 0,1 KH ₂ PO ₄ – 2,0 Na ₂ HPO ₄ – 2,0 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 2,0 NaCl – 1,0 KNO ₃ – 1,0 MgSO ₄ x7H ₂ O – 0,2	1,4	168	pH 7.5, t=28 ⁰ С	<i>Ivshina I., Kostina L., Krivoruchko A., Kuyukina M. Peshkur T., Anderson P., Cunningham C.</i> Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in

	<p>CaCl₂×2H₂O – 0,02 FeCl₃×7H₂O – 0,01</p> <p>Мікроелементи: FeCl₃×7H₂O – 0,00015 H₃BO₃ – 0,00001 ZnSO₄×7H₂O – 0,000001 Co(NO₃)₂×6H₂O – 0,000005 CuSO₄×5H₂O – 0,0000005 MnCl₂×4H₂O – 0,0000005</p>				<p>soil spiked with model mixtures of petroleum hydrocarbons and heterocycles using biosurfactants from <i>Rhodococcus ruber</i> IEGM 231// J Hazard Mater. — 2016. /DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.03.007 [75].</p>
<p><i>Rhodococcus soli</i> 102-Na5</p>	<p>Крохмаль – 30 Дріжджовий екстракт – 0,5 (NH₄)₂SO₄ - 10 KCl – 1,1 NaCl – 30,0 FeSO₄ – 0,00028 KH₂PO₄ – 3,4 K₂HPO₄, -4,4 MgSO₄×7H₂O – 0,7</p> <p>Мікроелементи : ZnSO₄ – 0,000145 CaCl₂ – 0,00012 CuSO₄ – 0,000125 MnSO₄ – 0,000085</p>	2,0	72	<p>t=28 °C pH , доводили до 7.0 за допомогою 1 М NaOH та 1 М HCl</p>	<p>Lee D.W., Lee H., Kwon B.O., Khim J.S., Yim U.H., Kim B.S., Kim J.J. Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. // Environ Pollut. – 2018./ DOI: 10.1016/j.envpol.2018.05.070 [76].</p>

Вартість поживних середовищ для культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Rhodococcus erythropolis* SD-74, *Rhodococcus ruber* IEGM 231 та *Rhodococcus soli* 102-Na5

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело* (1,2,3,4,5)	
<i>R.erythropolis</i> IMB Ac-5017	Етанол – 15,1	30	0,453	1	
	NaNO ₃ – 1,3	28	0,0364	<u>2</u>	
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,1	6,8	0,00068	1	
	NaCl – 1,0	1,8	0,0018	1	
	Na ₂ HPO ₄ – 0,6	25	0,015	1	
	KH ₂ PO ₄ – 0,14	47,33	0,0066	3	
	FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,001	6	0,000006	<u>2</u>	
	CaCl ₂ – 0,1	2,3	0,00023	4	
Вартість 1 л середовища становить – 0,514 грн.					
<i>R.erythropolis</i> SD-74	Гас -16,	43,3	0,8	3	
	KH ₂ PO ₄ , - 1 ;	47,33	0,047	3	
	K ₂ HPO ₄ , -1;	50	0,05	<u>2</u>	
	NH ₄ NO ₃ , - 1 ;	12	0,012	1	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O - 0.2 ;	9,66	0,002	1	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O - 0.02 ;	2,3	0,000046	4	
	FeCl ₃ ·6H ₂ O - 0.05 .	6	0,0003	1	
Вартість 1 л середовища становить –0,911 грн					
<i>R. ruber</i> IEGM 231	n-Гексадекан – 23,2	390	9	5	
	Дріжджовий екстракт – 0,1	979,33	0,098	1	
	KH ₂ PO ₄ – 2,0	47,33	0,095	3	
	Na ₂ HPO ₄ – 2,0	25	0,05	1	
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 2,0	9	0,018	1	
	NaCl – 1,0	1,8	0,0018	1	
	KNO ₃ – 1,0	13,5	0,014	<u>2</u>	
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,2	6,8	0,00136	1	
	CaCl ₂ ×2H ₂ O – 0,02	2,3	0,00046	4	
	FeCl ₃ ×7H ₂ O – 0,01	6	0,00006	2	
	Мікроелементи:				
	FeCl ₃ ×7H ₂ O – 0,00015	6	0,009	2	
	H ₃ BO ₃ – 0,00001	80	0,008	4	
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,000001	12,5	0,000125	4	
Co(NO ₃) ₂ ×6H ₂ O – 0,000005	521	0,000625	4		
CuSO ₄ ×5H ₂ O – 0,0000005	54	0,00027	4		

	MnCl ₂ ×4H ₂ O – 0,0000005	52,10	0,00026	4
Вартість 1 л середовища становить – 9,3 грн				
R. soli 102- Na5	Крохмаль – 30	22	0,66	1
	Дріжджовий екстракт – 0,5	979,33	0,489	4
	(NH ₄) ₂ SO ₄ - 10	9	0,09	1
	KCl – 1,1	48,51	0,053	1
	NaCl – 30,0	1,8	0,054	1
	FeSO ₄ – 0,00028	6	0,00000168	2
	KH ₂ PO ₄ – 3,4	47,33	0,16	3
	K ₂ HPO ₄ , -4,4	50	0,22	2
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,7	6,8	0,00476	1
	Мікроелементи :			
	ZnSO ₄ – 0,000145	12,5	0,0000018	4
	CaCl ₂ – 0,00012	2,3	0,00000027	4
	CuSO ₄ – 0,000125	54	0,00000675	4
	MnSO ₄ – 0,000085	27,70	0,0000023	1
Вартість 1 л середовища становить – 1,73 грн				

Примітка: *ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на березень 2019р. Джерела: 1 - <https://prom.ua>, 2 - <http://tehnocem.com.ua>, 3- <http://www.flagma.ua> , 4 - <https://russian.alibaba.com/> , 5 - <https://lenreactiv.ru/> .

Виходячи з розрахунків, середовище для культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 виявилось найдешевшим – 0,514 грн, а найвищу вартість склало середовище для росту *R. ruber* IEGM 231 – 9,3 грн ,що у 9 разів приблизно перебільшує вартість попередніх. Це зумовлено високою вартістю ростового субстрату, яким виступає *n*-гексадекан.

Далі для порівняння даних штамів розраховували умовну вартість 1 г ПАР та концентрацію ПАР, синтезованого за 1 год. За даними табл. 4.3., найнижчою є умовна вартість 1 г поверхнево-активних речовин, синтезованих штамом ІМВ Ас-5017 – 0,32 грн, у той час як 1 г ПАР штаму IEGM 231 у 20 разів дорожчий – 6,64 грн. Найвищі показники концентрації ПАР, синтезованих за 1 год, має штам 102-Na5 (0,027 г/л), але його застосування є не вигідним, адже умовна вартість ПАР у цьому варіанті складає 0,865 грн, що майже утричі більше, порівняно з ІМВ Ас-5017.

**Умовна вартість 1 г поверхнево-активних речовин при
культивуванні *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Rhodococcus
erythropolis* SD-74 , *Rhodococcus ruber* IEGM 231 та *Rhodococcus soli* 102-
Na5**

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація ПАР, г/л	Умовна вартість 1 г ПАР, грн	Тривалість культивування, год	Концентрація ПАР, синтезованого за год, г/л
<i>R.erythropolis</i> IMB Ac-5017	0,514	1,6	0,32	120	0,013
<i>R.erythropolis</i> SD-74	0,911	1,5	0,6	168	0,0089
<i>R. ruber</i> IEGM 231	9,3	1,4	6,64	168	0,0083
<i>R. soli</i> 102-Na5	1,73	2,0	0,865	72	0,027

Таким чином, зважаючи на найменшу вартість середовища для культивування , а також високі показники синтезу робимо висновок, що *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 є найкращим продуцентом серед проаналізованих.

4.2. Техніко-економічне обґрунтування

4.2.1. Потреба у цільовому продукті

Фітопатогенні бактерії наносять значних економічних збитків сільському господарству. Збудники хвороб постійно супроводжують як культурні, так і дикі види рослин, уражують насіння і всі органи протягом вегетації. Вони порушують нормальний перебіг фізіологічних процесів у рослинах, викликають некрози і в'янення, гнилі плодів, що призводить до часткової або повної загибелі рослин. В уражених фітопатогенними бактеріями рослинах зменшується кількість плодів і ягід, погіршується якість продукції та падає урожайність. Часто спостерігається недозрівання врожаю [77].

В Україні зусиллями співробітників відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного Національної

академії наук України вивчені бактеріальні хвороби багатьох видів рослин, в тому числі зернових, зернобобових, овочевих, плодових, лісових культур, бавовнику, тютюну, каучуконосів, суданської трави, буряків цукрових та женьшеню. Досліджені сільськогосподарські культури і виявлені збудники бактеріальних хвороб представлені в таблиці 4.4. Аналіз збудників бактеріальних хвороб рослин свідчить, що на одному виді рослин паразитують, в основному, від двох до тринадцяти видів фітопатогенних бактерій. В залежності від умов навколишнього середовища, сорту рослин, системи землеробства, внесення пестицидів проходить перерозподіл і домінування збудників бактеріозів [77].

Таблиця 4.4

Збудники бактеріальних хвороб в Україні [1]

Культури	Ізольовані збудники хвороб
Злакові (пшениця, жито, ячмінь, овес, просо, рис)	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> (<i>Erwinia herbicola</i>), <i>Pectobacterium carotovorum</i> (<i>Erwinia carotovora</i>), <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (<i>Pseudomonas orydicola</i>), <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
Кукурудза, сорго, суданська трава	<i>Pectobacterium carotovorum</i> (<i>Erwinia carotovora</i>), <i>Pseudomonas syringae</i> (<i>Pseudomonas holci</i>), <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>holcicola</i> (<i>Xanthomonas holcicola</i>)
Бобові (квасоля, горох, соя, люпин, сочевиця, люцерна)	<i>Clavibacter insidiosum</i> , <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> (<i>Erwinia herbicola</i>), <i>Pectobacterium carotovorum</i> (<i>Erwinia carotovora</i>), <i>Pseudomonas marginalis</i> (<i>Pseudomonas xanthochlora</i>), <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>), <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (<i>Pseudomonas vignae</i>), <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> (<i>Pseudomonas lupini</i>), <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> , <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>
Картопля	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> ,

	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (<i>Erwinia phytophthora</i>), <i>Pectobacterium carotovorum</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas marginalis</i> (<i>Pseudomonas xanthochlora</i>), ралстонієподібні бактерії
Морква	<i>Pectobacterium carotovorum</i> (<i>Erwinia carotovora</i>), <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Помідор	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> , <i>Erwinia rhapontici</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> (<i>Erwinia herbicola</i>), <i>Pectobacterium carotovorum</i> (<i>Erwinia carotovora</i>), <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> (<i>Pseudomonas marginalis</i>), <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Xanthomonas vesicatoria</i>
Перець солодкий	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas viridiflava</i>
Огірок, диня, кавун	<i>Erwinia toxica</i> , <i>Pseudomonas burgeri</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> (<i>Erwinia carotovora</i>), <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> , <i>Xanthomonas cucurbitae</i>
Капуста	<i>Pantoea agglomerans</i> (<i>Erwinia herbicola</i>), <i>Pectobacterium carotovorum</i> (<i>Erwinia carotovora</i>), <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> (<i>Pseudomonas maculicola</i>), <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Цибуля	<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> (<i>Erwinia herbicola</i>), <i>Pectobacterium carotovorum</i> (<i>Erwinia carotovora</i>), <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Бавовник	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> , <i>Xanthomonas necrosis</i>
Коноплі	<i>Pseudomonas cannabinae</i>
Каучуконоси	<i>Pantoea agglomerans</i> (<i>Erwinia herbicola</i>), <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Буряк цукровий	<i>Erwinia betae</i> (<i>Erwinia bussei</i>), <i>Pectobacterium carotovorum</i> (<i>Erwinia carotovora</i>), <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> (<i>Pseudomonas wieringae</i>), <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i> (<i>Pseudomonas aptata</i>), <i>Xanthomonas axonopodis</i> (<i>Xanthomonas beticola</i>), <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>
Ріпак	<i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Тютюн, махорка	<i>Pectobacterium carotovorum</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> (<i>Pseudomonas tabaci</i>)
Виноград	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Плодові дерева	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Bacterium nodoantrum</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Erwinia horticola</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> (<i>Erwinia carotovora</i>), <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> (<i>Pseudomonas cerasi</i>), <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> (<i>Pseudomonas morsprunorum</i>), <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> (<i>Xanthomonas pruni</i>), ріккетсієподібні організми
Лісові деревні культури	<i>Bacillus populi</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium butyricum</i> , <i>Erwinia horticola</i> , <i>Erwinia nimipressuralis</i> , <i>Erwinia rhapontici</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> (<i>Pseudomonas cerasi</i>), <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Квіткові культури	<i>Bacillus</i> sp., <i>Pectobacterium carotovorum</i> (<i>Erwinia aroideae</i> , <i>Erwinia carotovora</i>), <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas fluoro-violaceus</i> , <i>Pseudomonas iridis</i>
Женьшень	<i>Pseudomonas cichorii</i>
Бур'яни	<i>Pantoea agglomerans</i> (<i>Erwinia herbicola</i>), <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>), <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Pseudomonas viridiflava</i>
Водні рослини	<i>Bacillus</i> sp., <i>Erwinia</i> sp., <i>Pectobacterium carotovorum</i> (<i>Erwinia carotovora</i>), <i>Pseudomonas</i> sp.

Фітопатогени представлені грампозитивними та грамнегативними бактеріями і мікоплазмами. Серед грамнегативних збудників найчастіше зустрічаються бактерії родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Pectobacterium*, *Agrobacterium* та *Erwinia*, серед грампозитивних – бактерії родів *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Streptomyces* [78].

В умовах інтенсифікації сільськогосподарського виробництва проблема боротьби з фітопатогенними мікроорганізмами стоїть особливо гостро. Провідне місце в захисті рослин на сьогодні займає хімічний метод, який, з одного боку, дозволяє швидко та ефективно пригнічувати розвиток збудника хвороби, а з іншого – призводить до забруднення оточуючого середовища та сільськогосподарської продукції. Одним із найбільш перспективних шляхів скорочення об'ємів застосування небезпечних хімічних препаратів є розробка

біологічних методів боротьби. Особливо це важливо для культур, продукція яких застосовується у свіжому вигляді та при виготовленні дитячого і дієтичного харчування [1].

Серед біологічних засобів захисту рослин до недавнього часу провідне місце належало антибіотикам, але використання існуючих антибіотичних речовин на практиці вкрай обмежене. МОЗ України разом з фахівцями Центру громадського здоров'я розробили план боротьби зі стійкістю до протимікробних препаратів, який було затверджено 6 березня 2019 року Кабінетом Міністрів України. Згідно даного плану до 2020 року застосування антибіотиків у сільському господарстві буде обмежене [79].

Бактеріози капусти та засоби для боротьби з ними

Відомо, що збудником судинного бактеріозу та жовтої плямистості капусти є *Xanthomonas campestris* (рис.4.1, 4.2 відповідно) [80].

Основним джерелом даних хвороб виступає заражене насіння, хоча іноді патоген залишається у ґрунті внаслідок збереження неперегнилих рештків інфікованих рослин. Засоби боротьби передбачають дотримання комплексу агротехнічних та захисних прийомів, серед яких виділяють обробку бактерицидними препаратами [81].



Рис.4.1. Судинний бактеріоз капусти.



Рис.4.2. Жовта плямистість капусти.

На сьогодні ринок України представлений здебільшого препаратами фунгіцидної дії, а проблема боротьби з бактеріозами сільськогосподарських рослин, які знищують 2-5% урожаю, досі залишається гострою. Засобів бактерицидної дії є не так багато, до їх числа входить препарат «Фітолавін», який діє на збудників бактеріозу *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* pv. *Atrofaciens* [2].

4.2.2. Розрахунок річної потреби

У Сумській області станом на 2019 рік налічується 20,17 га капусти білоголової [82]. У статті [83] наведено, що за концентрації 0,4 г/л препарату ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 виживання клітин фітопатогенів, у числі яких *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, становило в середньому 14-40%.

Розрахуємо, яка кількість розчину ПАР необхідна для обробки капусти у період росту, приймаючи об'єм розчину ПАР, аналогічний об'єму робочого розчину «Фітолавін» [84]. Оскільки для обробки 1 га необхідно 1000 л 0,2% робочого розчину (2 л препарату «Фітолавін» та 998 л води), то для обробки 20,17 га необхідно 20170 л розчину. Оскільки обробка здійснюється двічі –

через 10 днів після посадки та повторно через 15 днів – подвоюємо значення, отримуючи 40340 л розчину.

Таким чином, для обробки 20,17 га капусти необхідно 40340 л розчину ПАР.

4.2.3. Розрахунок потужності виробництва поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017

Встановлено, що при культивуванні на етиловому спирті *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 синтезує ПАР концентрацією 1,6 г/л, що володіють антимікробними властивостями у невисоких концентраціях. Для розрахунків потужності виробництва приймаємо оптимальне значення концентрації ПАР – 0,4 г/л. Звідси необхідна кількість ПАР:

$$40340 \text{ л} \times 0,4 \text{ г/л} = 16136 \text{ г}$$

Визначаємо об'єм культуральної рідини, необхідний для отримання 16136 г ПАР:

$$V_{\text{кр0}} = 16136 \text{ г} / 1,6 \text{ г/л} = 10085 \text{ л}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виробництві (20 %), необхідна кількість культуральної рідини складає :

$$V_{\text{кр}} = 10085 \text{ л} / (1-0,2) = 12606,25 \text{ л}$$

Прийемо кількість робочих трудоднів ($T_{\text{рд}}$) 45, це обумовлено тим, що обробка здійснюється у період вегетації капусти навесні (двічі впродовж 25 днів). Тоді кількість продукту на добу ($V_{\text{д}}$) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 12606,25 / 45 \approx 280 \text{ л}$$

Інші 285 днів виробництво буде працювати для синтезу ПАР, як компонентів миючих та дезінфікуючих засобів, з метою їх використання для генерального та щоденного прибирання підприємства, а також для деструкції ксенобіотиків.

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{\text{ц}} = V_{\text{кр}} / ((V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}}) / 24) = 12606,25 / ((280 \times 78) / 24) = 13,8 = 14 \text{ циклів,}$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год,

охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 72 год).

Далі розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ($V_{крц}$):

$$V_{крц} = K1 \times V_d \times T_{цф} / 24 = 1,1 \times 280 \times 78 / 24 \approx 1000 \text{ л,}$$

де $K1$ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Геометричний об'єм ферментера для отримання 1000 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,5 має становити:

$$V_r = V_{крц} / K_{зап} = 1000 / 0,5 = 2000 \text{ л,}$$

де $K_{зап}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

4.2.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 1000$ л культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%)) становитиме:

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{\phi}} = \frac{1000}{1 - 0,1} \approx 1111 \text{ л}$$

де E_{ϕ} – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 1111$ л.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,5$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\phi.1} = 1111 / 0,5 = 2222$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 2000$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.1} = \frac{V_{роб.1}}{V_{сф}} = \frac{1111}{2000} = 0,55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

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

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + X_{\phi}} = \frac{1111}{1 + 0,1} = 1010 \text{ л}$$

де X_{ϕ} – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 1111 - 1010 = 101 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 200 л

Для одержання 101 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{101}{1 - 0,1} = 112,2 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 112,2/0,5 = 224,4 \text{ л}$.
Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 200 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{112,2}{200} = 0,56$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{112,2}{1 + 0,1} = 102 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 112,2 - 102 = 10,2 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 20 л

Для одержання 10,2 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{10,2}{1 - 0,1} = 11,3 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 11,3/0,5 = 22,6$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 20$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{11,3}{20} = 0,56$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{11,3}{1 + 0,1} = 10,2 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 11,3 - 10,2 = 1,1 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Для одержання 1,1 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,15$. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм3}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{1100}{750 \times 0,15} = 10 \text{ шт}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 10 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу поверхнево-активних речовин з антимікробними властивостями у ферментері об'ємом 2000 л з коефіцієнтом заповнення 0,5 буде проходити у три етапи.

4.3. Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва

4.3.1. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору мийних та дезінфікувальних засобів для виробничого біосинтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017

Допоміжні стадії виробництва необхідно планувати з урахуванням особливостей культивування продуцента поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017. Оскільки оптимальними умовами росту для штаму ІМВ Ас-5017 є температура 28-30 °С та нейтральне середовище (рН 6,8-7,0), процес культивування слід проводити із забезпеченням асептичних умов для зменшення ризику контамінації сторонньою мікрофлорою .

Виробництво ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 здійснюється впродовж 45 днів (див. підрозділ 4.2), що передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об'ємом 2000 л, інокулятори об'ємом 200 та 20 л, збірники для підготовки та стерилізації компонентів поживного середовища, качалки, а також бокс та лабораторне устаткування.

Виробництво включає наступні цехи: цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту, качалочна кімната та лабораторне приміщення, де знаходяться автоклави, центрифуги, бокс, термостати, холодильники, апаратура для проведення різних видів контролю (ваги, рН-метр тощо). Відстань між стінами та апаратами становить 1,0 – 1,5 метра. Ширина проходів між ємнісними апаратами складає 1 метр.

На рис. 4.3. наведено приблизний план приміщення для виробництва ПАР штаму ІМВ Ас-5017.

Б – цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту (1 – ферментер об'ємом 2 м³, 2 – збірник для приготування середовища для виробничого біосинтезу об'ємом 1,2 м³, 3 – інокулятор об'ємом 200 л, 4 – збірник для приготування середовища для інокулятора (3) – 130 л.

Л – лабораторне приміщення;

К – приміщення з качалками.

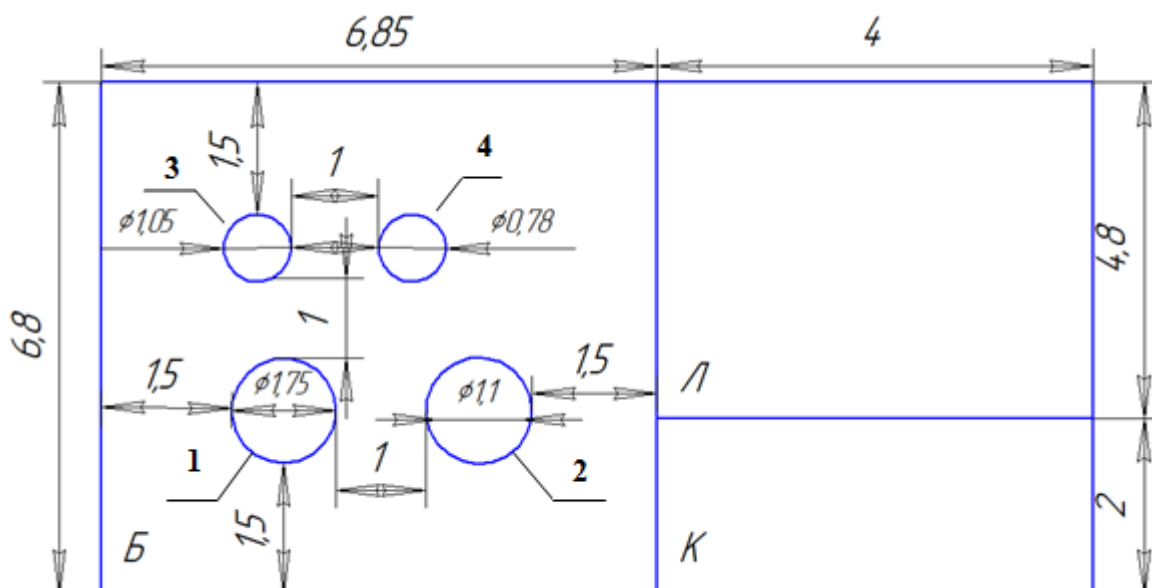


Рис. 4.3. План виробничого приміщення для виробництва поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017.

Габаритні розміри основного обладнання наведено у табл. 4.5.

Таблиця 4.5

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва ПАР *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер	2000	1,75	3,5
Збірник для приготування середовища для виробничого біосинтезу	1200	1,1	1,7
Інокулятор(1)	200	1,05	2,1
Збірник для приготування середовища для культивування в інокуляторі (1)	130	0,78	1,4
Інокулятор (2)	20	0,24	0,47
Збірник для приготування середовища для культивування в інокуляторі (2)	13	0,4	0,83
Всього	3563		

Примітка*. Дані з сайтів <https://e4a.ru> , <https://www.merckmillipore.com> .

За даними табл. 4.5., загальний об'єм збірників та апаратів для вирощування посівного матеріалу і виробничого біосинтезу становить 3,56 м³.

Для підтримання чистоти в виробничих приміщеннях підлогу необхідно мити кожного дня, тобто 45 разів. Обробка стін, вікон та підлоги, тобто генеральне прибирання здійснюється щомісячно, відповідно 2 рази. Необхідно розрахувати кількість миючих засобів. Для цього розраховуємо приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 2,5 м.

Оптимальна площа підлоги цеху виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту становить 46,6 м² (6,8×6,85 м), площа стін – ((6,8 × 2,5) + (6,85 × 2,5)) × 2 = 68,25 м², загальна площа – 46,6+ 68,25 = 114,85 м².

Загальна площа поверхні обробки миючими засобами наведена в табл. 4.6.

Таблиця 4.6

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	46,6	68,25	114,85
Лабораторне приміщення	19,2	44	63,2
Приміщення з качалками	8	30	38
Загальна площа	73,8	142,25	216

Кількість виробничих циклів для синтезу поверхнево-активних речовин становить 14. Оскільки миття обладнання відбувається перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 15 (додаткове миття після останнього циклу). Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$3,56 \times 15 = 53,4 \text{ м}^3$$

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва наведено в табл. 4.7.

Таблиця 4.7

**Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції
оброблюваного об'єкту за весь період виробництва поверхнево-активних
речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017**

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (м ³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання	3,56	15	53,4
Підлога	73,8	45	3321
Стіни, двері, вікна	142,25	2	284,5

**Обґрунтування вибору мийних та дезінфікувальних засобів для
культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017**

Для того, щоб обрати мийні та дезінфікувальні засоби, необхідно врахувати їх вартість та витрати на обробку потрібної площі виробничого приміщення. На 1 м² затрачається приблизно 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікуючого засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502). Миття ферментерів об'ємом 2 м³, 200 л, 20 л можна проводити за допомогою автоматичної СІР-мийки, при цьому витрати мийного засобу складають 20% від загального об'єму обладнання. Для збірників розрахунки проводяться аналогічно. Отже, для миття обладнання необхідно:

$(2000 \times 0,2) + (200 \times 0,2) + (20 \times 0,2) + (1200 \times 0,2) + (130 \times 0,2) + (13 \times 0,2) = 712,6$ л мийного засобу на добу, або $712,6 \times 15 = 10689$ л = **10,68** м³ мийного засобу на рік.

Загальна площа підлоги, стін, дверей та вікон для миття складає
(табл.4.7.) : $3321 + 284,5 = 3605,5 \text{ м}^2$

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва ПАР

Назва мийного/ дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Супераль	Обладнання	5,0	53,4	10 689	38,3	1,9*	20 309,1
Кальцинована сода	Обладнання	2,0	53,4	10 689	3	0,06	641,34
Вімол	Обладнання	1,0	53,4	10 689	16	0,16	1 710,2
Аніосепт актив	Обладнання	2,0	53,4	10 689	400	8	85 512
Мікробак форте	Стіни, підлога, вікна, двері	1,5	3 605,5	360,5	336	5	1 802,5
Ексан-про-дез	Стіни, підлога, вікна, двері	6	3 605,5	360,5	42	2,52	908,46
Хлорантоін	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2	3 605,5	360,5	230	0,46	165,83
Тандем-21	Стіни, підлога, вікна, двері	2	3 605,5	360,5	25	0,5	180,25

Примітка. Ціни наведено станом на вересень 2019 р.: <https://prom.ua>

*Приклад розрахунку вартості 1 л робочого розчину мийного засобу «Супераль»: Вартість 1 л засобу складає 38,3 грн, концентрація його робочого розчину – 5 %, що говорить про те, що в 1000 мл робочого розчину – 50 мл (0,05 л) концентрату. Отже, $38,3 \times 0,05 = 1,915 \approx 1,9$ грн/л робочого розчину. Аналогічно розраховують вартість 1 л робочого розчину для решти мийних засобів

Таким чином, проаналізувавши таблицю 4.8., для миття обладнання слід застосовувати 2%-й розчин кальцинованої соди, а для миття стін, підлоги, вікон та дверей – «Хлорантоін», оскільки враховуючи концентрацію робочих розчинів та їхню вартість за один літр (кілограм), витрати на їх придбання для всього періоду виробництва становлять найменше.

Сода кальцинована технічна (натрій вуглекислий) – порошок або гранули білого кольору. Кальцинована сода – гігроскопічний продукт, на повітрі поглинає вологу і вуглекислоту з утворенням кислої солі NaHCO_3 , при зберіганні на відкритому повітрі злежується. Водні розчини мають сильно лужну реакцію [85]. Складські приміщення, в яких буде зберігатися сода, повинні мати відповідну вентиляційну систему, з невисокою вологістю повітря. Перевозити даний хімічний продукт можна всіма видами транспорту [86].

«Хлорантоін» – хлорактивний, багатокomпонентний, поліфункціональний дезінфекційний засіб з миючим ефектом [87]. Хлорантоін зберігають в упаковці виробника в критих, сухих, провітрюваних приміщеннях, недоступних для загального використання на відстані не менше 1 м від нагрівальних приладів, при температурі від 5°C до 30°C . Засіб повинен бути захищеним від прямих сонячних променів. Ящики і мішки із засобом зберігають на плоских дерев'яних піддонах або піддонах з полімерних матеріалів в штабелях. Висота штабеля не повинна перевищувати 2,5 м. Гарантійний термін зберігання 3 роки з дати виробництва [88].

Для забезпечення належної чистоти повітря у виробничих приміщеннях передбачають наявність стельових бактерицидних ламп, які вмикають на 1,5–2 год після проведення генерального прибирання (проводиться раз на тиждень), в попередньо звільнених від персоналу приміщеннях.

4.3.2. Обґрунтування стадії підготовки обладнання та комунікацій

Підготовка обладнання та комунікацій складається з таких етапів:

- миття;

- технічний огляд;
- перевірка на герметичність;
- стерилізація.

Миття. Для миття ємнісного обладнання слід обрати циркуляційну СІР-мийку (Cleaning in place (Україна)). Вибір такого обладнання зумовлений його перевагами [89]:

- Можливість багаторазового використання миючих розчинів.
- Можливість одночасного миття кількох об'єктів
- Можливість збору води для обполіскування
- Автоматична підтримка температури і концентрації миючих розчинів.
- Нагрівання води у малому контурі економить час, воду та енергію
- Індивідуальні програми мийки для різних об'єктів.
- Функція зворотного зв'язку з об'єктами мийки.
- Реєстрація та зберігання виконуваних операцій.

Технічний огляд. Після миття та ополіскування обладнання проводять технічний огляд візуально з метою виявлення неущільнень в комунікаціях та запірній апаратурі на обладнанні. Для усунення цих проблем проводять підтягування різьбових з'єднань.

Перевірка на герметичність. Наступна стадія підготовки обладнання (інокулятора, ферментера) до стерилізації полягає в перевірці їх на герметичність. Для цього на апараті закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують покази манометра на кришці апарату та час витримки (30–60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважається, що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень на апараті та у місцях з'єднання запірної арматури з комунікаціями.

Якщо перевірка на герметичність виявила не ущільнення можна використати метод галогенових течієпошукачів.

При галогеновому методі течошукання виріб заповнюють хлорвмістним газом (чистим або в суміші з повітрям). Це фреон (хлорон) або CCl_4 , CF_4 . Закривають усю запірну апаратуру, апарат нагрівають до 80°C і збільшують тиск до 0,2 МПа. Вихід парів суміші через нещільності фіксується течешукачем. Метод базується на явищі різкого підвищення емісії позитивних іонів з платиного аноду в присутності галогенів. Ефект спостерігається і при атмосферному тиску, і в вакуумі. Після закінчення контролю пробну речовину відкачують в резервуар.

Тривалість перевірки одного апарату цим методом – 0,5–1 год. У разі виявлення неущільнень фіксують це місце і здійснюють підтягування різьбового з'єднання. Якщо ця операція не дала позитивного результату, міняють прокладку і операцію повторюють. Процес здійснюють до ліквідації усіх виявлених не ущільнень [90].

Стерилізація. Для цього застосовують, як правило, термічну стерилізацію водяною насиченою парою з тиском $P = 0,28\text{--}0,3$ МПа. Процес умовно поділяють на три етапи: нагрів апарата, витримування при температурі стерилізації (суто стерилізація) та охолодження.

Нагрів апарата. Під час стерилізації апарата попередньо в сорочку подають насичену пару і прогрівають апарат до температури $80\text{--}90^\circ\text{C}$.

Стерилізація. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації $t_{\text{ст}} = 130\text{--}135^\circ\text{C}$ закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують заданий час стерилізації. При стерилізації апарата паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря.

Охолодження. Закривають усю запірну арматуру та арматуру подачі пари в апарат. У сорочку подається холодна вода. Для компенсації падіння тиску (утворення вакууму при конденсації пари в апараті) в апарат подають

стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури до 30–40 °С і надлишкового тиску $P = 0,003–0,005$ МПа.

4.3.3. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря

R. erythropolis ІМВ Ас-5017 є строгим аеробом, тому вкрай необхідною є підготовка стерильного аераційного повітря для культивування продуцента.

Для стерилізації повітря в боксах в лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом, використовують УФ-лампи.

Забір атмосферного повітря для наступної його очистки здійснюють за допомогою спеціального повітрязабірника на висоті ≈ 8 м від підлоги першого поверху будівлі. Це пов'язано з тим, що висота виробничої будівлі становить приблизно 5,5 м (разом з косим дахом будівлі та висотою стель 4 м) і для запобігання потраплянню забруднюючих часточок з виробничої будівлі у повітрязабірник його розміщують на відстані 2-3 м від даху будівлі.

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують за допомогою фільтрів грубої очистки (головні фільтри) та індивідуальних фільтрів (фільтрів високої ефективності). Індивідуальні фільтри встановлюють безпосередньо перед ферментером, посівним апаратом або інокулятором. Головні фільтри заповнюють набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На даних фільтрах видаляється приблизно 95% мікроорганізмів, а на індивідуальних, заповнених надтонкими мембранами чи волокнами, затримується до 99,999% мікроорганізмів.

Очищення відпрацьованого повітря. Відпрацьоване повітря подається на аналогічні головні фільтри для очищення й знешкодження через колектори. При невеликих витратах повітря дані фільтри встановлюються на ферментері.

4.3.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

R. erythropolis IMB Ac-5017 вирощують на рідкому поживному середовищі такого складу (г/л) [4]:

NaNO_3 – 1,3;

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1;

NaCl – 1,0;

Na_2HPO_4 – 0,6;

KH_2PO_4 – 0,14;

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001;

CaCl_2 – 0,1.

В якості джерела вуглецю та енергії використовують етанол (2%, об'ємна частка). Однією з переваг використання етанолу у якості субстрату є відсутність необхідності його стерилізації.

Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури в колбах на качалках

Оскільки на цьому етапі через об'єм середовища невеликий, стерилізація компонентів поживного середовища буде проводитися в автоклаві. Для кожної з речовин, що входить до складу середовища для культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017, передбачений певний режим стерилізації, який залежить від їхніх властивостей, тому умовно розділимо їх на композиції.

Композиція А: NaNO_3 , NaCl , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Б: KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Окремо готують запасний розчин сульфату феруму об'ємом 100 мл (стерилізація при 131 °С), оскільки вносимо його в досить малій концентрації (0,0011 г для 1,1 л середовища).

Етанол вносять безпосередньо у колбу без попередньої стерилізації.

Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 20 л

Об'єм середовища, необхідний для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі, становить 10,2 л. Поживне середовище ділимо на такі композиції:

Композиція А: NaNO_3 , Na_2HPO_4 , NaCl , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв при рН = 4,5).

Стерилізація мінеральних компонентів середовища (композиція А) буде здійснюватися безпосередньо у реакторі. Для попередження випадання нерозчинних осадів фосфатів магнію при сумісній стерилізації $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ з Na_2HPO_4 та KH_2PO_4 , необхідно забезпечити кисле рН середовища (4,5). Для підкислення 1 л розчину необхідно 2 мл соляної кислоти.

Після закінчення стерилізації композиції А розчин подають в інокулятор і підлужують 6%-вим розчином гідроксиду натрію до рН = 7. Для підлуження 1 л розчину необхідно 2 мл лугу.

Етанол вносять безпосередньо в інокулятор без попереднього приготування і стерилізації.

Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 200 л

Для об'єму середовища 102 л композиції складаються відповідно до пункту 2.4.2, стерилізація композиції А відбувається відповідно до пункту 2.4.2. Для попередження випадання нерозчинних осадів фосфатів магнію при сумісній стерилізації $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ з Na_2HPO_4 та KH_2PO_4 , необхідно забезпечити кисле рН середовища (4,5). Для підкислення 1 л розчину необхідно 2 мл соляної кислоти.

Після закінчення стерилізації композиції А розчин подають в інокулятор і підлужують 6%-вим розчином гідроксиду натрію до рН = 7. Для підлуження 1 л розчину необхідно 2 мл лугу.

Етанол вносять безпосередньо в інокулятор без попереднього приготування і стерилізації.

Вирощування культури в ферментері об'ємом 2 м³

Об'єм середовища, необхідний для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті, становить 1010 л. На даному етапі композиції складаються відповідно до пункту 2.4.2, стерилізацію композиції А проводять відповідно до пункту 2.4.2. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію рН розчину з солями доводять до значення 4,5 6 %-вим розчином соляної кислоти. Для підкислення 1 л розчину необхідно 2 мл соляної кислоти. Після закінчення стерилізації композиції А розчин подають в інокулятор і підлужують 6%-вим розчином гідроксиду натрію до рН =7. Для підлуження 1 л розчину необхідно 2 мл лугу.

Необхідною мірою є наявність окремого збірника для етанолу об'ємом 30 л, адже на даному етапі об'єм спирту складає 22 л.

Таким чином, для приготування та стерилізації поживного середовища для біосинтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 потрібно передбачити такі допоміжні стадії:

- 1) приготування 2244,4 мл 6%-го розчину соляної кислоти для підкислення середовища;
- 2) приготування та стерилізація 2244,4 мл 6%-го розчину натрій гідроксиду для нейтралізації середовища;
- 3) приготування та стерилізація 100 мл запасного розчину феруму сульфату;

Крім того, необхідно забезпечити наявність таких збірників :

- 1) збірник об'ємом 3 л для приготування 6% розчину HCl;
- 2) збірник об'ємом 3 л для приготування 6% розчину NaOH;
- 3) збірник об'ємом 30 л для зберігання етанолу;
- 4) збірник об'ємом 13 л для приготування композицій поживного середовища;
- 5) збірник об'ємом 130 л для приготування композицій поживного середовища;

б) збірник об'ємом $1,2 \text{ м}^3$ для приготування композицій поживного середовища;

4.4. Продуктовий розрахунок, розрахунок технологічного обладнання, матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

Згідно з ТЕО (див. підрозділ 4.2) потреба поверхнево-активних речовинах *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 на рік складає 12 м^3 . Таку кількість препарату необхідно отримати за $T_{\text{рд}} = 45$ днів. Найвищий рівень біосинтезу біомаси досягається за умов росту бактерій протягом 72 год. Концентрація біомаси в культуральній рідині становить $2,2 \text{ г/л}$, що відповідає $0,22\%$. Отже, вміст продукту у культуральній рідині $P_{\text{ст}} = 99,78 \text{ об.}\%$. При чому готовий продукт, це 100% супернатант ($P_{\text{гп}} = 100 \text{ об.}\%$).

Для подальших розрахунків приймемо наступні дані:

- час роботи ферментера $T_{\text{цф}} = 78$ год (тривалість культивування – 72 год; тривалість підготовчих робіт – миття та огляд ферментера (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів та стерилізація (1,5 год), охолодження ферментера (0,5 год), завантаження поживного середовища (1,5 год), засів культурою (0,5 год));

- сумарні втрати при виділенні цільового продукту $E_{\text{св}} = 0,2$;

- коефіцієнт запасу $K_1 = 1,1$;

4.4.1. Розрахунок кількості виробничих циклів

Кількість продукту за добу:

$$V_{\text{нд}} = \frac{V_{\text{нт}}}{T_{\text{д}}} = \frac{12}{45} = 0,26 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Кількість продукту за цикл:

$$V_{\text{цк}} = \frac{V_{\text{нд}} \times T_{\text{цф}}}{24} = \frac{0,26 \times 78}{24} = 0,8 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

Кількість циклів за рік (ціле число):

$$N_{\text{цк}} = \frac{V_{\text{нт}}}{V_{\text{цк}}} = \frac{12}{0,8} = 14 \text{ циклів}$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл):

$$V_{кр} = \frac{K_1 \times V_{цк} \times P_{гп}}{P_{ст} \times (1 - E_{св})} = \frac{1,1 \times 0,8 \times 100}{99,7 \times 0,8} = 1,1 \text{ м}^3$$

Вихід продукту з 1 м³ культуральної рідини:

$$q_{ац} = \frac{V_{цк} \times 1000}{V_{кр}} = \frac{0,9 \times 1000}{1,2} = 750 \text{ л/м}^3$$

4.4.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу

Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

Кількість поживного середовища (ПС) та посівного матеріалу (ПМ) у ферментері до культивування становить:

$$V_{\phi} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{\phi}} = \frac{1,1}{1 - 0,1} = 1,2 \text{ м}^3$$

Кількість поживного середовища у ферментері складе:

$$V_{пс\phi} = \frac{V_{\phi}}{1 + X_{\phi}} = \frac{1,2}{1 + 0,1} = 1,1 \text{ м}^3$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву ферментера:

$$V_{пм\phi} = V_{\phi} - V_{пс\phi} = 1,2 - 1,1 = 0,1 \text{ м}^3 = 100 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{з\phi} = 0,5$ його приблизний геометричний об'єм складатиме:

$$V_{г\phi} = \frac{V_{\phi}}{K_{з\phi}} = \frac{1,2}{0,5} = 2 \text{ м}^3$$

Кількість стадій вирощування посівного матеріалу

Оскільки кількість ПМ становить $X_{\phi} = X_{ін1} = X_{ін2} = X_{колб} = 10 \%$ від кількості ПС визначаємо кількість ПМ для інших стадій. Приблизна кількість ПМ для інших стадій становитиме:

ПМ для ферментера з інокулятора 200 л:

$$V_{пм\phi} = 100 \text{ л}$$

ПМ для інокулятора 200 л з інокулятора 20 л:

$$V_{пмін1} = 10 \text{ л}$$

ПМ для інокулятора 20 л з качалочних колб:

$$V_{\text{пмін2}} = V_{\text{пмін1}} \times X_{\text{па}} = 10 \times 0,1 = 1 \text{ л}$$

Отже, маємо 3-х ступеневу стадію отримання ПМ.

Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері

Згідно даного складу поживного середовища для виробничого біосинтезу продукту, загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{псф}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{псф}} C_{\Sigma} = 1,1 \times 19,04 = 20,9 \text{ кг, в тому числі покомпонентно, кг:}$$

Етанол	–	$G_1 = G_{\text{заг}}(C_1/C_{\Sigma}) = 20,9 \times (15,8/19,04) = 17,3$
NaNO ₃	–	$G_2 = G_{\text{заг}}(C_2/C_{\Sigma}) = 20,9 \times (1,3/19,04) = 1,4$
MgSO ₄ ·7H ₂ O	–	$G_3 = G_{\text{заг}}(C_3/C_{\Sigma}) = 20,9 \times (0,1/19,04) = 0,1$
NaCl	–	$G_4 = G_{\text{заг}}(C_4/C_{\Sigma}) = 20,9 \times (1/19,04) = 1$
Na ₂ HPO ₄	–	$G_5 = G_{\text{заг}}(C_5/C_{\Sigma}) = 20,9 \times (0,6/19,04) = 0,66$
KH ₂ PO ₄	–	$G_6 = G_{\text{заг}}(C_6/C_{\Sigma}) = 20,9 \times (0,14/19,04) = 0,15$
FeSO ₄ ·7H ₂ O	–	$G_7 = G_{\text{заг}}(C_7/C_{\Sigma}) = 20,9 \times (0,001/19,04) = 0,001$
CaCl ₂	–	$G_8 = G_{\text{заг}}(C_8/C_{\Sigma}) = 20,9 \times (0,1/19,04) = 0,1$

Етанол не стерилізується і подається безпосередньо у ферментер, тому для наступних розрахунків кількості конденсату та води віднімаємо від об'єму поживного середовища необхідний об'єм етанолу, а від загальної маси компонентів відповідно масу етанолу. Концентрація етанолу в середовищі для виробничого біосинтезу становить $\phi_{\text{Б}} = 2\%$ (об'ємна частка) або $C_1 = 15,8$ г/л.

Розраховуємо загальну концентрацію компонентів середовища без врахування етанолу:

$$C_{\Sigma \text{без.етанолу}} = C_{\Sigma} - C_1 = 19,04 - 15,8 = 3,24 \text{ г/л}$$

Розраховуємо масу компонентів середовища без етанолу:

$$G_{\text{заг.без етанолу}} = G_{\text{заг}} - G_1 = 20,9 - 17,3 = 3,6 \text{ кг}$$

Розраховуємо об'єм етанолу:

$$V_{\text{етанол}} = \varphi_{\text{Б}} \cdot V_{\text{псф}} = 0,02 \cdot 1100 = 22 \text{ л}$$

Розраховуємо об'єм середовища без етанолу:

$$V_{\text{псф2}} = V_{\text{псф}} - V_{\text{етанол}} = 1100 - 22 = 1078 \text{ л}$$

Розраховуємо об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища в окремих реакторах гострою парою, $K_{\text{кон}} = 0,1$. Загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС у ферментері, становитиме:

$$V_{\text{кф}} = V_{\text{псф2}} K_{\text{кон}} = 1078 \times 0,1 = 107,8 \text{ л}$$

Загальна кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища, з урахуванням безпосереднього внесення етанолу у ферментер, буде:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{псф2}} - V_{\text{кф}} - G_{\text{заг.без етанолу}} = 1078 - 107,8 - 3,6 = 966,6 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$.

Розраховуємо кількість води для розчинення по композиціях. Композицію А складають солі NaNO_3 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 .

Кількість води, необхідної для розчинення солей, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, л:

$$\text{NaNO}_3 \quad - \quad V_{1\text{в}} = V_{\text{в}}(C_2/C_{\Sigma}) = 966,6 \times (1,3/3,24) = 387,8$$

$$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} \quad - \quad V_{2\text{в}} = V_{\text{в}}(C_3/C_{\Sigma}) = 966,6 \times (0,1/3,24) = 29,8$$

$$\text{NaCl} \quad - \quad V_{3\text{в}} = V_{\text{в}}(C_4/C_{\Sigma}) = 966,6 \times (1/3,24) = 298$$

$$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \quad - \quad V_{4\text{в}} = V_{\text{в}}(C_5/C_{\Sigma}) = 966,6 \times (0,66/3,24) = 197$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \quad - \quad V_{5\text{в}} = V_{\text{в}}(C_6/C_{\Sigma}) = 966,6 \times (0,14/3,24) = 41,7$$

$$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} \quad - \quad V_{6\text{в}} = V_{\text{в}}(C_7/C_{\Sigma}) = 966,6 \times (0,001/3,24) = 0,3$$

$$\text{CaCl}_2 \quad - \quad V_{7\text{в}} = V_{\text{в}}(C_8/C_{\Sigma}) = 966,6 \times (0,1/3,24) = 29,8$$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

$$\text{Композиція А} \quad - \quad V_{\text{АВ}} = 966,6$$

Розраховуємо кількість конденсату по композиціях, л:

$$\text{Композиція А} \quad V_{1\text{к}} = V_{\text{кф}} (V_{\text{АВ}}/V_{\text{В}}) = 107,8 \times (966,6 / 966,6) = 107,8$$

Формування композицій наведено у табл. 4.9.

Таблиця 4.9

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у ферментері 2 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1078 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
NaNO ₃	1,3	1,4	А	969,9
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,1	0,108		
NaCl	1	1,08		
Na ₂ HPO ₄	0,6	0,65		
KH ₂ PO ₄	0,14	0,15		
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,001	0,001		
CaCl ₂	0,1	0,108		
Вода		966,6		
Конденсат		107,8		
Разом:		1078		

Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 200 л

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі 200 л становить:

$$V_{\text{ін1}} = \frac{V_{\text{пмф}}}{1 - E_{\text{ін1}}} = \frac{100}{1 - 0,1} = 111,1 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в інокуляторі 200 л становитиме:

$$V_{\text{псін1}} = \frac{V_{\text{ін1}}}{1 + X_{\text{ін1}}} = \frac{111,1}{1 + 0,1} = 101 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву інокулятора 200 л:

$$V_{\text{пмін1}} = V_{\text{ін1}} - V_{\text{псін1}} = 111,1 - 101 = 10,1 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення інокулятора $K_{\text{зап}} = 0,5$ його приблизний геометричний об'єм складатиме:

$$V_{\text{гін1}} = \frac{V_{\text{ін1}}}{K_{\text{зін1}}} = \frac{111,1}{0,5} = 222,2 \text{ л}$$

Оскільки серед стандартних інокуляторів немає апарата об'ємом 222,2 л, обираємо найближчий за об'ємом – 200 л. Уточнюємо коефіцієнт

заповнення:

$$K_{\text{зін1}} = \frac{V_{\text{ін1}}}{V_{\text{гін1}}} = \frac{111,1}{200} = 0,55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах $K_{\text{зан}} = 0,5 \dots 0,65$.

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{псін1}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{псін1}} C_{\Sigma} = 101 \times 7,19 = 726,2 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

$$\text{Етанол} \quad G_1 = G_{\text{заг}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 726,2 \times (3,95 / 7,19) = 398,9$$

$$\text{NaNO}_3 \quad G_2 = G_{\text{заг}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 726,2 \times (1,3 / 7,19) = 131,3$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \quad G_3 = G_{\text{заг}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 726,2 \times (0,1 / 7,19) = 10,1$$

$$\text{NaCl} \quad G_4 = G_{\text{заг}} (C_4 / C_{\Sigma}) = 726,2 \times (1 / 7,19) = 101$$

$$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \quad G_5 = G_{\text{заг}} (C_5 / C_{\Sigma}) = 726,2 \times (0,6 / 7,19) = 60,6$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \quad G_6 = G_{\text{заг}} (C_6 / C_{\Sigma}) = 726,2 \times (0,14 / 7,19) = 14,1$$

$$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \quad G_7 = G_{\text{заг}} (C_7 / C_{\Sigma}) = 726,2 \times (0,001 / 7,19) = 0,1$$

$$\text{CaCl}_2 \quad G_8 = G_{\text{заг}} (C_8 / C_{\Sigma}) = 726,2 \times (0,1 / 7,19) = 10,1$$

Етанол не стерилізується і подається безпосередньо у ферментер, тому для наступних розрахунків кількості конденсату та води віднімаємо від об'єму поживного середовища необхідний об'єм етанолу, а від загальної

маси компонентів відповідно масу етанолу. Концентрація етанолу в середовищі для отримання посівного матеріалу становить $\varphi_B = 0,5\%$ (об'ємна частка) або $C_1 = 3,95$ г/л.

Розраховуємо загальну концентрацію компонентів середовища без врахування етанолу:

$$C_{\Sigma \text{без.етанолу}} = C_{\Sigma} - C_1 = 7,19 - 3,95 = 3,24 \text{ г/л}$$

Розраховуємо масу компонентів середовища без етанолу:

$$G_{\text{заг.без.етанолу}} = G_{\text{заг}} - G_1 = 726,2 - 398,9 = 327,3 \text{ г}$$

Розраховуємо об'єм етанолу:

$$V_{\text{етанол}} = \varphi_B \cdot V_{\text{псін1}} = 0,005 \cdot 101 = 0,5 \text{ л}$$

Розраховуємо об'єм середовища без етанолу:

$$V_{\text{псін1 без етанолу}} = V_{\text{псін1}} - V_{\text{етанол}} = 101 - 0,5 = 100,5 \text{ л}$$

Розраховуємо об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища в окремих реакторах гострою парою, $K_{\text{кон}} = 0,1$. Загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС в інокуляторі 200 л, становитиме:

$$V_{\text{кін1}} = V_{\text{псін1 без етанолу}} K_{\text{кон}} = 100,5 \times 0,1 = 10,05 \text{ л}$$

Загальна кількість води, яка необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища, без урахування конденсату, але з урахуванням, що етанол вноситься безпосередньо у ферментер буде:

$$V_B = V_{\text{псін1 без етанолу}} - G_{\text{заг без етанолу}} - V_{\text{кін1}} = 100,5 - 0,327 - 10,05 = 90,1 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$.

Розраховуємо кількість води для розчинення по композиціях. Композицію А складають солі NaNO_3 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 .

Кількість води, необхідної для розчинення солей, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, л:

$$\text{NaNO}_3 \quad V_{1B} = V_B (C_2 / C_{\Sigma}) = 90,1 \times (1,3 / 3,24) = 36,1$$

MgSO ₄ ×7H ₂ O	$V_{2B} = V_B(C_3/C_{\Sigma}) = 90,1 \times (0,1/3,24) = 2,8$
NaCl	$V_{3B} = V_B(C_4/C_{\Sigma}) = 90,1 \times (1/3,24) = 28$
Na ₂ HPO ₄	$V_{4B} = V_B(C_5/C_{\Sigma}) = 90,1 \times (0,6/3,24) = 16,7$
KH ₂ PO ₄	$V_{5B} = V_B(C_6/C_{\Sigma}) = 90,1 \times (0,14/3,24) = 3,9$
FeSO ₄ ×7H ₂ O	$V_{6B} = V_B(C_7/C_{\Sigma}) = 90,1 \times (0,001/3,24) = 0,03$
CaCl ₂	$V_{7B} = V_B(C_8/C_{\Sigma}) = 90,1 \times (0,1/3,24) = 2,8$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

Композиція А $V_{AB} = 90,1$ л

Формування композицій наведено у табл. 4.10.

Таблиця 4.10

Склад композицій для стерилізації поживного середовища в інокуляторі 200 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 100500 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
NaNO ₃	1,3	131,3	А	90430
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,1	10,1		
NaCl	1	101		
Na ₂ HPO ₄	0,6	60,6		
KH ₂ PO ₄	0,14	14,1		
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,001	0,1		
CaCl ₂	0,1	10,1		
Вода		90100		
Конденсат		10050		
Разом:		100500		

Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 20 л

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі 20 л становить:

$$V_{ін2} = \frac{V_{пмін1}}{1 - E_{ін2}} = \frac{10,1}{1 - 0,1} = 11,2 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в інокуляторі 20 л становитиме:

$$V_{псін2} = \frac{V_{ін2}}{1 + X_{ін2}} = \frac{11,2}{1 + 0,1} = 10,2 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву інокулятора 20 л:

$$V_{пмін2} = V_{ін2} - V_{псін2} = 11,2 - 10,2 = 1 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення інокулятора $K_{зпа} = 0,5$ його приблизний геометричний об'єм складатиме:

$$V_{гін2} = \frac{V_{ін2}}{K_{зін2}} = \frac{11,2}{0,5} = 22,4 \text{ л}$$

Оскільки серед стандартних інокуляторів немає апарата об'ємом 22,6 л, обираємо найближчий за об'ємом – 20 л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зін2} = \frac{V_{ін2}}{V_{гін2}} = \frac{11,2}{20} = 0,56$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах $K_{зан} = 0,5...0,65$.

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{псін2}$ складають:

$$G_{зар} = V_{псін2} C_{\Sigma} = 10,2 \times 7,19 = 73,3 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

$$\text{Етанол} \quad G_1 = G_{зар} (C_1 / C_{\Sigma}) = 73,3 \times (3,95 / 7,19) = 40,3$$

$$\text{NaNO}_3 \quad G_2 = G_{зар} (C_2 / C_{\Sigma}) = 73,3 \times (1,3 / 7,19) = 13,2$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \quad G_3 = G_{зар} (C_3 / C_{\Sigma}) = 73,3 \times (0,1 / 7,19) = 1$$

$$\text{NaCl} \quad G_4 = G_{зар} (C_4 / C_{\Sigma}) = 73,3 \times (1 / 7,19) = 10,2$$

$$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \quad G_5 = G_{зар} (C_5 / C_{\Sigma}) = 73,3 \times (0,6 / 7,19) = 6,1$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \quad G_6 = G_{зар} (C_6 / C_{\Sigma}) = 73,3 \times (0,14 / 7,19) = 1,4$$

$$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \quad G_7 = G_{зар} (C_7 / C_{\Sigma}) = 73,3 \times (0,001 / 7,19) = 0,01$$

$$\text{CaCl}_2 \quad G_8 = G_{\text{заг}}(C_8/C_{\Sigma}) = 73,3 \times (0,1/7,19) = 1$$

Етанол не стерилізується і подається безпосередньо у ферментер, тому для наступних розрахунків кількості конденсату та води віднімаємо від об'єму поживного середовища необхідний об'єм етанолу, а від загальної маси компонентів відповідно масу етанолу. Концентрація етанолу в середовищі для отримання посівного матеріалу становить $\varphi_B = 0,5\%$ (об'ємна частка) або $C_1 = 3,95$ г/л.

Розраховуємо загальну концентрацію компонентів середовища без врахування етанолу:

$$C_{\Sigma \text{без.етанолу}} = C_{\Sigma} - C_1 = 7,19 - 3,95 = 3,24 \text{ г/л}$$

Розраховуємо масу компонентів середовища без етанолу:

$$G_{\text{заг.без.етанолу}} = G_{\text{заг}} - G_1 = 73,3 - 40,3 = 33 \text{ г}$$

Розраховуємо об'єм етанолу:

$$V_{\text{етанол}} = \varphi_B \cdot V_{\text{псін2}} = 0,005 \cdot 10,2 = 0,05 \text{ л}$$

Розраховуємо об'єм середовища без етанолу:

$$V_{\text{псін2 без етанолу}} = V_{\text{псін2}} - V_{\text{етанол}} = 10,2 - 0,05 = 10,15 \text{ л}$$

Розраховуємо об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища в окремих реакторах гострою парою, $K_{\text{кон}} = 0,1$. Загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС в інокуляторі 20 л, становитиме:

$$V_{\text{кін2}} = V_{\text{псін2 без етанолу}} K_{\text{кон}} = 10,15 \times 0,1 = 1,01 \text{ л}$$

Загальна кількість води, яка необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища, без урахування конденсату, але з урахуванням, що етанол вноситься безпосередньо у ферментер буде:

$$V_B = V_{\text{псін2 без етанолу}} - G_{\text{заг без етанолу}} - V_{\text{кін2}} = 10,15 - 0,03 - 1,01 = 9,1 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$.

Розраховуємо кількість води для розчинення по композиціях. Композицію А складають солі NaNO_3 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 .

Кількість води, необхідної для розчинення солей, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, л:

$$\text{NaNO}_3 \quad V_{1\text{в}} = V_{\text{в}}(C_2/C_{\Sigma}) = 9,1 \times (1,3/3,24) = 3,6$$

$$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} \quad V_{2\text{в}} = V_{\text{в}}(C_3/C_{\Sigma}) = 9,1 \times (0,1/3,24) = 0,3$$

$$\text{NaCl} \quad V_{3\text{в}} = V_{\text{в}}(C_4/C_{\Sigma}) = 9,1 \times (1/3,24) = 2,8$$

$$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \quad V_{4\text{в}} = V_{\text{в}}(C_5/C_{\Sigma}) = 9,1 \times (0,6/3,24) = 1,7$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \quad V_{5\text{в}} = V_{\text{в}}(C_6/C_{\Sigma}) = 9,1 \times (0,14/3,24) = 0,4$$

$$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} \quad V_{6\text{в}} = V_{\text{в}}(C_7/C_{\Sigma}) = 9,1 \times (0,001/3,24) = 0,003$$

$$\text{CaCl}_2 \quad V_{7\text{в}} = V_{\text{в}}(C_8/C_{\Sigma}) = 9,1 \times (0,1/3,24) = 0,3$$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

$$\text{Композиція А} \quad V_{\text{Ав}} = 9,1 \text{ л}$$

Формування композицій наведено у табл. 4.11.

Таблиця 4.11

Склад композицій для стерилізації поживного середовища в інокуляторі 20 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 10150 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
NaNO_3	1,3	13,2	А	9133
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	1		
NaCl	1	10,2		
Na_2HPO_4	0,6	6,1		
KH_2PO_4	0,14	1,4		
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,001	0,01		
CaCl_2	0,1	1		
Вода		9100		

Конденсат	1010		1010
Разом:	10150		10150

Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування в колбах на качалках

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах на качалках:

$$V_{\text{кол}} = \frac{V_{\text{пмін2}}}{1 - E_{\text{кол}}} = \frac{1}{1 - 0,01} = 1,01 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у колбах становитиме:

$$V_{\text{пск}} = \frac{V_{\text{кол}}}{1 + X_{\text{кол}}} = \frac{1,01}{1 + 0,05} = 0,96 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву колб:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{кол}} - V_{\text{пск}} = 1,01 - 0,96 = 0,05 \text{ л} = 50 \text{ мл}$$

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пск}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{пск}} C_{\Sigma} = 0,96 \times 7,19 = 6,9 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

$$\text{Етанол} \quad G_1 = G_{\text{заг}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 6,9 \times (3,95 / 7,19) = 3,8$$

$$\text{NaNO}_3 \quad G_2 = G_{\text{заг}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 6,9 \times (1,3 / 7,19) = 1,2$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \quad G_3 = G_{\text{заг}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 6,9 \times (0,1 / 7,19) = 0,09$$

$$\text{NaCl} \quad G_4 = G_{\text{заг}} (C_4 / C_{\Sigma}) = 6,9 \times (1 / 7,19) = 0,9$$

$$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \quad G_5 = G_{\text{заг}} (C_5 / C_{\Sigma}) = 6,9 \times (0,6 / 7,19) = 0,6$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \quad G_6 = G_{\text{заг}} (C_6 / C_{\Sigma}) = 6,9 \times (0,14 / 7,19) = 0,1$$

$$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \quad G_7 = G_{\text{заг}} (C_7 / C_{\Sigma}) = 6,9 \times (0,001 / 7,19) = 0,001$$

$$\text{CaCl}_2 \quad G_8 = G_{\text{заг}} (C_8 / C_{\Sigma}) = 6,9 \times (0,1 / 7,19) = 0,09$$

Враховуючи малу кількість компонентів, їх стерилізація проводиться в колбах в автоклаві, при цьому конденсат не утворюється.

Етанол не стерилізується і подається безпосередньо в інокулятор. Тому для подальших розрахунків кількості конденсату та води від об'єму

поживного середовища віднімаємо необхідний об'єм етанолу, а від загальної маси компонентів масу етанолу. Концентрація етанолу в середовищі для отримання посівного матеріалу становить $\varphi_B = 0,5\%$ (об'ємна частка) або

$$C_1 = 3,95 \text{ г/л.}$$

Розраховуємо масу компонентів середовища без етанолу:

$$G_{\text{заг.без.етанолу}} = G_{\text{заг}} - G_1 = 6,9 - 3,8 = 3,1 \text{ г}$$

Розраховуємо об'єм етанолу:

$$V_{\text{етанол}} = \varphi_B \cdot V_{\text{пск}} = 0,005 \cdot 960 = 4,8 \text{ мл}$$

Розраховуємо об'єм середовища без етанолу:

$$V_{\text{кол2}} = V_{\text{пск}} - V_{\text{етанол}} = 960 - 4,8 = 955,2 \text{ мл}$$

Загальна кількість води, необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища, становитиме:

$$V_B = V_{\text{кол2}} - G_{\text{заг.без.етанолу}} = 955,2 - 3,1 = 952,1 \text{ мл}$$

Кількість води, необхідної для розчинення солей, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, мл:

$$\text{NaNO}_3 \quad V_{1B} = V_B (C_2 / C_{\Sigma}) = 952,1 \times (1,3 / 3,24) = 382$$

$$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} \quad V_{2B} = V_B (C_3 / C_{\Sigma}) = 952,1 \times (0,1 / 3,24) = 29,4$$

$$\text{NaCl} \quad V_{3B} = V_B (C_4 / C_{\Sigma}) = 952,1 \times (1 / 3,24) = 293,8$$

$$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \quad V_{4B} = V_B (C_5 / C_{\Sigma}) = 952,1 \times (0,6 / 3,24) = 176,3$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \quad V_{5B} = V_B (C_6 / C_{\Sigma}) = 952,1 \times (0,14 / 3,24) = 41,1$$

$$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} \quad V_{6B} = V_B (C_7 / C_{\Sigma}) = 952,1 \times (0,001 / 3,24) = 0,3$$

$$\text{CaCl}_2 \quad V_{7B} = V_B (C_8 / C_{\Sigma}) = 952,1 \times (0,1 / 3,24) = 29,4$$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, мл:

$$\text{Композиція А} \quad V_{AB} = 382 + 29,4 + 293,8 = 705,2$$

$$\text{Композиція Б} \quad V_{BB} = 176,3 + 41,1 + 29,4 = 247$$

Формування композицій наведено у табл. 4.12.

Таблиця 4.12

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 955,2 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
NaNO ₃	1,3	1,2	А	707,4
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,1	0,09		
NaCl	1	0,9		
Вода		705,2		
Na ₂ HPO ₄	0,6	0,6	Б	247,8
KH ₂ PO ₄	0,14	0,1		
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,001	0,001		
CaCl ₂	0,1	0,09		
Вода		247		
Разом:		955,2		955,2

4.4.3. Розрахунок матеріального балансу

Таблиця 4.13

Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, л	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, л
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл, г)			
1.1	NaNO ₃	1,2	Нестерильне ПС	955,2
1.2	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,09		
1.3	NaCl	0,9		
1.4	Na ₂ HPO ₄	0,6		
1.5	KH ₂ PO ₄	0,1		
1.6	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,001		
1.7	CaCl ₂	0,09		
1.8	Вода	952,2		
	Всього:	955,2	Всього:	955,2
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ (мл)			
2.1	Нестерильне ПС	955,2	Стерильне ПС	955,2

	Всього:	955,2	Всього:	955,2
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл)			
3.1	Стерильне ПС	955,2	Посівний матеріал	1010
3.2	Етанол	4,8		
3.3	Посівний матеріал з пробірок	50		
	Всього:	1010	Всього:	1010
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА 20 Л (мл, г)			
4.1	NaNO ₃	13,2	Нестерильне ПС	9133
4.2	MgSO ₄ ×7H ₂ O	1		
4.3	NaCl	10,2		
4.4	Na ₂ HPO ₄	6,1		
4.5	KH ₂ PO ₄	1,4		
4.6	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,01		
4.7	CaCl ₂	1		
4.8	Вода	9100		
	Всього:	9133	Всього:	9133
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА 20 Л (л)			
5.1	Нестерильне ПС	9,14	Стерильне ПС	10,15
5.2	Конденсат	1,01	(втрат немає)	0,0
	Всього:	10,15	Всього:	10,15
6	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ 20 Л (л)			
6.1	Стерильне ПС	10,15	Посівний матеріал	10,1
6.2	Етанол	0,05		
6.3	Посівний матеріал з колб на качалках	1		
6.4	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	1,12
	Всього:	11,2	Всього:	11,2
7	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА 200 Л (мл, г)			
7.1	NaNO ₃	131,3	Нестерильне ПС	90430
7.2	MgSO ₄ ×7H ₂ O	10,1		
7.3	NaCl	101		
7.4	Na ₂ HPO ₄	60,6		
7.5	KH ₂ PO ₄	14,1		
7.6	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,1		
7.7	CaCl ₂	10,1		
7.8	Вода	90100		
	Всього:	90430	Всього:	90430

8	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА 200 Л (л)			
8.1	Нестерильне ПС	90,4	Стерильне ПС	100,5
8.2	Конденсат	10,05	(втрат немає)	0,0
8.3	Всього:	100,5	Всього:	100,5
9	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ 200 Л (л)			
9.1	Стерильне ПС	100,5	Посівний матеріал	100
9.2	Етанол	0,5		
9.3	Посівний матеріал з інокулятора 20 л	10,1		
9.4	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	11,1
	Всього:	111,1	Всього:	111,1
10	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (кг, л)			
7.1	NaNO ₃	1,4	Нестерильне ПС	969,9
7.2	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,1		
7.3	NaCl	1		
7.4	Na ₂ HPO ₄	0,6		
7.5	KH ₂ PO ₄	0,15		
7.6	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,001		
7.7	CaCl ₂	0,1		
7.8	Вода	966,6		
	Всього:	969,9	Всього:	969,9
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (л)			
8.1	Нестерильне ПС	969,9	Стерильне ПС	1078
8.2	Конденсат	107,8	(втрат немає)	0,0
	Всього:	1078	Всього:	1078
9.	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ (л)			
9.1	Стерильне поживне середовище	1078	Культуральна рідина	1100
9.2	Етанол	22		
9.3	Посівний матеріал з інокулятора 200 л	100		
9.4	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	107,8
	Всього:	1207,8	Всього:	1207,8

Оскільки кількість культуральної рідини згідно матеріального балансу (1100 л) фактично співпадає із кількістю культуральної рідини, визначеної

відповідно у п. 3.1 розрахунку партій продукту (1100 л), вважаємо, що матеріальний баланс зроблено вірно.

4.4.4. Розрахунок та підбір ферментаційної та ємнісної апаратури

Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання

Уточнюючий розрахунок кількості ферментерів

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $K_3 = 0,5$:

$$V_{гф} = \frac{V_{\phi}}{K_{зап}} = \frac{1,2}{0,5} = 2 \text{ м}^3$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{нф} = 2 \text{ м}^3$.

Кількість виробничих ферментерів при заданому K_3 :

$$N_{\phi} = \frac{V_{гф}}{V_{нф}} = \frac{2}{2} = 1$$

Уточнення коефіцієнту заповнення не потребується. Приймаємо до установки ферментерів – 1 + 1 запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості інокуляторів об'ємом 200 л

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора 200 л при заданому $K_3 = 0,5$:

$$V_{гін1} = \frac{V_{ін1}}{K_{зап}} = \frac{111,1}{0,5} = 222,2 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом інокулятор: $V_{нін1} = 200 \text{ л}$.

Кількість інокуляторів об'ємом 200 л при заданому K_3 :

$$N_{ін1} = \frac{V_{гін1}}{V_{нін1}} = \frac{222,2}{200} = 1,1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення інокулятора об'ємом 200 л:

$$K_{зін1} = \frac{V_{ін1}}{V_{нін1} N_{ін1}} = \frac{111,1}{200 \times 1} = 0,55$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,5 – 0,65), приймаємо до установки інокуляторів – 1 + 1 запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості інокуляторів об'ємом 20 л

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора 20 л при заданому $K_z = 0,5$:

$$V_{гін2} = \frac{V_{ін2}}{K_{зап}} = \frac{11,2}{0,5} = 22,4 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом інокулятор:
 $V_{нін2} = 20 \text{ л}$.

Кількість інокуляторів об'ємом 20 л при заданому K_z :

$$N_{ін2} = \frac{V_{гін2}}{V_{нін2}} = \frac{22,4}{20} = 1,1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення інокулятора об'ємом 20 л:

$$K_{зін2} = \frac{V_{ін2}}{V_{нін2} N_{ін2}} = \frac{11,2}{20 \times 1} = 0,56$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,5 – 0,65), приймаємо до установки інокуляторів – 1 + 1 запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб

Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому $K_{колб} = 0,15$:

$$V_{гколб} = \frac{V_{колб}}{K_{зколб}} = \frac{1,01}{0,15} = 6,7 \text{ л}$$

Об'єм 1 качалочної колби $V_{нколб} = 0,75 \text{ л}$.

Кількість качалочних колб при заданому коефіцієнті заповнення $K_{колб} = 0,15$:

$$N_{колб} = \frac{V_{гколб}}{V_{нколб}} = \frac{6,7}{0,75} = 8,9 \text{ шт.}$$

Приймаємо 9 колб.

Розрахунок кількості збірників для приготування поживного середовища

Уточнюючий розрахунок кількості збірників для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2 м^3

а) Підбираємо геометричний об'єм збірника для композиції А.

Приблизний геометричний об'єм збірника при заданому $K_6 = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = \frac{V_{\text{А}}}{K_{\text{зб}}} = \frac{966,6}{0,8} = 1208 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник $V_{\text{нр}} = 1200 \text{ л}$.

Кількість збірників при заданому $K_{\text{зб}}$ становить:

$$N_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{Аг}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{1208}{1200} = 1,007 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення збірника:

$$K_{\text{зр}} = \frac{V_{\text{А}}}{V_{\text{нр}} \cdot N_{\text{Ар}}} = \frac{966,6}{1200 \times 1} = 0,8$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість збірників для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

б) Підбираємо геометричний об'єм збірника для етанолу. Приблизний геометричний об'єм збірника при заданому $K_{\text{зб}} = 0,8$:

$$V_{\text{Етанолу}} = \frac{V_{\text{етанолу}}}{K_{\text{зб}}} = \frac{22}{0,8} = 27 \text{ л}$$

Вибираємо з найближчий за номінальним об'ємом збірник: $V_{\text{нр}} = 30 \text{ л}$.

Кількість збірників при заданому $K_{\text{зб}}$ становить:

$$N_{\text{ет}} = \frac{V_{\text{Етанолу}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{27}{30} = 0,9 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення збірника:

$$K_{\text{зр}} = \frac{V_{\text{етанолу}}}{V_{\text{нр}} \cdot N_{\text{ет}}} = \frac{22}{30 \times 1} = 0,7$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість збірників для етанолу – 1 + 1 запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості збірників для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 200 л

а) Підбираємо геометричний об'єм збірника для композиції А.

Приблизний геометричний об'єм збірника при заданому $K_6 = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = \frac{V_{\text{А}}}{K_{\text{зб}}} = \frac{100,48}{0,8} = 125,6 \text{ л}$$

Оскільки серед стандартних немає збірника з об'ємом $V_{\text{нр}} = 130$ л, будемо замовляти. Кількість збірників при заданому $K_{\text{зб}}$ становить:

$$N_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{Аг}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{125,6}{130} = 0,96 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення збірника:

$$K_{\text{зр}} = \frac{V_{\text{А}}}{V_{\text{нр}} N_{\text{Ар}}} = \frac{100,48}{130 \times 1} = 0,77$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість збірників для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості збірників для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л

а) Підбираємо геометричний об'єм збірника для композиції А.

Приблизний геометричний об'єм збірника при заданому $K_6 = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = \frac{V_{\text{А}}}{K_{\text{зб}}} = \frac{10,14}{0,8} = 12,7 \text{ л}$$

Оскільки серед стандартних немає збірника з об'ємом $V_{\text{нр}} = 13$ л, будемо замовляти. Кількість збірників при заданому $K_{\text{зб}}$ становить:

$$N_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{Аг}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{12,7}{13} = 0,97 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення збірника:

$$K_{\text{зр}} = \frac{V_{\text{А}}}{V_{\text{нр}} N_{\text{Ар}}} = \frac{10,14}{13 \times 1} = 0,78$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість збірників для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

4.5. Специфікація обладнання

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведено у табл. 4.14.

Таблиця 4.14

Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
З-1	Збірник для приготування робочого розчину кальцинованої соди	1	Збірник об'ємом 1200 л, діаметр 1,1 м, висота 1,7 м, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100-450 об/хв), сталь AISI 304. Виробник: "Е4А" (Росія). ¹
Д-2	Дозатор	1	Дозатор ваговий ДМТ-50, діапазон зважування від 5 до 50 кг, похибка вимірювання 0,05-0,1 кг. Виробник: «Росат» (Росія). ²
Д-11 Д-16 Д-25	Ваги технічні електронні	3	Ваги технічні електронні AXIS BD3000/0.1, діапазон зважування від 0,1 г до 3 кг, клас точності IV (ГОСТ 24104-88). Виробник: «AXIS» (Польща) ³
Д-21 Д-23	Промисловий дозатор рідин	2	Електронний промисловий дозатор води та рідин Serv_W21, об'єм дозованої рідини від 0,1 до 999,9 л, похибка 1-1,5%. Компанія: «ФОП Нікітін О.М.» (Україна). ⁴
Д-27	Ваги технічні електронні	1	Ваги технічні електронні CAS AD-5, діапазон зважування від 1 г до 5 кг, клас точності середній(ГОСТ 24104-88). Виробник: «CAS», Південна Корея ⁵
Н-3	Насос циркуляційний	1	Насос відцентровий Wilo Star-RS 15/4-130. Продуктивність 4000 л/год, матеріал нержавіюча сталь AISI 304. Виробник: «Wilo» (Німеччина) ⁶
Н-13	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий Jet 200. Продуктивність 150 л/год, матеріал нержавіюча сталь AISI 304. Виробник: «Taifu» (Китай) ⁷
Н-18	Насос вихровий	1	Насос вихровий LEO 775120 Продуктивність 1680 л/год, матеріал - чугун з антикорозійною обробкою. Виробник: «LEO GROUP» (Китай) ⁸
Н-29	Насос	2	Насос вихровий Wilo Star-Z 20/7 EM.

Н-32	циркуляційний		Продуктивність 6000 л/год, матеріал - чугун з антикорозійною обробкою. Виробник: Виробник: «Wilо» (Німеччина) ⁹
ПЗ-4	Пристрій для забору повітря	1	Повітрозбірник з вуглецевої або нержавіючої сталі. Фірма: «Компресор-Захід», Україна. Повітрозабірник обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень ¹⁰
Ф-5	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G2. Фільтруючий матеріал – синтетичні волокна поліестера, вологостійкість до 100%, термостійкість до 80 °С. Виробник: Компанія «Ліаг Технік Сервіс Україна» ¹¹
К-6	Компресор	1	Компресор Ozen серії ТК-СК. Фірма: «Н Сервіс» (Україна). ¹²
Т-7	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник водяний Roen Est. Продуктивність від 16,9 до 105,6 кВт. Виробник: Італія. Фірма: «Олтан» (Україна). ¹³
Р-8	Ресивер	1	Ресивер зварний сталевий. Робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «Харпромтех» (Україна). ¹⁴
Т-9	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник водяний Roen Est. Продуктивність від 16,9 до 105,6 кВт. Виробник: Італія. Фірма: «Олтан» (Україна). ¹³
Ф-10	Головний фільтр очистки	1	Фільтр (Р)–GSL N. Фільтруючий матеріал – нержавіюча сталеві сітка, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, Е = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США). ¹⁵
Ф-14	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр АМЕ150С. Продуктивність – 200 л/хв, діапазон температур 5-60 °С, ступінь очищення становить 0,01 мкм. Виробник: «АМЕ» (Японія). ¹⁶
Ф-19	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр АМЕ250С. Продуктивність – 200 л/хв, діапазон температур 5-60 °С, ступінь очищення становить 0,01 мкм. Виробник: «АМЕ» (Японія). ¹⁶
Ф-30	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр АМЕ350С. Продуктивність – 200 л/хв, діапазон температур 5-60 °С, ступінь очищення становить 0,01 мкм. Виробник: «АМЕ» (Японія). ¹⁶
З-12	Збірник для композиції А	1	Збірник об'ємом 13 л, діаметр 0,4 м, висота 0,83 м, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100-450 об/хв), сталь AISI 316L. Виробник: "Eppendorf" (Німеччина) ¹⁷ .
ІН-15	Інокулятор	1	Інокулятор BioFlo-4500 об'ємом 20 л, діаметр 0,24 м, висота 0,47 м, оснащений сорочкою, барботером, турбінною мішалкою закритого типу (40-630 об/хв), трубою перетискування, пробовідбірником, сталь AISI 316L. Виробник: "Eppendorf" (Німеччина) ¹⁷
З-17	Збірник для композиції А	1	Збірник об'ємом 130 л, діаметр 0,78 м, висота 1,4 м, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100-450 об/хв), сталь AISI 316L. Виробник: "E4A" (Росія) ¹

ІН-20	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 200 л, діаметр 1,05 м, висота 2,1 м, оснащений сорочкою, барботером, турбінною мішалкою закритого типу (40-630 об/хв), трубою перетискування, пробовідбірником, сталь AISI 304. Виробник: "Mobius" (США) ¹⁸
З-22	Збірник для етанолу	1	Збірник для зберігання етанолу об'ємом 30 л, діаметр 0,48 м, висота 0,61 м, сталь AISI 316L. Виробник: «Е4А» (Росія). ¹
З-24	Збірник для хлоридної кислоти	1	Збірник BioFlo-110 об'ємом 3 л, діаметр 0,28 м, висота 0,56 м, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (50-1000 об/хв), сталь 316L. Виробник: "Eppendorf" (Німеччина) ¹⁴
З-26	Збірник для натрій гідроксиду	1	Збірник BioFlo-110 об'ємом 3л, діаметр 0,28 м, висота 0,56 м, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (50-1000 об/хв), сталь 316L. Виробник: "Eppendorf" (Німеччина) ¹⁷
З-28	Збірник для композиції А	1	Збірник об'ємом 1200 л, діаметр 1,1 м, висота 1,7 м, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100-450 об/хв), сталь AISI 304L. Виробник: «Е4А» (Росія). ¹
ФР-31	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 2000 л, діаметр 1,75 м, висота 3,5 м, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, турбінною мішалкою закритого типу (40-400 об/хв), сталь AISI 304L. Виробник: «Мобіус» (США). ¹⁸

Примітка*: пошук і підбір обладнання здійснювали з використанням наступних електронних джерел:

- 1 – <https://e4a.ru>
- 2 – http://rosat.ru/dozator_sypuchix_dmt
- 3 – <https://unipro.com.ua/ru/vesy-tehnicheskie-elektronnye-axis-bd3000-0-1--npv--3000-g--d-0-1-g->
- 4 – <https://prom.ua/p491625353-elektronnyj-promyshlennyj-dozator.html>
- 5 – <https://unipro.com.ua/ru/vesy-tehnicheskie-elektronnye-cas-ad-5--npv--5-kg--d-1-g->
- 6 – <https://f.ua/wilo/star-rs-15-4-130.html>
- 7 – <https://f.ua/tai-fu/nasos-centrofejnyy-samovsasiyvayushey-jet-200-1-5-kvt.html>
- 8 – <https://f.ua/leo/vihrevoy-0-25kvt-775120.html>
- 9 – <https://f.ua/wilo/star-z-20-7-em.html>

- 10 – <https://korosten.flagma.ua/povitrozbirnik-vid-virobnika-o4174974.html>
- 11 – <https://prom.ua/p985243888-filtr-gruboj-ochistki.html>
- 12 – <https://prom.ua/p2510238-porshnevye-promyshlennye-kompressory.html>
- 13 – <https://alltan.com.ua/p2090292-teploobmennik-vodyanoj.html>
- 14 – <http://harprom.com/product-category/resiveri>
- 15 – <http://www.emea.donaldson.com>
- 16 – <https://tiu.ru/p182354565-filtr-sverhtonkoj-ochistki.html>
- 17 – http://www.awt.ru/datas/catalogs/data_files/fermenters_bioreactors.pdf
- 18 – <https://www.merckmillipore.com/NL/en/product>

4.6. Опис технологічної схеми одержання поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017

Технологічна схема біосинтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, приготування титрувальних розчинів, підготовка та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес, що передбачає підготовку посівного матеріалу та біосинтез ПАР.

Технологічну схему одержання поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 наведено у графічній частині дипломної роботи.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка мийних та дезінфікуючих засобів

ДР 1.1.1. Приготування робочого розчину кальцинованої соди

Відповідно до даних 2 розділу, потрібно приготувати 713 л робочого розчину миючого засобу з концентрацією 2%. Для цього у збірник 3-1 об'ємом 1000 л вносять 14,2 кг порошку соди за допомогою дозатора Д-2 та 712 л питної води, об'єм якої контролюється ротаметром, вмикають перемішуючий пристрій, для кращого розчинення подають в сорочку глуху пару. Розчин підігрівають до температури 55°C перед початком подачі його на миття обладнання.

ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину «Хлорантоїну»

Кількість робочого розчину «Хлорантоїну» концентрацією 0,2 % для прибирання становить 7 л. Миючий розчин готують в резервуарі об'ємом 10 л. Готовий розчин охолоджують до оптимальної температури та використовують за призначенням.

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання виробничих приміщень

Щоденне прибирання приміщень, а саме миття підлоги, проводиться кожного дня вологим способом. При цьому із виробничої дільниці, лабораторних, побутових, підсобних приміщень видаляють готову продукцію, напівпродукти, відходи виробництва та невикористані матеріали. Відпрацьовані розчини направляють на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 7.1). Здійснюють мікробіологічний аналіз приміщення з метою контролю чистоти ($KУО < 800/см^2$).

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень

Один раз на місяць проводять миття стін, вікон та дверей з використанням 0,2% робочого розчину «Хлорантоїну» (від ДР 1.1.2). Використані дезінфікуючі розчини направляють на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 7.1). Здійснюють мікробіологічний аналіз приміщення з метою контролю чистоти ($KУО < 300/см^2$).

ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання

Обладнання миють з використанням робочого розчину кальцинованої соди з концентрацією 2% (від ДР 1.1.1), підігрітого до температури 55°C. Миття обладнання здійснюється автоматизовано, за допомогою СІР-мийки, при цьому використовується мийний засіб в об'ємі 20% від геометричного об'єму обладнання. Обробку проводять 15-20 хвилин, після чого відпрацьований розчин подають на відновлення або зливають (до ЗВ 7.1). Після обробки обладнання промивається питною водою таким же чином, відпрацьована вода йде на переробку.

ДР 1.3.2. Технічний огляд

Технічний огляд обладнання здійснюють після миття та ополіскування з метою виявлення нещільностей в комунікаціях чи запірній арматурі на обладнанні. При виявленні неущільнених ділянок, проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність

Закривають всю запірну арматуру ємнісного обладнання та подають аераційне повітря до рівня надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Потім перекривають вентиль подачі повітря та фіксують показання манометра на кришці апарата, а також тривалість витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Апарат вважають герметичним, якщо падіння тиску ставить не більше 0,01 МПа. В іншому випадку за допомогою галогенових течієпошукачів проводять пошук неущільнень.

Невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон – CCl_4) вносять в апарат, закривають усю запірну арматуру. Апарат нагрівають до температури 80 °С, збільшуючи тиск до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через неущільнення та виявляються при наближенні щупа течієпошукача до них. Тривалість операції складає 1,5-2 год. У разі виявлення неущільнень підтягують різьбове з'єднання або здійснюють заміну ущільнюючої прокладки.

ДР 1.3.4. Стерилізація обладнання

Стерилізацію проводять протягом 1,5 год гострою парою з температурою 110°С за тиску 0,2 МПа. Пару подають безпосередньо в апарат, а також прилеглі комунікації і сорочку. З метою охолодження обладнання подають холодну воду в сорочку. Для компенсації падіння тиску в апарат подають стерильне повітря. Охолодження здійснюють до досягнення температури 30-40°С та надлишкового тиску $P=0,003-0,005$ МПа, процес триває 0,5 год.

ДР 1.4. Підготовка персоналу

ДР 1.4.1. Навчання персоналу

Весь персонал, включно з людьми, зайнятими складанням і технічним обслуговуванням, має проходити систематичне навчання щодо правильного виробництва продукції в асептичних умовах, гігієни і основ мікробіології.

ДР 1.4.2. Санітарно-гігієнічна підготовка персоналу

Для миття рук персонал використовує господарське чи туалетне мило, для дезінфекції – розчин етилового спирту з концентрацією 76%.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Забір атмосферного повітря для забезпечення аераційних процесів виробництва здійснюють на висоті 8 м (ПЗ-4).

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення повітря

Повітря пропускають через фільтр, набитий поліестерними волокнами (Ф-6), де відбувається відділення крупних часток бруду та затримка пилу до ступеня очищення 75%.

ДР 2.3. Подача повітря на компресор

Стиснення повітря проводиться у компресорі (К-6) до тиску 0,4 МПа, температура повітря зростає від 120 до 250°C.

ДР 2.4. Охолодження повітря і видалення вологи

Після компресування вміст вологи у повітрі збільшується, з метою виведення вологи повітря охолоджують до 18-19°C у теплообміннику (Т-7). Далі повітря подають до ресивера (Р-8), де відбувається відділення зайвої вологи до вмісту $W=60\%$.

ДР 2.5. Підігрів повітря

З метою зниження ризику конденсації вологи на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, повітря підігрівають у теплообміннику-нагрівачі (Т-9) до температури 30-35°C.

ДР 2.6. Тонке очищення повітря

Нагріте повітря подають на головний фільтр очистки (Ф-10) з фільтруючим матеріалом у вигляді нержавіючої сітки. Ступінь очищення складає $E=95\%$.

ДР 2.7. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах

Перед кожним інокулятором та виробничим ферментером (ІН-15, ІН-20, ФР-31), установлюють індивідуальні фільтри (Ф-14, Ф-19, Ф-30). При використанні у якості фільтруючого матеріалу боросилікату, ступінь очищення становить $E=99,999\%$.

ДР 3. Приготування титрувальних агентів для титрування поживного середовища

ДР 3.1. Приготування 6% розчину HCl

ДР 3.1.1. Приготування запасного 6% розчину HCl

Для інокуляторів об'ємами 20 і 200 л готують запасний розчин 6% хлоридної кислоти.

Під витяжною шафою у колбу об'ємом 300 мл вносять 167,2 мл дистильованої води і обережно при перемішуванні та охолодженні додають 57,2 мл 37%-ї хлоридної кислоти. Колбу закривають гумовою пробкою. Отриманий розчин стерилізації не потребує.

ДР 3.1.2. Приготування 6% розчину HCl для ферментера об'ємом 2 м³

У збірник З-24 об'ємом 3 л вносять 1640 мл питної води, об'єм якої контролюється ротаметром, і за допомогою дозатора Д-23 додають 560 мл 37%-ї хлоридної кислоти. В сорочку подають холодну воду і вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв). Отриманий розчин стерилізації не потребує.

ДР 3.2. Приготування стерильного 6% розчину NaOH

ДР 3.2.1. Приготування стерильного запасного 6% розчину NaOH для інокулятора об'ємом 20 л

У колбу об'ємом 50 мл вносять 1,2 г кристалічного натрій гідроксиду і додають 19 мл дистильованої води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при 131°C і тиску 0,15 МПа.

ДР 3.2.2. Приготування стерильного 6% розчину NaOH для інокулятора об'ємом 200 л

У колбу об'ємом 500 мл вносять 12 г кристалічного натрій гідроксиду, додають 190 мл дистильованої води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при 131°C і тиску 0,15 МПа.

ДР 3.2.3. Приготування стерильного 6% розчину NaOH для ферментера об'ємом 2 м³

На технічних вагах Д-25 зважують 140 г кристалічного NaOH, вносять у збірник 3-26 об'ємом 3 л і додають 2,2 л питної води, об'єм якої контролюється ротаметром, вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв). Робочий розчин стерилізують протягом 40 хв при температурі 131°C та тиску 0,15 МПа.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування та стерилізація запасного розчину феруму сульфату

На технічних вагах зважують 1 г FeSO₄×7H₂O та вносять у колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл дистильованої води і перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують 40 хв при температурі 131 °C та тиску 0,15 МПа.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 1010 мл в колбах на качалках

На даному етапі необхідно приготувати 955 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища (ПС) у колбах на качалках об'ємом 955 мл наведено у таблиці 4.15.

Таблиця 4.15

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 955 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
NaNO ₃	1,3	1,2	A	700

MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,1	0,09		
NaCl	1	0,9		
Вода		700		
Na ₂ HPO ₄	0,6	0,6	Б	250
KH ₂ PO ₄	0,14	0,1		
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,001	0,001		
CaCl ₂	0,1	0,09		
Вода		250		
Разом:		955		955,2

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1,2 г NaNO₃, 0,09 г MgSO₄×7H₂O та 0,9 г NaCl, переносять в колбу об'ємом 2 л, додають 700 мл питної води і перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,6 г Na₂HPO₄, 0,1 г KH₂PO₄, 0,09 г CaCl₂, переносять в колбу об'ємом 500 мл, додають 250 мл питної води і перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 131°С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л

Для одержання інокуляту на даному етапі потрібно приготувати 10,2 л поживного середовища. Необхідна кількість посівного матеріалу складе 1 л, етанолу – 0,05 л, ферум сульфату – 1,1 мл (від ДР 4.1). Вміст компонентів для приготування поживного середовища для інокулятора 20 л наведено у таблиці 4.16.

Таблиця 4.16.

Склад композицій для стерилізації поживного середовища в інокуляторі 20 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 10150 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
NaNO ₃	1,3	13,2	А	9133

MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,1	1		
NaCl	1	10,2		
Na ₂ HPO ₄	0,6	6,1		
KH ₂ PO ₄	0,14	1,4		
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,001	0,01		
CaCl ₂	0,1	1		
Вода		9100		
Конденсат		1010		1010
Разом:		10150		10150

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах Д-11 зважують 13,2 г NaNO₃, 1 г MgSO₄×7H₂O, 10,2 г NaCl, 6,1 г Na₂HPO₄, 1,4 г KH₂PO₄, 1 г CaCl₂, вносять у збірник З-12 об'ємом 13 л, додають 9,1 л питної води, об'єм якої контролюється ротаметром, вмикають перемішуючий пристрій та подають пару в сорочку для досягнення температури 40°C до повного розчинення солей. Приготований розчин зі збірника подають в інокулятор ІН-15 та підкислюють розчином НСІ (від ДР 3.1.1) до рН 4-4,5, після чого проводять стерилізацію протягом 1 год за температури 131 °С.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 200 л

Для одержання інокуляту на даному етапі необхідно приготувати 101 л поживного середовища. Необхідна кількість посівного матеріалу складе 10,1 л, етанолу – 0,5 л. Вміст компонентів для приготування поживного середовища для інокулятора 200 л наведено у таблиці 4.17.

Таблиця 4.17

Склад композицій для стерилізації поживного середовища в інокуляторі 200 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 100500 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
NaNO ₃	1,3	131,3	А	90430
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,1	10,1		
NaCl	1	101		
Na ₂ HPO ₄	0,6	60,6		

KH ₂ PO ₄	0,14	14,1		
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,001	0,1		
CaCl ₂	0,1	10,1		
Вода		90100		
Конденсат		10050		10050
Разом:		100500		100500

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах Д-16 зважують 131,3 г NaNO₃, 10,1 г MgSO₄×7H₂O, 101 г NaCl, 60,6 г Na₂HPO₄, 14,1 г KH₂PO₄, 0,1 г FeSO₄×7H₂O та 10,1 г CaCl₂, вносять у збірник 3-17 об'ємом 130 л, додають 90 л питної води, об'єм якої контролюється ротаметром, вмикають перемішуючий пристрій та подають пару в сорочку для досягнення температури 40°C до повного розчинення солей. Приготований розчин зі збірника подають в інокулятор ІН-20 та підкислюють розчином НСІ (від ДР 3.1.1) до рН 4-4,5, після чого проводять стерилізацію протягом 1 год за температури 131 °С.

ДР 4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2 м³

На даному етапі необхідно приготувати 1100 л поживного середовища. Необхідна кількість посівного матеріалу складе 100 л, етанолу – 22 л. Вміст компонентів для приготування поживного середовища для ферментера 2 м³ наведено у таблиці 4.18.

Таблиця 4.18

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у ферментері 2 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1078 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
NaNO ₃	1,3	1,4	А	969,9
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,1	0,108		
NaCl	1	1,08		
Na ₂ HPO ₄	0,6	0,65		
KH ₂ PO ₄	0,14	0,15		
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,001	0,001		

CaCl ₂	0,1	0,108	
Вода		966,6	
Конденсат		107,8	107,8
Разом:		1078	1078

ДР 4.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах Д-27 зважують 1,4 кг NaNO₃, 0,108 кг MgSO₄×7H₂O, 1,08 кг NaCl, 0,65 кг Na₂HPO₄, 0,15 кг KH₂PO₄, 0,001 кг FeSO₄×7H₂O та 0,108 кг CaCl₂, вносять у збірник 3-29 об'ємом 1200 л, додають 967 л питної води, об'єм якої контролюється ротаметром, вмикають перемішуючий пристрій та подають пару в сорочку для досягнення температури 40°C до повного розчинення солей. Приготований розчин зі збірника подають у ферментер ФР-31 та підкислюють розчином HCl (від ДР 3.1.2) до рН 4-4,5, після чого проводять стерилізацію протягом 1 год за температури 131 °С.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

*ТП 5.1. Підтримання колекційної культури *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017*

Колекційну культуру штаму ІМВ Ас-5017 зберігають у пробірках зі скошеним МПА, здійснюють пересіви кожні 3-4 місяці. При роботі з колекційною культурою забезпечуються строго асептичні умови.

*ТП 5.2. Одержання *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на агаризованому середовищі*

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з МПА, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашках Петрі з агаризованим м'ясо-пептонним середовищем в асептичних умовах. Вирощують при температурі 30°C упродовж 24 год.

*ТП 5.3. Вирощування робочої культури *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на агаризованому середовищі*

Мікробіологічною петлею пересівають ізольовані колонії на пробірки зі скошеним м'ясо-пептонним агаром із розрахунку – одна ізольована колонія

на окрему пробірку. Вирощування робочої культури здійснюють у пробірках при 30 °С впродовж 24 год.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

У колбу об'ємом 2 л із 700 мл розчину композиції А (від ДР 4.3.1) в асептичних умовах вносять 250 мл розчину композиції Б (від ДР 4.3.2), 0,096 мл запасного розчину сульфату заліза (від ДР 4.1). Розчин перемішують і розливають по 106 мл в 9 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл. У кожену колбу окремо вносять по 2,2 мл етилового спирту.

У пробірки з *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 (від ТП 5.3) вносять по 10,6 мл фізіологічного розчину, суспендують та вносять у колби з поживним середовищем. Культивування бактерій здійснюється у колбах на качалці (320 об/хв) при 28°С упродовж 48 год.

Після завершення культивування здійснюють відбір проб для визначення концентрації біомаси ($C = 1,0-1,1$ г/л) та проведення мікробіологічного контролю.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л

В інокуляторі ІН-15 зі стерильною композицією А (від ДР 4.4.1) середовище нейтралізують 6 %-м розчином NaOH (від ДР 3.2.2). Потім через засівну колбу подають 50 мл етанолу та посівний матеріал від ТП 4.4. Параметри культивування: рН 6,8-7, витрати повітря 0,2-1,2 л/л середовища за хв, 24 год за температури 28-30 °С та обертів мішалки 40-630 об/хв. Кожні 3-4 години здійснюють відбір проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ($C = 1,0-1,1$ г/л).

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 200 л

В інокуляторі ІН-20 зі стерильною композицією А (від ДР 4.5.1) середовище нейтралізують 6 %-м розчином NaOH (від ДР 3.2.3). Потім через засівну колбу подають 500 мл етанолу. Посівний матеріал від ТП 5.5 надходить самопливом від ІН-15. Параметри культивування: рН 6,8-7, витрати повітря 0,2-1,2 л/л середовища за хв, 24 год за температури 28-30 °С та обертів мішалки 40-630 об/хв. Кожні 3-4 години здійснюють відбір проби

для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ($C = 1,0-1,1$ г/л).

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 2 м³

У ферментер ФР-31 об'ємом 2 м³, де знаходиться композиція А (від ДР 4.6.1), самопливом надходить 6 % розчин NaOH (від ДР 3.2.3) зі збірника З-26 для нейтралізації середовища. Зі збірника З-22 об'ємом 30 л у ферментер самопливом надходить 22 л етанолу. Через трубу перетискування вносять посівний матеріал (від ТП 5.6). Параметри культивування: рН 6,8-7, витрати повітря 0,2-1,2 л/л середовища за хв, 72 год за температури 30 °С та обертів мішалки 40-400 об/хв. Кожні 4-6 години здійснюють відбір проби культуральної рідини для контролю показників росту та синтезу, а також для мікробіологічного контролю.

Наприкінці культивування визначають такі показники біосинтезу, як концентрація біомаси ($C = 2,0-2,2$ г/л) та концентрація ПАР ($C_1 = 1,8-2,0$ г/л).

ЗВ 7. Знешкодження відходів

ЗВ 7.1. Знешкодження рідких відходів

Розчини мийно-дезінфікувальних засобів від ДР 1.2.1, ДР 1.2.2, ДР 1.3.1 утилізують, їх направляють на очисні споруди.

ЗВ 7.2. Знешкодження повітряних відходів

Відпрацьоване повітря, яке надходить від інокуляторів та ферментера (від ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 6.1) відправляють у системи очищення повітряних відходів.

4.7. Контроль виробництва поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017

Постадійний контроль виробництва ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 наведено в табл. 4.19.

Таблиця 4.19

Карта постадійного контролю біосинтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кх 1.1.1 Приготування робочого розчину кальцинованої соди	Концентрація кальцинованої соди	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=2%
Кх 1.1.2 Приготування робочого розчину Хлорантоїну	Концентрація Хлорантоїну	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,2%
Км 1.2.1 Щоденне прибирання виробничих приміщень	Підлога, обладнання. Чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Відсутність бруду та пилу
Км 1.2.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень	Підлога, стіни, вікна, двері, обладнання. Чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після прибирання	Відсутність бруду та пилу, КУО <500/см ²
Кт 1.3.1 Миття та ополіскування обладнання	Концентрація мийного розчину, час миття, температура, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час операції	C=2%, t=45°C, τ=1 год, чисте обладнання
Кт 1.3.2 Технічний огляд	Міцність з'єднань	Перевірка на міцність з'єднань	Перед перевіркою на герметичність	Відсутність послаблення між частинами на обладнанні

Кт 1.3.3 Перевірка на герметичність	Герметичність обладнання, час перевірки	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно протягом перевірки	$P=0,1-0,2$ МПа, $\tau=30-60$ хв
Кт 1.3.4 Стерилізація обладнання	Температура стерилізації, тиск під час стерилізації, тривалість	Технічний манометр, годинник	Тиск визначається протягом стерилізації	$t=110^{\circ}\text{C}$, $P=0,2$ МПа, $\tau=30-60$ хв
Кт 2.1 Забір повітря	Висота забору повітря	Висота труби забору	Протягом всього циклу виробництва	$H=10$ м
Кт 2.2 Попереднє грубе очищення	Очищене повітря, ступінь очищення повітря на виході з фільтра, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі грубого очищення	$E=75\%$, тиск згідно паспорту
Кт 2.3 Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Повітря після компресування	$P=0,4$ МПа, $t=250^{\circ}\text{C}$
Кт 2.4 Охолодження повітря і видалення вологи	Охолоджене повітря, температура	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря і видалення вологи	$t=18-19^{\circ}\text{C}$, $W=60\%$
Кт 2.5 Підігрів повітря	Підігріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагріву повітря	$t=30-35^{\circ}\text{C}$
Кт 2.6 Очищення повітря на головному фільтрі	Очищене повітря, перепади тисків, ступінь очищення повітря на виході з фільтра	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі головного очищення	$E=95\%$, тиск згідно паспорту
Кт 2.7 Очищення повітря на індивідуальних фільтрах	Очищене повітря, ступінь очищення повітря	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра	Під час очищення повітря на індивідуальних фільтрах	$E=99,999\%$
Кх 3.1.1 Приготування запасного 6% розчину НСІ	Концентрація НСІ	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C=6\%$
Кх, 3.1.2 Приготування 6% розчину НСІ для виробничого ферментера	Концентрація НСІ	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C=6\%$

об'ємом 2 м ³				
Кх, Кт, Км 3.2.1 Приготування стерильного 6% розчину NaOH для інокулятора об'ємом 20 л	Концентрація NaOH, температура, час, стерильність	Хімічний метод, термометр, годинник	Після приготування розчину, тиск і температуру перевіряють безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод	C=6%, t=131°C, P=0.15 МПа, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 3.2.2 Приготування стерильного 6% розчину NaOH для інокулятора об'ємом 200 л	Концентрація NaOH, температура, час, стерильність	Хімічний метод, термометр, годинник	Після приготування розчину, тиск і температуру перевіряють безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод	C=6%, t=131°C, P=0.15 МПа, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 3.2.3 Приготування стерильного 6% розчину NaOH для ферментера об'ємом 2 м ³	Концентрація NaOH, температура, час, стерильність	Хімічний метод, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрацію визначають після приготування розчину, тиск і температуру перевіряють безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод	C=6%, t=131°C, P=0.15 МПа, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 4.1 Приготування та стерилізація запасного розчину ферум сульфату	Концентрація ферум сульфату, температура, час, стерильність	Хімічний метод, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація після приготування розчину, тиск і температуру перевіряють безперервно протягом стерилізації, мікробіологічний метод	C=1%, t=131°C, P=0.15 МПа, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	P=0,15 МПа, t=131°C, τ=40 хв, відсутність мікробіоти

Кт, Км 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, метод мікробіологічного контролю	P=0,15 МПа, t=131°C, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л	Композиція А, температура, час, рН, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131°C, τ=1 год, рН 4,5, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 200 л	Композиція А, температура, час, рН, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131°C, τ=1 год, рН 4,5, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.5.1 Приготування і стерилізація композиції А для ферментера об'ємом 2 м ³	Композиція А, температура, час, рН, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131°C, τ=1 год, рН 4,5, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура, температура, мікробіологічна чистота культури	Холодильник	Мікробіологічний контроль	t=4°C, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.2 Одержання робочої культури <i>R. erythropolis</i> ІМВ Ас-5017 на агаризованому середовищі	Пересіяна культура, чашки Петрі з МПА, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термостат, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після вирощування культури	t=30°C, τ=24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3 Вирощування робочої культури	Пересіяна культура, пробірки з МПА,	Термостат, мікроскоп, мікробіологічний	Мікробіологічний контроль після	t=30°C, τ=24 год, відсутність сторонньої

<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017 на агаризованому середовищі	температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	контроль	вирощування культури	мікробіоти
Кт, Км 5.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування інокуляту в колбах на качалках	t=28°C, τ=48 год, ω=320 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 5.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, рН, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН-датчик, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування	t=28-30°C, τ=24 год, рН 7,0, C _{біомаси} = 1,0-1,1 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 5.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 200 л	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, рН, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН-датчик, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування	t=28-30°C, τ=24 год, рН 7,0, C _{біомаси} = 1,0-1,1 г/л відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 2 м ³	Культуральна рідина, температура, рН, тривалість культивування, концентрація ПАР, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН-датчик, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль та визначення рівня біомаси проводять кожні 4 годин, концентрація ПАР визначається після закінчення процесу культивування	t=30°C, τ=72 год, рН 7,0, C _{біомаси} =2,0-2,2 г/л, C _{ПАР} = 1,8-2,0 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

Протягом культивування кожні 4 години відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю визначення концентрації біомаси та поверхнево-активних речовин, а також джерел вуглецю (етанол) та азоту (нітрат натрію).

4.7.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється шляхом розсіву культури на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопіюванням.

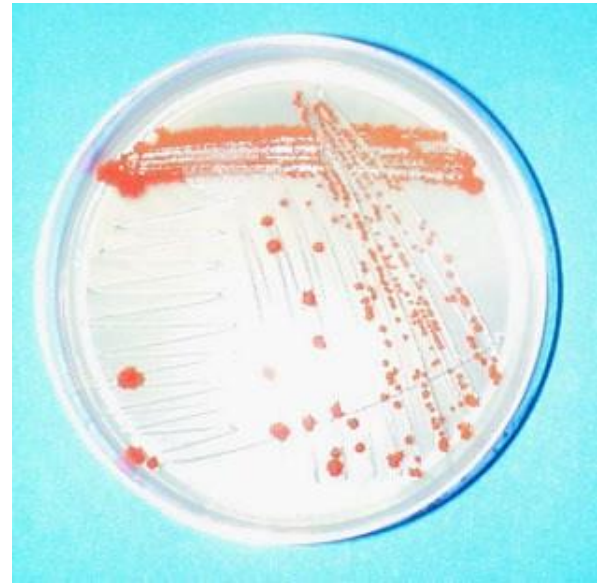
Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з триптон-соєвим агаром (ТСА) або м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) – для виявлення дріжджів та грибів [91].

Характерною рисою бактерій роду *Rhodococcus* є явище плеоморфізму, яке полягає у відмінностях морфології клітин на різних стадіях клітинного циклу. Клітини 12-годинної культури мають форму ниток, які розпадаються на паличкоподібні форми внаслідок фрагментації, а до 24 години росту культури спостерігають наявність коковидних та паличкоподібних форм. Тому представники роду *Rhodococcus* мають характерний клітинний цикл розвитку: «коки – гіфоподібні розгалужені форми – палички – коки».

Клітини *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 при рості на МПА утворюють зморшкуваті колонії неправильної форми з нерівними краями, шорохуваті, непрозорі, рожевого чи оранжевого забарвлення з матовою поверхнею. Розміри клітин 0,6-1,1 x 4,0-10 мкм (рис. 4.4., б) [92].



а



б

Рис. 4.4. Культура *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 : а – колонії під мікроскопом(х90); б –на агаризованому середовищі .

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю розподіляють по склу петлею (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1-2 краплини імерсійного масла. Після роботи ваткою, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об'єктива.

4.7.2. Показники росту і синтезу

Визначення кількості синтезованих поверхнево-активних речовин

Концентрацію ПАР визначають ваговим методом після екстракції із супернатанту за допомогою суміші Фолча [93].

Супернатант отримували центрифугуванням постферментаційної культуральної рідини при 5000 g протягом 15 хвилин. У ділільну воронку об'ємом 200 мл вносили 50 мл супернатанту, додавали 50 мл суміші Фолча (хлороформ і метанол в співвідношенні 2:1) , закривали воронку притертою

пробкою і струшували протягом 5 хв для екстракції поверхнево-активних ліпідів. Отриману суміш залишали у ділильній воронці, потім нижню фазу зливали (органічний екстракт 1), а водну фазу піддавали повторній екстракції, як описано вище. Після розділення фаз нижню фракцію зливали, отримуючи органічний екстракт 2. Далі до водної фази додавали 50 мл суміші Фолча, здійснювали екстракцію та одержували органічний екстракт 3. Екстракт 1-3 об'єднували та упарювали на роторному апараті при 60 °С та абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси [93].

Визначення концентрації біомаси

Визначення біомаси проводять ваговим методом після осадження клітин центрифугуванням (25 хв при 8000 об/хв). Далі відмиті клітини висушують, зважують і визначають біомасу[94].

4.7.3. Визначення концентрацій джерела вуглецю та азоту

Визначення етанолу

Вміст етанолу визначали за допомогою газорідинної хроматографії у супернатанті, який одержують центрифугуванням культуральної рідини (5000 об/хв, 45 хв) [95].

Для визначення використовували газовий хроматограф моделі Agilent 6890 (рис. 4.5.), який оснащений полум'яно-іонізаційним детектором, капілярною колонкою DB-FFAP розміром 30 м × 0,53 мм × 1,5 мкм. Початкова температура колонки 80 °С, робоча – 180 °С, детектора – 250 °С, інжектора – 200 °С.



Рис.4.5. Газовий хроматограф Agilent 6890

Тривалість витримки досліджуваних і стандартних зразків (об'єм 1 мкл) становить 1 хв. Як стандартний зразок використовують абсолютний етанол (99 %+). Газом носієм є інертний газ (азот), швидкість потоку якого становить 5 мл/хв [95].

Визначення нітратного азоту

Визначення нітратного азоту у супернатанті культуральної рідини (5000 г, 45 хв) здійснювали за допомогою ВЕРХ (Shimadzu HPLC system, Columbia, Maryland, USA) [26].

Метод засновано на перетворенні нітрату в нітрит за допомогою нітратредуктази з наступним перетворенням нітриту з 2,3-діамінонафталеном у кислому середовищі з отриманням 2,3-нафтотриазолу. Нафтотриазол аналізували на 5 мкм колонці С18 (250x4,6 мм), оточеною 10 мкм С18 колонкою (20x4,6 мм), та елюювали 15мМ фосфатним буфером (рН 7,5), що містить 35% ацетонітрил (швидкість потоку 1,0 мл/хв.). Середній час утримання нафтотриазолу – 12,4 хв [96].

РОЗДІЛ 5. АВТОМАТИЗАЦІЇ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

Технічне завдання для створення схеми автоматизації у вигляді показників які необхідно контролювати наведено в *табл..1*.

Таблиця .5.1

Завдання на розробку системи автоматизації

Параметр, місце відбору імпульсу	Значення параметру допустимі відхилення	Система автоматизації		
		Вид системи автоматизації	Характер контролю, регулювання, управління	Додаткові вимоги
Температура в апараті	$30 \pm 2^\circ\text{C}$	Контроль, регулювання	Моніторинг	Керування аналоговим пневматичним клапаном (подача води у сорочку)
			Підтримання на заданому значенні	
			Сигналізація при значному відхиленні (світлова)	
Оберти перемішуючого пристрою	380-400 об/хв	Контроль, управління	Покази	Керування двигуном (дискретне)
			Пуск/стоп	
			Сигналізація (світлова)	
Вміст розчиненого кисню в апараті	0,2-1,2 л/л	Контроль, регулювання	Моніторинг	Керування аналоговим пневматичним клапаном (подача стисненого очищеного повітря)
			Підтримання на заданому значенні	
			Сигналізація при значному відхиленні (світлова)	
Рівень рН	6,8-7,0	Контроль, регулювання	Моніторинг	Керування аналоговим пневматичним клапаном (подача розчину NaOH)
			Підтримання на заданому значенні	
			Сигналізація	

НУХТ БТЕК 04.01.03 ДР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Ярова Г.А.		
Перевір.		Пирог Т.П.		
Консультант		Клименко О.М.		
Н. Контр.				
Затверд.		Пирог Т.П.		
РОЗДІЛ 5. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА				
		Літ.	Арк.	Аркушів
		124	4	4
Кафедра БТМ				

5.1. Опис функціональної схеми автоматизації

Контур 1. Необхідно контролювати і регулювати значення величини рН в ферментері, який має регламентоване значення 6,8-7,0 од.рН. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві. Для регулювання значенням величини рН передбачається його стабілізація на заданому значенні за рахунок зміни подачі окислювача в апарат. На схемі автоматизації на трубопроводі подачі пари показуємо зображення регулюючого органу і виконавчого механізму, до якого буде під'єднуватись лінія зв'язку, яка буде виходити з ПК і ПЛК. Прилад для вимірювання складаються з двох частин: самого датчика і вторинного перетворювача, який перетворює сигнал від датчика в уніфікований електричний сигнал, зображення яких на схемі автоматизації показано у прямокутнику «Прилади по місцю». І вже після них сигнал поступає на аналоговий вхід ПЛК.

У нас передбачається аналогове регулювання, в якому використовується аналоговий пневматичний виконавчий механізм для керування яким необхідно передбачити електро-пнеumo перетворювач, який показується на схемі автоматизації у прямокутнику «Щит перетворювачів». На нього поступає сигнал з ПЛК, який в свою чергу отримує сигнал з АРМа оператора технолога.

Контур 2. Показник вмісту розчиненого кисню у культуральній рідині вимірюється рідинним газоаналізатором. Аналоговий сигнал від датчика подається на МПК перетворюючись у цифровий, і в залежності від інтенсивності споживання кисню мікроорганізмами, автоматично дозується подача аераційного повітря в ферментер регулюючим органом – аналоговою заслінкою, що приводиться в дію за допомогою мембранного виконавчого механізму. Уніфікований пневматичний сигнал до ВМ надходить з електро-пневмоперетворювача.

Контур 3. Температура культуральної рідини вимірюється постійно за допомогою термоелектричного перетворювача. Сигнал від термодатчика у

вигляді величини термоелектрорушійної сили (ТЕРС) надходить до нормуючого перетворювача і перетворюється в уніфікований електричний сигнал. Останній йде до МПК, конвертується у цифровий. При відхиленнях температури (екзотермічний процес) подача води технічної холодної в сорочку інокулятора автоматично дозується регулюючим органом – аналоговою заслінкою, що приводиться в дію за допомогою мембранного виконавчого механізму. Уніфікований пневматичний сигнал до ВМ надходить з електро-пневмоперетворювача.

Регулювання перемішуючого пристрою. При натисканні кнопки «Пуск» на моторі М відбувається перемішування культуральної рідини в апараті із заданою частотою обертів. Керування можна здійснювати як по місцю за допомогою ключа керування так і на щиті (панель дистанційного ручного керування).

5.2. Специфікація засобів автоматизації

Таблиця 5.2

Позиція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлювач
1	2	3	4	5	6
1а	рН	В агрегаті	рН електроди, матеріал скло, пластик, діапазон вимірювань рН 1...12, максимальна температура до 80 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 6бар	APS	Kobold
1б	рН	По місцю	Перетворювач вимірювання рН і окисно-відновного потенціалу, аналоговий вихід	APM-Z	Kobold
1в, 2б, 3б	рН, Розчинений кисень,	На щиті	Електропневматичний перетворювач, вихідний сигнал –	2713-WP	Dwyer

	Температура КР		4...20 мА, вихідний сигнал 20...100 кПа		
1г, 2в, 3в	рН, Розчинений кисень, Температура КР	По місцю	Мембранний виконавчий механізм прямої дії для управління кранами та заслінками, управляючий сигнал – 20...100 кПа, крутячий момент – 5...30 нм/бар, кут повороту – 90°	KUP	Kobold
2а	Розчинений кисень	В агрегаті	Промисловий екстрактивний газоаналізатор 3-х компонентний, CO – 0...250 мг/м ³ , CO ₂ – 0...400 мг/м ³ , SO ₂ – 0...400 мг/м ³	ULTRA-MAT 23	SIMENS
2б	Розчинений кисень	По місцю	Перетворювач вимірювання O ₂ , аналоговий вихід	ULTRA-MAT 23	SIMENS
3а	Температура КР	В агрегаті	Термоелектричні перетворювачі (термопари), матеріал виготовлення – латунь, градувальна характеристика хромель-копель (К), діапазон вимірювань: –50...+1100 градусів С, клас точності – 1,0.	1-3, ТХА (К)	ПАО «Тера» Україна
3б	Температура КР	На щиті	Універсальний нормуючий перетворювач для встановлення в шкаф управління, вихідний сигнал термометра опору/термопари, вихідний сигнал – 4...20 мА, напруга живлення ---= 24 В	НПТ1	Овен
КМ1	Магнітний пускач	На щиті	Магнітний пускач, робочий струм 7А,	3RT2015-1AP01	SIEMENS

			потужність двигуна 3кВт, управляючий сигнал 220В		
SA1	Перемикач	На щиті	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний- ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією	3SB3210- 2DA11	SIEMENS
SB1	Перемикач	На щиті	Двоклавішна кнопочка станція «Пуск»-«Стоп» 1НО+1НЗ,	8LP2T B7113	Lovato

ВИСНОВКИ

1. В літературному огляді розглянуто та узагальнено літературні дані щодо антимікробної дії поверхнево-активних речовин мікробного походження, зокрема ліпопептидів та гліколіпідів, синтезованих на різноманітних субстратах, щодо фітопатогенних мікроорганізмів грибного та бактеріального походження.

2. Встановлено, що внесення як живих, так і інактивованих конкурентних мікроорганізмів *E.coli* ІЕМ-1 і *B.subtilis* БТ-2 у середовище культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 супроводжувалось синтезом ПАР з підвищеною біологічною активністю. Так, ПАР, синтезовані за наявності таких індукторів спричиняли антимікробну дію щодо *E. coli* ІЕМ-1, *B. subtilis* БТ-2, *S. aureus* БМС-1, при цьому значення мінімальної інгібуючої концентрації перебувало в межах 3-12 мкг/мл і було нижчим, ніж у разі використання ПАР, отриманих на середовищі без індукторів.

3. Показано, що внесення *E. coli* ІЕМ-1, *B. subtilis* БТ-2 у середовище культивування продуцента ПАР супроводжувалось підвищенням ступеня руйнування біоплівки відповідних бактеріальних тест-культур. Наприклад, ступінь руйнування біоплівки *B. subtilis* БТ-2 за дії ПАР у концентрації 3-6 мкг/мл, отриманих на середовищі з *B. subtilis* БТ-2, досягнув 72,9%, у той час як за аналогічних концентрацій деструкція біоплівки дріжджової тест-культури *C. utilis* БВС-65 була нижчою (41%). За внесення живих клітин індукторів спостерігали дещо вищий ступінь руйнування біоплівки, у порівнянні з інактивованими.

4. Аналіз результатів антиадгезивної дії показав, що за обробки ПАР у діапазоні низьких концентрацій (3-24 мкг/мл), отриманих у середовищі з конкурентними мікроорганізмами (*E. coli* ІЕМ-1, *B. subtilis* БТ-2), ступінь адгезії *S.aureus* БМС-1 та *C.albicans* Д-6 до різних поверхонь (кахель, сталь, скло) був нижчий (7-39%), у порівнянні з показниками адгезії за обробки ПАР, отриманих за відсутності індукторів (33-87%).

5. Під час розробки технології отримання поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 з високими біологічними властивостями було встановлено, що доцільним є внесення живих клітин індукторів на початку культивування продуцента для економії ресурсів виробництва та уникнення можливої контамінації.

6. Згідно результатів експериментальної частини та техніко-економічного розрахунку, для забезпечення 20,17 га капусти білоголової у Сумській області, які оброблятимуться препаратом ПАР з антимікробною активністю, річна потужність виробництва становить 12 м³ культуральної рідини штаму ІМВ Ас-5017 за 45 трудоднів.

7. Розроблено схему автоматизації ділянки виробничого біосинтезу поверхнево-активних речовин. Так, ферментер обладнано датчиками температури, рівня та тиску, а також датчиками регуляції рН та розчиненого кисню у середовищі культивування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Інтегрований захист рослин на початку ХХ століття. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції. К.: Колобіг, - 2004. – 771с.
2. Пат. 2144292 Российская Федерация, МПК 7 А 01 N 63/04. Способ получения препарата для борьбы с болезнями растений / Мосин В.А., Дриняев В.А., Кругляк Е.Б., Котова Г.Л., Суставова С.И., Сафонов В.С. Опубл. 20.01.2000.
3. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – 41, № 1. – С. 58–63.
4. Pirog TP, Shevchuk TA, Petrenko NM, Paliichuk OI, Iutynska GO. Influence of cultivation conditions of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 on the properties of synthesized surfactants // Mikrobiol. Z. – 2018. – 80, 4. – P. 13-27. <https://doi.org/10.15407/mikrobiolj80.04.013> .
5. Bertrand S, Bohni N, Schnee S, Schumpp O, Gindro K, Wolfender JL. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery // Biotechnol Adv. – 2014. –32,6. – P. 1180–1204. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.03.001.
6. Raaijmakers J. M., De Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics // FEMS Microbiol. Rev. – 2010. – 34. – 6. – P. 1037–1062.
7. Thasana, N., Prapagdee, B., Rangkadilok, N., Sallabhan, R., Aye, S. L., Ruchirawat, S., & Loprasert, S. *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtilene A, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated β -amino acid. // FEBS Letters. – 2010. – 584. –14. – P. 3209–3214.
8. Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., & Thonart, P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple.// Journal of Applied Microbiology. – 2004. –96. – 5. – 1151–1160. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x.

9. Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., & Thonart, P. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2005. – 69. – 1. – P. 29–38. doi:10.1007/s00253-005-1940-3.

10. Valérie Leclère, Max Béchet, Akram Adam, Jean-Sébastien Guez, Bernard Wathelet, Marc Ongena, Philippe Thonart, Frédérique Gancel, Marlène Chollet-Imbert, Philippe Jacques. Mycosubtilin Overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 Enhances the Organism's Antagonistic and Biocontrol Activities // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – 71. – 8. – P.4577. DOI: 10.1128/AEM.71.8.4577-4584.2005.

11. Mohammadipour, M., Mousivand, M., Salehi Jouzani, G., & Abbasalizadeh, S. Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gloeosporioides*. // Canadian Journal of Microbiology. – 2009. – 55. – 4 – P. 395–404. doi:10.1139/w08-141.

12. Yáñez-Mendizábal, V., Zerriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., Teixidó, N. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides.// European Journal of Plant Pathology. – 2011 . – 132. – 4. – P. 609–619.

13. Velho, R. V., Medina, L. F. C., Segalin, J., & Brandelli, A. Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi.// Folia Microbiologica. – 2011. – 56. – 4. – P. 297–303. doi:10.1007/s12223-011-0056-7.

14. Hu, L. B., Shi, Z. Q., Zhang, T., & Yang, Z. M. Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of *Fusarium moniliforme* Sheldon ATCC 38932. // FEMS Microbiology Letters. – 2007. – 272. – 1. – P. 91–98.

15. Wu, S., Liu, G., Zhou, S., Sha, Z., & Sun, C. Characterization of Antifungal Lipopeptide Biosurfactants Produced by Marine Bacterium *Bacillus* sp. CS30.// Marine Drugs. – 2019. – 17. – 4. – P. 199.

16. Benitez, L. B., Velho, R. V., Lisboa, M. P., da Costa Medina, L. F., & Brandelli, A. Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. // The Journal of Microbiology – 2010. – 48. – 6. – P. 791–797. doi:10.1007/s12275-010-0164-0.
17. Waewthongrak, W., Pisuchpen, S., & Leelasuphakul, W. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. // Postharvest Biology and Technology. – 2015. – 99. – P. 44–49.
18. Adeniji, A. A., Aremu, O. S., & Babalola, O. O. Selecting lipopeptide-producing, *Fusarium*- suppressing *Bacillus* spp.: Metabolomic and genomic probing of *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10.5. // MicrobiologyOpen. – 2018. – P. 742. doi:10.1002/mbo3.742.
19. Hazarika, D. J., Goswami, G., Gautom, T., Parveen, A., Das, P., Barooah, M., & Boro, R. C. Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens.// BMC Microbiology. – 2019. – 19. – 1. doi:10.1186/s12866-019-1440-8.
20. Tareq, F. S., Lee, M. A., Lee, H.-S., Lee, Y.-J., Lee, J. S., Hasan, C. M., Shin, H. J. Gageotetrins A–C, Noncytotoxic Antimicrobial Linear Lipopeptides from a Marine Bacterium *Bacillus subtilis*.// Organic Letters. – 2014. – 16. – 3. – P. 928–931. doi:10.1021/ol403657r.
21. Mnif, I., Hammami, I., Triki, M. A., Azabou, M. C., Ellouze-Chaabouni, S., & Ghribi, D. Antifungal efficiency of a lipopeptide biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* SPB1 versus the phytopathogenic fungus, *Fusarium solani*.// Environmental Science and Pollution Research. – 2015. – 22. – 22. – P. 18137–18147. doi:10.1007/s11356-015-5005-6.
22. Mnif, I., Grau-Campistany, A., Coronel-León, J., Hammami, I., Triki, M. A., Manresa, A., & Ghribi, D. Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. // Environmental Science and Pollution Research. – 2015. – 23. – 7. – P. 6690–6699. doi:10.1007/s11356-015-5826-3.

23. Pedras, M. S. C., Ismail, N., Quail, J. W., & Boyetchko, S. M. Structure, chemistry, and biological activity of pseudophomins A and B, new cyclic lipodepsipeptides isolated from the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens*. // *Phytochemistry*. – 2003. – 62. – 7. – P. 1105–1114. doi:10.1016/s0031-9422(02)00617-9.

24. Семенкова И.Г. Фитопатология : учебник [для студ. ВНЗ] /И.Г. Семенкова, Э.С. Соколова. –М. : Изд-во "Академия". – 2003. – 480 с.

25. Bais, H. P. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. // *PLANT PHYSIOLOGY*. – 2004. – 134. –1. – P. 307–319. doi:10.1104/pp.103.028712.

26. Etchegaray, A., de Castro Bueno, C., de Melo, I. S., Tsai, S. M., de Fátima Fiore, M., Silva-Stenico, M. E., Teschke, O. Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. // *Archives of Microbiology*. – 2008. –190. – 6. – P. 611–622. doi:10.1007/s00203-008-0409-z.

27. Abdallah, D. B., Tounsi, S., Gharsallah, H., Hammami, A., & Frikha-Gargouri, O. Lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as promising biocontrol compounds against the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*.// *Environmental Science and Pollution Research*. – 2018. doi:10.1007/s11356-018-3570-1.

28. Kang, C.B., K.I. Ryu, and K.H. Lim. 2000. Production and characterization of biosurfactant.// *J. Kor. Oil Chem.* – Soc. 17. – 213-225.

29. Vatsa, P., Sanchez, L., Clement, C., Baillieul, F., & Dorey, S. (2010). Rhamnolipid Biosurfactants as New Players in Animal and Plant Defense against Microbes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 5095–5108. doi:10.3390/ijms11125095.

30. Bergström S., Theorell H., Davide H. Pyolipic acid. A metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea* active against *Mycobacterium tuberculosis*. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1946, V. 10, P. 165–166.

31. Jarvis FG, Johnson MJ. A Glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. // J Am Chem Soc. – 1949;71:4124–4126.
32. Edwards JR, Hayashi JA. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. // Arch Biochem Biophys. – 1965;111:415–421.
33. Itoh S, Suzuki T. Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability. // Agric Biol Chem. – 1972;36:2233–2235.
34. Arino S, Marchal R, Vandecasteele JP. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. Appl Microbiol Biotechnol. 1996;45:162–168.
35. Kim, B. S., Lee, J. Y., & Hwang, B. K. In vivo control and in vitro antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. // Pest Management Science. – 2000, 56(12). – 1029–1035. doi:10.1002/1526-4998(200012)56:12<1029::aid-ps238>3.0.co;2-q .
36. Goswami, D., Borah, S. N., Lahkar, J., Handique, P. J., & Deka, S. Antifungal properties of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* DS9 against *Colletotrichum falcatum*. // Journal of Basic Microbiology. – 2015, 55(11). – 1265–1274. doi:10.1002/jobm.201500220 .
37. Yoo, Dal-Soo, Baek-Seok Lee, Eun-Ki Kim. Characteristics of microbial biosurfactant as an antifungal agent against plant pathogenic fungus// J. Microbiol. Biotechnol. (2005), 15 (6), 1164-1169.
38. De Jonghe, K., De Dobbelaere, I., Sarrazyn, R., & Hofte, M. (2005). Control of *Phytophthora cryptogea* in the hydroponic forcing of witloof chicory with the rhamnolipid-based biosurfactant formulation PRO1. // Plant Pathology, 54(2), 219–226. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01140.x .
39. VARNIER, A.-L., SANCHEZ, L., VATSA, P., BOUDESOCQUE, L., GARCIA-BRUGGER, A., RABENOELINA, F., DOREY, S. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. // Plant,

Cell & Environment. – 2009, 32(2) . – 178–193. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01911.x .

40. Goswami, D., Handique, P. J., & Deka, S. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium sacchari*-the causal organism of pokkah boeng disease of sugarcane. // Journal of Basic Microbiology. – 2013, 54(6). – 548–557. doi:10.1002/jobm.201200801 .

41. Borah, S. N., Goswami, D., Sarma, H. K., Cameotra, S. S., & Deka, S. Rhamnolipid Biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to Control Stalk and Ear Rot Disease of Maize. // Frontiers in Microbiology. – 2016. – 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01505 .

42. Monnier, N., Furlan, A., Botcazon, C., Dahi, A., Mongelard, G., Cordelier, S., Rippa, S. Rhamnolipids From *Pseudomonas aeruginosa* Are Elicitors Triggering *Brassica napus* Protection Against *Botrytis cinerea* Without Physiological Disorders. // Frontiers in Plant Science. – 2018. – 9. doi:10.3389/fpls.2018.01170 .

43. A. Abalos, A. Pinazo, M. R. Infante, M. Casals, F. Garcí'a, and A. Manresa. Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes // Langmuir. – 2001. – 17, 1367-1371

44. Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M. J., Infante, M. R., & Manresa, A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. // Biotechnology and Bioengineering. – 2002, 81(3). – 316–322. doi:10.1002/bit.10474 .

45. Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I., & Manresa, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. //Antonie van Leeuwenhoek. – 2004, 85(1). – 1–8. doi:10.1023/b:anto.0000020148.45523.41.

46. Perneel, M., D'hondt, L., De Maeyer, K., Adiobo, A., Rabaey, K., & Höfte, M. Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-

borne diseases caused by *Pythium* spp. // Environmental Microbiology. – 2008. – 10(3), 778–788. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01501.x .

47. Sha, R., Jiang, L., Meng, Q., Zhang, G., & Song, Z. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens.// Journal of Basic Microbiology. – 2011, 52(4). – 458–466. doi:10.1002/jobm.201100295 .

48. Sha, R., & Meng, Q. Antifungal activity of rhamnolipids against dimorphic fungi. // The Journal of General and Applied Microbiology. – 2016. – 62(5), 233–239. doi:10.2323/jgam.2016.04.004 .

49. Tulloch, A. P. 1976. Structures of extracellular glycolipids produced by yeasts, pp. 329-345. In L. A. Witting (ed.), Glycolipid Methodology. American Oil Chemists Society, Champaign, IL, U.S.A.

50. Asmer, H.-J., S. Lang, F. Wagner, and V. Wray. 1988. Microbial production, structure and elucidation and bioconversion of sophorose lipids. // J. Am. Oil Chem. Soc. 65: 1460-1466.

51. Brakemeier, A., D. Wullbrandt, and S. Lang. 1998. *Candida bombicola*: Production of novel alkyl-glycosides based on glucose/2-dodecanol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 161-166.

52. Rau, U., R. Heckmann, V. Wray, and S. Lang. 1999. Enzymatic conversion of a sophorose lipid into a glucose lipid. Biotechnol. Lett. 21: 973-977.

53. Rau, U., S. Hammen, R. Heckmann, V. Wray, and S. Lang. 2001. Sophorolipids: A source for novel compounds. Ind. Crops Products 13: 85-92.

54. Daniel, H. J. and R. T. Otto. 1999. Production of sophorolipids from whey: Development of a two-stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized whey concentrates as substrates. Appl. Microbiol. Technol. 25: 613-621.

55. Kim, Kapjung, Dalsoo Yoo, Youngbum Kim, Baekseok Lee, Doonhoon Shin, Eun-Ki Kim. Characteristics of Sophorolipid as an Antimicrobial Agent //J. Microbiol. Biotechnol. – 2002, 12(2). – 235–241.

56. Yuan Bingbing, Yang Shanshan, Chen Jing. Antimicrobial Activity of Sophorolipids on Pathogenic Fungi Isolated from Fruits // Chin J Appl Environ Biol. – 2011, 17 (3): 330-333.

57. Jing Chen, Xinli Liu, Shengmi Fu, Zaiyong An, Yuning Feng, Runa Wang and Pingsheng Ji. Effects of sophorolipids on fungal and oomycete pathogens in relation to pH solubility // J Appl Microbiol. 2020 Jan 29. doi: 10.1111/jam.14594.

58. Sen, S., Borah, S. N., Bora, A., & Deka, S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3.// Microbial Cell Factories. – 2017, 16(1). doi:10.1186/s12934-017-0711-z .

59. Pirog T P, Shevchuk TA, Voloshina IN, Gregirchak NN. Use of claydite-immobilized oil-oxidizing microbial cells for purification of water from oil // Appl Biochem Microbiol. – 2005. – 41,1. – P. 51–55. <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0010-z>.

60. Pirog TP, Shevchuk TA, Voloshina IN, Karpenko EV. Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates // Appl Biochem Microbiol. – 2004. – 40, 5. – P. 470–475. <https://doi.org/10.1023/B:ABIM.0000040670.33787.5f>.

61. Bligh EG , Dyer WJ. A rapid method for total lipid extraction and purification // Can J Biochem Physiol. – 1959. – 37, 8. – P. 911–917.

62. Chebbi A, Elshikh M, Haque F, Ahmed S, Dobbin S, Marchant R, Sayadi S, Chamkha M, Banat IM. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection // J Basic Microbiol. – 2017. – 57, 5. – P. 364–375. doi: 10.1002/jobm.201600658.

63. Rufino RD, Luna JM, Sarubbo LA, Rodrigues LR, Teixeira JA, Campos-Takaki GM. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988 // Colloids Surf B Biointerfaces. – 2011. – 84, 1. – P. 1–5. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.10.045.

64. Gomes M-ZV, Nitschke M. Evaluation of rhamnolipids surfactants as agents to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* to polystyrene surfaces //

Lett Appl Microbiol. – 2012. – 49, 1. – P. 960–965.

65. *Abdel-Megeed A, Al-Rahma AN, Mostafa AA, Husnu Can Baser K.* Biochemical characterization of anti-microbial activity of glycolipids produced by *Rhodococcus erythropolis* // Pak J Bot. – 2011. – 43, 2. – P. 1323–1334.

66. *Janek T, Krasowska A, Czyżnikowska Ż, Łukaszewicz M.* Trehalose lipid biosurfactant reduces adhesion of microbial pathogens to polystyrene and silicone surfaces: an experimental and computational approach // Front Microbiol. – 2018. – 9. – P. 2441. doi: 10.3389/fmicb.2018.02441.

67. *Marmann A, Aly AH, Lin W, Wang B, Proksch P.* Co-cultivation – a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms // Mar Drugs. – 2014. – 12, 2. – P. 1043–1065. doi: 10.3390/md12021043.

68. *Barefoot SF, Chen YR, Hughes TA, Bodine AB, Shearer MY, Hughes MD.* Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B // Appl Environ Microbiol. – 1994. – 60, 10. – P. 3522–3528.

69. *Onaka H, Mori Y, Igarashi Y, Furumai T.* Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species // Appl Environ Microbiol. – 2011. – 77, 2. – P. 400–406. doi: 10.1128/AEM.01337-10.

70. *Stierle AA, Stierle DB, Decato D, Priestley ND, Alverson JB, Hoody J, McGrath K, Klepacki D.* The Berkeleylactones, Antibiotic Macrolides from Fungal Coculture // J Nat Prod. – 2017. – 80, 4. – P. 1150–1160. doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00133.

71. *Dusane D.H., Matkar P., Venugopalan V.P., Kumar A.R., Zinjarde S.S.* Cross-species induction of antimicrobial compounds, biosurfactants and quorum-sensing inhibitors in tropical marine epibiotic bacteria by pathogens and biofouling microorganisms // Curr. Microbiol. – 2011. – 62, 3. – P. 974–980. doi: 10.1007/s00284-010-9812-1.

72. *Kuyukina M, Ivshina I, Korshunova I, Stukova G, Krivoruchko A.* Diverse effects of a biosurfactant from *Rhodococcus ruber* IEGM 231 on the adhesion of resting and growing bacteria to polystyrene // AMB Express. – 2016. –

6, 14. doi: 10.1186/s13568-016-0186-z.

73. Hamza F, Kumar AR, Zinjarde S. Coculture induced improved production of biosurfactant by *Staphylococcus lentus* SZ2: Role in protecting *Artemia salina* against *Vibrio harveyi*. // Enzyme Microb Technol. – 2018. – 114. – P. 33–39. doi:10.1016/j.enzmictec.2018.03.008.

74. Dang N.P., Landfald B., Willassen N.P. Biological surface-active compounds from marine bacteria//Environ. Technol. – 2015. - doi:10.1080/09593330.2015.1103784

75. Ivshina I., Kostina L., Krivoruchko A., Kuyukina M. Peshkur T., Anderson P., Cunningham C. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil spiked with model mixtures of petroleum hydrocarbons and heterocycles using biosurfactants from *Rhodococcus ruber* IEGM 231// J Hazard Mater. — 2016. /DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.03.007

76. Lee D.W., Lee H., Kwon B.O., Khim J.S., Yim U.H., Kim B.S., Kim J.J. Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. // Environ Pollut. – 2018./ DOI: 10.1016/j.envpol.2018.05.070

77. Фітопатогенні бактерії: фундаментальні і прикладні аспекти / В. П. Пати́ка, Л. А. Пасі́чник // Ві́сник Уманського національного університету садівництва. - 2014. - № 2. - С. 7-11.

78. И. В. Воронкевич. Выживаемость фитопатогенных бактерий в природе – М.: «Наука», 1974. – 270с.

79. Антибіотик за рецептом: Уряд затвердив Національний План дій боротьби зі стійкістю до протимікробних препаратів [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://moz.gov.ua/article/news/antibiotik-za-receptom-urjad-zatverdiv-nacionalnij-plan-dij-borotbi-zi-stijkistju-do-protimikrobnih-preparativ> .

80. Болезни и лечение капусты, редьки, репы, редиса и других крестоцветных культур [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://ojz.bashinkom.ru/page/bolezni-i-lechenie-kapusty-redki-repy-redisa-i-drugih-krestocvetnyh-kultur> .

81. Лазарев А.М., Мыслик Е.Н., Игнатов А.Н. Ареал и зона вредоносности сосудистого бактериоза капусты // Вестник защиты растений. 2017. – 1, 91. – С.52-55.

82. Производители капусты в Украине [Электронный ресурс] Режим доступа:

https://tripoli.land/farmers/ovoshchevody/proizvoditeli_kapusty?page=9&q%5Bcategories_id_eq%5D=4&q%5Bculture%5D=proizvoditeli_kapusty .

83. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А.П., Иутинская Г.А. Действие поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *Nocardia vaccinii* К-8 на фитопатогенные бактерии // Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – 49, – №4. – С. 364–371.

84. Берегова Х. А., Сидор І. В., Никитюк Л. В., Пирог Т. П. Порівняльна характеристика поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 і препарату Фітолавін як засобів від бактеріозів. – С. 26-33.

85. Сода кальцинована в мішках по 25 кг [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://kaapri.com/p21416819-soda-kaltsinovana-mishkah.html> .

86. Сода кальцинированная – описание. Применение соды в промышленности и быту [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://dobriva.dp.ua/soda-kaltsinirovannaya-opisanie-primenenie-sody-v-promyshlennosti-i-bytu/> .

87. Хлоронтоин – дезинфекционное средство. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://farmakos.ua/hlor.html>

88. Хлорантоин методические рекомендации (инструкция по применению). [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://dezmed.com.ua/ru/instrukcii/765-khlorantoin-metodicheskie-rekomendacii-instrukciya-po-primeneniyu>

89. СІР-мойка [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.attis.com.ua/site/equipment/CIP.html>

90. *Капустян О.Є., Осінов М.Ю., Аверченко І.П.* Контроль якості зварювання // консп.лекцій ЗНТУ. - 2016. - С– 38.

91. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання / Уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 129 с.

92. *Rhodococcus erythropolis* [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.google.com/imgres?imgurl=http://www.chungvisinh.com/wp-content/uploads/2015/06/Rhodococcus.jpg&imgrefurl=https://www.chungvisinh.com/rhodococcus-erythropolis-nbrc-15567.html/&tbnid=438RNQQYn21oPM&vet=1&docid=DkjYgaXImCvqKM&w=313&h=310&hl=uk-UA&source=sh/x/im> .

93. *Пирог Т.П., Конон А.Д., Береговая К.А., Шулякова М.А.* Антиадгезивные свойства поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 // Микробиология. – 2014. – 83, – №6. – С. 631–639.

94. *Савинский С.В., Драгвоз И.В., Педченко В.К.* Определения содержания зеатина, индолил-3-уксусной и абсцизовой кислот в одной растительной пробе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Физиология и биохимия культ. Растений. – 1991. – 23, – №6. – С. 611-618.

95. *Zhang X, Wang T, Zhou W., Jia X., Wang. H.* Use of a Tn5-based transposon system to create a cost-effective *Zymomonas mobilis* for ethanol production from lignocelluloses // Microb. Cell Fact. – 2013. – 12:41. doi: 10.1186/1475-2859-12-41.

96. *Tahboub Y.R.* Determination of nitrite and nitrate in cell culture medium by reversed-phase high-performance liquid chromatography with simultaneous UV-VIS and fluorescence detection // Jordan Journal of Chemistry. – 2008. – 3, №1 – С. 69-75.

ДОДАТКИ

Апробація результатів науково-дослідної роботи

Тези у збірниках міжнародних та всеукраїнських конференцій:

1. Ярова Г.А., Царьова А.М., Пирог Т.П. Вплив дріжджів роду *Candida* на біологічну активність поверхнево-активних речовин *Nocardia vacinii* ІМВ В-7405// Збірник наукових праць «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології». Випуск 6 (м. Харків, 7-8 листопада 2019 р.). – С. 526.

2. Ярова Г.А., Пирог Т.П. Вплив конкурентних мікроорганізмів на біологічну активність поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017// Біотехнологія: звершення та надії: збірник тез VIII Міжнародної науково-практичної онлайн конференції студентів, аспірантів та молодих вчених (м. Київ, 15 листопада 2019 року). – С. 80.

3. Ярова А.А., Царёва А.М., Пирог Т.П. Влияние дрожжей рода *Candida* на биологическую активность поверхностно-активных веществ *Nocardia vacinii* ІМВ В-7405// Сборник тезисов участников конференции молодых ученых «Фундаментальные исследования и инновации в молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии» (Казахстан, г. Алматы, 28-29 ноября 2019 года). – С. 100.

4. Ключка Л.В., Ярова Г.А., Царьова А.М., Пирог Т.П. Посилення антимікробної активності та здатності до руйнування біоплівки внесенням конкурентних мікроорганізмів у середовище культивування *Nocardia vacinii* ІМВ В-7405// Збірник наукових праць X Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біологічні дослідження–2019» з міжнародною участю (м. Житомир, 16-18 березня 2019 року). – С. 287-288.

5. Царьова А.М., Ярова Г.А., Пирог Т.П. Руйнування біоплівки за дії поверхнево-активних речовин *Nocardia vacinii* ІМВ В-7405, синтезованих у середовищі з біологічними індукторами// Матеріали 85 Ювілейної Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів

"Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті" (м. Київ, НУХТ, 11-12 квітня 2019 року). – С. 519.

6. Ярова Г., Пирог Т. Регуляція антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 // Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (м. Київ, НУХТ, 2-3 квітня 2020 р.). – Ч. 1. – С. 412.

7. Пирог Т.П., Ярова Г.А. Регуляція антимікробної активності поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 // Матеріали VIII Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених і спеціалістів «Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур» (с. Центральне, 24 квітня 2020 р.).– С. 78-79.

8. Ярова Г.А. Антиадгезивна дія поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, синтезованих за присутності біологічних індукторів // Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» (м. Київ, 20 травня 2020 р.) – С. 103.