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.	_____ Стабніков В.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)	(підпис) (прізвище та ініціали)
«___» __червень___ 2022 р.	«___» ____червень___ 2022 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

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

на тему: Культивування *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 для одержання антифунгального рістстимулювального препарату для рослинництва

Виконав: здобувач__4_ курсу, групи__2___

Скиба Павло Олександрович _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

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

Консультанти_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач_____
(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) __Біотехнології і екологічного контролю_____
Кафедра _____біотехнології і мікробіології_____
Освітній ступінь____бакалавр_____
Спеціальність____162 «Біотехнології та біоінженерія»_____
(код і назва)
Освітньо-професійна програма _____« Біотехнології: фармацевтична___
_____промислова, харчова, природоохоронна»_____
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри _біотехнології і_____
_____мікробіології_____

_____Стабніков В.П.
“ _01_ **”** ___квітня___20 22 року

З А В Д А Н Н Я
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Скиба Павло Олександрович
(прізвище, ім’я, по батькові)

1. Тема роботи *«Культивування Paenibacillus mucilaginosus Pm 2906 для одержання антифунгального рістстимулювального препарату для рослинництва»*

керівник роботи **Буценко Людмила Миколаївна, д.б.н., доц.**
(прізвище, ім’я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кс
2. Строк подання здобувачем роботи_____*03.06.22*_____

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906, *цільовий продукт: фосфатовіт*

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обгрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4.Обгрунтування вибору технологічної схеми РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна схема виробництва фосфатовіту – 4 аркуші (А1). Апаратурна схема виробництва фосфатовіту – 1 аркуші формату (А1).

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання____01 квітня 2022 року_____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строки виконання	Примітка
1	*Характеристика фосфатовіту*	*01.04.21-05.04.22*	
2	*Обгрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування*	*06.04.21-11.04.22*	
3	*Техніко-економічне обґрунтування*	*12.04.21-20.04.22*	
4	*Обгрунтування вибору технологічної схеми*	*21.04.21-27.04.22*	
5	*Специфікація обладнання*	*28.04.21-03.05.22*	
6	*Контроль виробництва*	*04.05.21-07.05.22*	

Здобувач _____ Скиба П.О.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ Буценко Л.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Курсовий проект присвячено розробленню технологічної та апаратурної схеми вирощування бактерій виду *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906, які використовуютья у якості препарата для рослинництва- біодобрива. Біодобриво є чудовим варіантом для покращення стану ґрунтів за рахунок розчинення нерозчинних сполук фосфору та калію, які потрапляють у ґрунт під час використання хімічних добрив. Одною з головних переваг біодобрив є їх екологічність, отже вони не забруднюють навколишнє середовище. З розрахунку потреби у цільовому продукті потрібна кількість препарату буде становити 32470 л. Потужність виробництва буде складати 1.8 $м^3$ цільового продукту за цикл. Технологічний процес виготовлення біодобрива на основі штаму бактерій *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 складається із допоміжних (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища, піногасника, розчину хлоридної кислоти, розчину натрій гідроксиду) та основних робіт (вирощування інокуляту в колбах на качалках, інокуляторах та посівному апараті, виробничого біосинтезу).

Технологічна схема зображує такі стадії: підготовка аераційного повітря, 6-% розчину NaOH, 6- % розчину HCL, стерилізацію композицій поживного середовища, вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках, інокуляторах об’ємом 40 л, 400 л та виробничий біосинтез в ферментері об’ємом 3.2 $м^3$.

Дипломний проект викладений на 63 сторінках друкованого тексту, містить 15 таблиць, та 2 рисунків. Складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (28 джерел) та графічної частини (5 креслення формату А1).

Ключові слова: *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906, біодобриво, меляса, біосинтез, інокулятор, виробничий біосинтез

Зміст

РЕФЕРАТ **4**
ВСТУП **7**
РОЗДІЛ 1. ..... **8**
ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬВОГО ПРОДУКТУ **8**
РОЗДІЛ 2. ..... **11**
ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА **11**
2.1 Обгурунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування **11**
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого біохімічні ознаки **17**
біологічного агента **17**
2.3. Таксономічний статус біологічного агента **18**
РОЗДІЛ 3. ..... **20**
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ **20**
3.1. Потреба у цільовому продукті **20**
3.2. Розрахунок потужності виробництва **21**
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів **21**
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу **22**
РОЗДІЛ 4. ..... **26**
ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА **26**
4.1. Обґрунтування до ферментаційних процесів та виробничого біосинтезу **26**
4.1.1. Обґрунтування способу культивування та типу ферментера **26**
4.1.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря **27**
4.1.3. Вибір мийних та дезинфікуючих засобів **28**
4.1.4. Обґрунтування підготовки та стерилізації поживного середовища **34**
4.1.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання інокуляту в колбах на качалках……..**34**
РОЗДІЛ 5. ..... **42**
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ **42**
РОЗДІЛ 6. ..... **46**
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ **46**
РОЗДІЛ 7. ..... **59**

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА 59
7.1. Мікробіологічний контроль 59
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту 60
7.2.1. Визначення концентрації біомаси 60
7.2.2. Визначення концентрації карбону та нітрогену 60
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 52

ВСТУП

Біодобриво “Фосфатовіт” – це культуральна рідина бактерій штаму *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906. Біодобриво покращує ріст кореневої системи, стійкість рослин до погодніх умов та їх родючість.

На сьогодняшній час в Україні удобрення земель здійснюється за допомогою фосфатних та калійних добрив. Такі види хімичних добрив погано впливають на загальний стан ґрунту за рахунок зв’язування сполук добрив із елементами ґрунту та їх перетворення у нерозчинні стани, які не здатні розкладатися та засвоюватися рослинами.

Біодобриво “Фосфатовіт” на основі штаму бактерій *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 має здатність до розкладання нерозчинних сполук фосфору та калію та переведення їх у доступну для рослин форму [1].

Ще однією особливістю біодобрива є його здатність до синтезу фітогормонів, які негативно впливають на патогенну мікрофлору, яка викликає захворювання рослин. Також бактерій штаму *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 здатні синтезувати ауксини- гормони, які є найважливішими регуляторами експресії та розвитку генів протягом усього життя рослин, беруть участь у діленні клітин, видовженні, розвитку плодів та старінні [2].

Новизною даної роботи є культивування *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 на середовищі складу: меляса, KH_2PO_4x3 H_2O, NaCl, $MgSO_4x_7H2O$ KNO_3, $FeSO_4$, $CaCO_3$, кукурудзяний екстракт. Вирощений на такому середовищі штам бактерій *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 проявляє найбільшу здатність до розчинення нерозчинних сполук фосфору та калію в ґрунті, підвищує виділення фітогормонів та сприяє покращенню стресостійкості рослин [3].

РОЗДІЛ 1.
ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬВОГО ПРОДУКТУ

У даний час застосування бактеріальних препаратів для підвищення родючості грунту є одним із прийомів агротехнології, альтернативі використанню мінеральних добрив.

Дана тема є актуальною, адже біодобрива не наносять шкідливий вплив на грунт та рослини, не забруднюють навколишнє середовище. Біодобрива прискорюють процес вивільнення поживних речовин з грунту, а також сприяють засвоєнню вивільнених речовин рослинами. Крім того, біодобавки сприяють додатковому накопиченню поживних речовин у грунті в легкодоступній для рослин формі [4].

Біодобрива - це штучно підтримувані культури мікроорганізмів, які можна використовувати як інокулянти для поліпшення родючості та продуктивності рослин. [5].

Як відомо, мікроорганізми відіграють важливу роль у формуванні і генезисі грунту та можуть підвищувати ступінь його родючості. *Paenibacillus mucilaginosu*s в процесі своєї життєдіяльності продукує позаклітинні полісахариди, які знаходять широке застосування в сільському господарстві в якості препаратів направленої імуномодулюючої і стимулюючої дії [6].

Кінцевим продуктом виробництва *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 є біодобриво “Фосфатовіт”. Даний продукт сприяє повноцінному розвитку всіх рослин, відновлює виснажений грунт, зменшує вміст нітратів, підвищує родючість на 40%, а засвоюваність нерозчинних сполук фосфору та калію на 50% [7]. Також “Фосфатовіт” покращує стійкість рослин до хвороб та різних погодніх умов (посуха, перезволоження) [8]. Біодобриво на основі штаму *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 знижує кількість небезпечних нітратів в грунті. Ці бактерії здатні розкладати нерозчинні сполуки фосфору та калію [9]. Також бактерії *Paenibacillus mucilaginosus*

Pm 2906 здатні засвоювати атмосферний азот та перетворювати його в легкодоступну для рослин форму. Даний штам також синтезує фітогормони, які негативно впливають на патогенну мікрофлору, підвищують імунітет та стресостійкість рослин [10].

Опис біодобрива “Фосфатовіт” наведено у табл.1.1.

Таблиця 1.1Характеристика біодобрива “Фосфатовіт”

Назва біодобрива	“Фосфатовіт”
Тип	Мікробіологічне біодобриво
Діюча речовина	*Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 [11].
Призначення	Підходить для всіх культур: кімнатних та польових (декоративних, кімнатних, фруктових, хвойних…).Сприяє росту рослин та захищає їх від хвороб [12].
Форма випуску	Живі клітини та спори бактерій штаму *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 у пластмасових флаконах [11].
Механізм дії	Препарат діє за таким принципом: бактерії розчиняють силікатні мінерали (трифосфати, фосфорити, апатити, слюди) і вивільняють фосфор зі складних з'єднань з подальшим їх перетворенням в доступні, легкозасвоювані для рослин форми [13].
Клас небезпеки	4(нетоксичний, непатогенний) [11].
Умови зберігання	9 місяців при температурі в 30^{o}C [8].
Застосування	Удобрення багаторічних, хвойних, декоративних, фруктових дерев при пересадці - 50 мл / 10 л води. Витрата розчину 10 л на 5 рослин. Удобрення біодобривом після посадки рослин- 30 мл / 10 л води, 1 раз на місяць. Витрата розчину 10 л / 10 м², бажано вносити на зволожений грунт. Удобрення кімнатних рослин- 10 мл / 1 л води, вносити біодобриво 1 раз на місяць [9].

Переваги	1. Екологічно чисте. 2. Сприяє засвоєнню фосфору та калію рослинами. 3. Підвищує родючість грунтів. 4. Стимулює ріст кореневої системи. 5. Захищає рослини від дії несприятливої мікрофлори. 6. Підвищує урожайність на 40%. 7. Універсальність. 8. Менші витрати порівняно з хімічними добривами 9. Біодобриво вноситься в грунт «прицільно» - безпосередньо під кореневу систему рослини (можливо одночасно з його висадженням у ґрунт), а не масово по всій поверхні грунту [12]. 10. Низька ціна в 44 грн/200 мл.

РОЗДІЛ 2.
ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обгурунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Paenibacillus mucilaginosus Pm 2906 є одним із найефективніших штамів бактерій, які використовуються у якості біодобрива [6].

Paenibacillus mucilaginosus Pm 2906 має здатність до азотофіксації, може синтезувати індол-3-оцтову кислоту. Paenibacillus mucilaginosus Pm 2906 також стимулює ріст кореневої та вегетативної системи рослин. Дана бактерія має здатність до розчинення нерозчинних сполук фосфору та калію. Важливою властивістю *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 є те, що бактерії здатні синтезувати бактерицини, які негативно впливають на фітопатогенну мікрофлору, підвищують стресостійкість та урожайність рослин [4].

У таблиці 2.2 наведено дані, які засвідчують те, що найбільшу кількість біомаси виділяє саме штам *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906, а головним показником вибору біологічного агента для біодобрива є кількість синтезованої біомаси.

Також під час вибору біологічного агента слід звернути увагу на ціну середовища для культивування, яка вказана у таблиці 2.3. Дані таблиці свідчать про те, що середовище для культивування штаму *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 є найдешевшим.

Для остаточного вибору найкращого біологічного агента слід розрахувати умовну вартість 1г цільового продукту (таблиця 2.4). Дані, наведені у таблиці 2.4, вказують на те, що найнижча вартість цільового продукту належить саме штаму *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906.

Отже, найкращим біологічним агентом є штам *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906.

Таблиця 2.2

Особливості одержання фоосфатовіту

Продуцент	Склад поживного середовища		Кількість клітин КУО/мл	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування Год.	Умови культивування	Література
	Компоненти	Концентрація г/л					
1.*Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906	меляса KH_2PO_4x3 H_2O NaCl $MgSO_4$x7H_2O KNO_3 $FeSO_4$ $CaCO_3$ кукурудзяний екстракт	20 0.6 0.8 0.4 0.3 0.007 4 5	$1200*10^5$	2.1	36	t=30+(-)5°C pH 7,5-8.5; перемішування та аерація;	Патент № 2015148020 RU. Штамм бактерий Paenibacillus mucilaginosus, способ стимуляции роста и защиты растений от болезней и применение штамма бактерий Paenibacillus mucilaginosus в качестве удобрения и агента биологического контроля (противопатогенного средства) в профилактике или лечении заболевания растений / Пластинин С.А., Здорнов А.В., Никульшин В.А. Опубл 16.05.2017. Бюл. № 22 [3].

2.Paenibacillus mucilaginosus, YC13	Глюкоза $K_2HPO_4x3H_2O$ $MgSO_4$ x7 H_2O CaCO3	10 2 0.5 0.1	$20*10^5$	1.7	36	pH-7,6; t=37°C	Jing-Jiang Lu, Ai-Qin Xue, Sui-juan Yang, Xiu-Fang Hu. Diversity of plant growth-promoting *Paenibacillus mucilaginosus* isolated from vegetable fields in Zhejiang, China. Microbiol, 2014. doi.org/10.1007/s13213-014-0818-y
3.Paenibacillus mucilaginosus, штамм 574	Середовище Олександрова: сахароза NaCl $K_2HPO_4x3H_2O$ $MgSO_4$ x7 H_2O $CaCO_3$ NH_4NO_3	10 0.2 2 0.5 0.1 0.2	$2.12*10^5$	1.5	72	Вирощують при постійному перемішуванні зі швидкістю 220 об/хв протягом 3 діб за t= 30°C, pH=5,89 Інокулянт засівають за розрахунком- 10% від об'єму поживного середовища.	Канарский А.В, Канарская З.А, Щербаков А.В, Щербакова Е.Н. Эффективность культивирования бактерий рода *Paenibacillus mucilaginosus* на питательной среде на основе сахарозы. Научный журнал НИУ ИТМО. 2019. doi: 10.17586/2310-1164-2019-12-3-62-72.

Таблиця 2.3

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів фрсфатовіту

Продуцент	Компонент поживного серидовища г/л	Ціна компонента грн/кг	Вартість компонента(грн) на 1л серидорвища	Джерело інформації
Paenibacillus mucilaginosus Pm 2906	Меляса, 20	35	0,7 грн	1
	KH_2PO_4x3 H_2O, 0.6	120	0,072 грн	2
	NaCl, 0.8	4	0,0032 грн	3
	$MgSO_4$ x7 H_2O, 0.4	12	0,0048 грн	4
	KNO_3, 0.3	37	0.0111 грн	5
	$FeSO_4$, 0.007	6.30	0.0000441 грн	6
	$CaCO_3$, 4	25	0.1 грн	7
	кукурудзяний екстракт, 5	25	0.125 грн	8

	Вартість 1л середовища – 1.05 грн			
Paenibacillus mucilaginosus, YC13	Глюкоза, 10	57	0,57 грн	9
	K_2HPO_4x $3H_2O$, 2	120	0,24 грн	10
	$MgSO_4$x7 H_2O, 0.2	12	0,0024грн	11
	$CaCO_3$, 4	25	0,1 грн	12
	Вартість 1л середовища – 0.91грн			
Paenibacillus mucilaginosus 574	Сахароза, 10	90	0,9 грн	13
	NaCl, 0.2	4	0.0008грн	14
	K_2HPO_4x $3H_2O$, 2	120	0.24 грн	15
	$MgSO_4$ x7 H_2O, 0.5	12	0.006 грн	16
	$CaCO_3$, 0.1	25	0.0025 грн	17
	NH_4NO_3, 0.2	20	0.004 грн	18
	Вартість 1л середовища -1.18 грн			

Закінчення таблиці 2.3

1. https://megasvit.ua/melassa-v-harkove-patoka-cena/melassa-800ml/

2. https://harkov.flagma.ua/uk/kaliy-fosfornokisly-2-zameshchenny-ch-o2563762.html

3. https://kiev.flagma.ua/uk/natriy-hloristy-sol-tehnicheskaya-o9380220.html

4. https://prom.ua/ua/p1387042939-mineralnye-udobreniya-sulfat.html

5. https://dnepropetrovsk.flagma.ua/uk/kalievaya-selitra-kaliy-nitrat-kaliy-o9397260.html

6. https://systopt.ub.ua/ru/goods/view/454537/reviews/sulfat-jeleza-jeleznyy-kuporos-jelezo-sernokisloe-7-vodnyy/

7. https://www.systopt.com.ua/item-kaltsij-vuglekyslyj

8. https://kiev.flagma.ua/uk/kukurudzyaniy-ekstrakt-o5052730.html

9. https://lvov.flagma.ua/uk/glyukoza-farmakopeyna-o10124398.html

10. https://harkov.flagma.ua/uk/kaliy-fosfornokisly-2-zameshchenny-ch-o2563762.html

11. https://prom.ua/ua/p1387042939-mineralnye-udobreniya-sulfat.html

12. https://www.systopt.com.ua/item-kaltsij-vuglekyslyj

13. https://prom.ua/ua/p5251530-saharoza.html?

14. https://kiev.flagma.ua/uk/natriy-hloristy-sol-tehnicheskaya-o9380220.html

15. https://harkov.flagma.ua/uk/kaliy-fosfornokisly-2-zameshchenny-ch-o2563762.html

16. https://prom.ua/ua/p1387042939-mineralnye-udobreniya-sulfat.html

17. https://www.systopt.com.ua/item-kaltsij-vuglekyslyj

18. https://nikolaevnikol.flagma.ua/uk/selitra-ammiachnaya-nitrat-ammoniya-nomer-cas-o10598681.html

Таблиця 2.4 **Умовна вартість 1 г біомаси *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906**

Біологічний агент	Концентрація біомаси,г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної біомаси за годину, г/год	Вартість середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
Paenibacillus mucilaginosus Pm 2906	2.1	36	0.060	1.05	0.50
Paenibacillus mucilaginosus, YC13	1.7	36	0.047	0.91	0.54
Paenibacillus mucilaginosus, штамм 574	1.6	72	0.022	1.18	0.73

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого біохімічні ознаки біологічного агента

Paenibacillus mucilaginosus- грампозитивні паличкоподібні бактерії правильної форми із заокругленими кінцями, які беруть участь у біогеохімічному

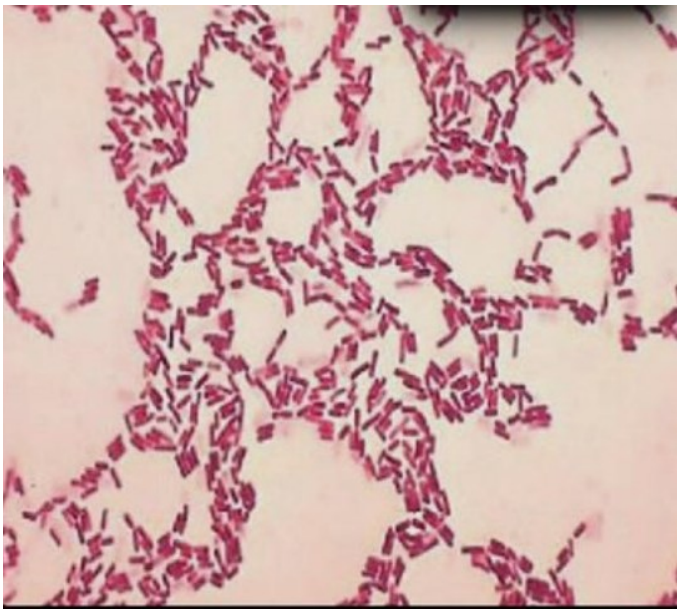

Рис.2.1. Колонії і клітини штаму *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 [16]

кругообізі калію та фосфору [14]. Також дані бактерії мають слизову оболонку із полісахаридів. Розміри клітин варіюються в межах 1-4 мкм [15].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Філогенетична класифікація для *Paenibacillus mucilaginosu* була наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [6].

Домен: *Bacteria*

Відділ: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Порядок: *Bacillales*

Родина: *Paenibacillaceae*

Рід: *Paenibacillus*

Вид: *Mucilaginosus*

РОЗДІЛ 3.
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

На сьогодняшній час сільське господарство займає 70% загального земельного фонду України.

На Чернігівщині, станом на 2021 рік було зібрано 5033 тис.ц пшениці із площі у 97 тис.га [4,5]. Кількість унесених мінеральних добрив для вирощення пшениці в Україні становить 728 тис. т на 5126 тис. га, отже для 97 тис.га пшениці було використано приблизно 14 тис.т хімічних добрив. Надмірне використання мінеральних добрив сильно шкодить ґрунтам. При великому вмісті в землі фосфорних та азотних добрив їхні сполуки зв'язуються із елементами ґрунту та перетворюються у нерозчинні стани, які не можуть засвоюватися рослинами [1].

Для покращення екологічної ситуації та отримання більшого приросту сільськогосподарських культур буде доцільно використовувати біодобрива.

Чудовим варіантом є біодобриво "Фосфатовіт" на основі штаму *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906. Дані бактерії стимулюють ріст кореневої системи, розчинють нерозчинні сполуки фосфору та калію, які утворюються при взаємодії мікрофлори ґрунту й добрив, та петворюють їх у доступну для рослин форму. Також штам *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 підвищує родючість рослин на 40%, може синтезувати фітогормони, які згубно впливають на патогенні мікроорганізми що викликають захворювання у рослин.

Даний препарат випускається у формі суспензії бактеріальних клітин та має 4 рівень небезпеки, а саме воно є малонебепечним, нетоксичним, непатогенним продуктом [1].

3.2. Розрахунок потужності виробництва біодобрива «Фосфатовіт» на основі штаму *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906

Ваховуючи те, що на ринку добрив для пшениці дуже велика конкуренція серед біодобрив, приймаємо площу пшениці, яка буде оброблятися препаратом, як 35 % від посівної площі, яка відведена для вирощення даної культури на Чернігівщині- 34 тис. га

Відомо, що норма висіву пшениці високої якості становить 185 кг/га. Отже на 34000 га припадає 6290 т насіння [6].

Обробка препаратом «Фосфатовіт» відбувається у 2 етапи. Перший етап відбувається перед посівом зерен із нормою витрат 3 літри препарату на 1 т насіння. Другий етап- обробка посівної пшениці із нормою витрат 0,4 л препатату на 1 гектар [1]. Отже для 6290 т насіння при обробленні у 2 етапи нам знадобиться:

6290 т * 3 літри = 18870 л препарату

0.4 л*34000 га= 13600 л препарату

18870 л +13600 л= 32470 л

3.3. Розрахунок об’єму ферментера та кількості виробничих циклів виробництва біодобрива «Фосфатовіт» на основі штаму *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906

Концентрація готового препарату співпадає із концентрацією суспензії живих клітин на виході із ферментера, отже нам не потрібно проводити додаткові стадії концентрації цільового продукту.

Необхідна кількість культуральної рідини *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 становить 32470 л.

Наступним етапом вираховуємо втрати цільового продукту під час виробництва (5%), потрібна кількість культуральної рідини становить

$$V_{кр} = 32470 \text{ л} / (1\text{-}0.05) = 34\ 179 \text{ л}$$

Даний препарат є сезонним, отже потреба в ньому буде потрібна у певний проміжок пори року. Тому, приймаємо кількість трудоднів- 40 (інші дні виробництво буде працювати для забезпечення інших потреб), отже кількість продукту за добу повинна становити:

$$V_д = V_{гп}/T_{тр} = 34\ 179 \text{ л} / 40 = 854 \text{ л}$$

Кількість цільового продукту за цикл становитиме:

$$V_{кр} = (К_1 \cdot V_д \cdot T_{цф})/24 = (1{,}1 \cdot 854 \cdot 45)/24 = 1761 \text{ л/цикл, } 1.8 \text{ м}^3$$

$T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 2 год, перевірка на герметичність – 2 год, стерилізація апарату – 2 год, охолодження ферментера – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація –36 год). $К_1$ – коефіцієнт запасу(1,1)

Наступним етапом розраховуємо геометричний об’єм ферментера:

$$V_г = V_{цк} / К_{зап} = 1.8/0{,}6 = 3.0 \text{ м}^3.$$

Обираємо за таблицею ферментер з геометричним об’ємом у 3.20 $м^3$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення

$$К_{зф} = V_{цк}/V_ф = 1.8/3.20 = 0.56, \text{ не перевищує задане значення}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл синтезується 1.8 $м^3$ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 5%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$V_{роб.1} = V_{кр}/(1\text{-Еф}) = 1.8\ м^3\ /(1\text{-}0{,}05) = 1.9\ м^3$, де Еф – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 1.9\ м^3$. За коефіцієнтом заповнення, який становить $К_{зап} = 0{,}6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_ф$), що становить:

$$V_ф = V_{роб.1}/К_{зап} = 1.9/0{,}6 = 3.2\ м^3.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{сф} = 3.20\ м^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$К_{зап1} = V_{роб.1}/V_{сф} = 1.9/3.20 = 0{,}59$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+Хф) = 1.9/(1+0{,}1) = 1.7\ м^3$, де $Хф = 0{,}1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 1.9\text{-}1.7 = 0{,}2\ м^3,\ 200\ л.$$

Для одержання $0{,}2\ м^3$ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1\text{-Епа}) = 0.2/(1\text{-}0{,}10) = 0.22\ м^3.$$

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об’єму поживного середовища. Отже кількість поживного середовища в посівному апараті становитиме:

$$V_{пс2} = V_{роб.2}/(1+Хпа) = 0.22/(1+0,1) = 0.2 \text{ м}^3$$

де $X_{па} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{пм2} = V_{роб.2} – V_{пс2} = 0.22 – 0.2 = 0.02 \text{ м}^3\text{,}20 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 0.22$ м^3 можна отримати під час культивування бактерій у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{па2} = V_{роб\text{-}2} / К_{зап} = 0.22/0.6 = 0.37 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об’ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 0.40$ м^3, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$К_{з1}=V_{роб.2}/ V_{сф} = 0.22/0.37 = 0,59$$

Для отримання 20 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме

$$V_{роб.3} = V_{пм2}/(1\text{-Еін}) = 20/ (1\text{-}0.10) = 22.2 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об’єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$V_{пс3} = V_{роб.3}/(1+ Хін) = 22.2/ (1+0.1) = 20.2$ л, де Хін = 0.1- доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становитиме

$$V_{пм3} = V_{роб.3} – V_{пс3} = 22.2\text{-}20.2 = 2 \text{ л.}$$

Можливий геометричний об’єм інокулятора

$$V_{ін} = V_{роб.3}/К_{зап} = 22.2/0.6 = 37 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об’ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 40$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$К_{з1}=V_{роб.з}/ V_{сф}= 22.2/40= 0.55$$

3.5 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

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

$$N_{колб} = V_{пмз}/(V_{колб}*K_{зп}) = 2000/(750*0.2) = 14 \text{ колб}$$

Таким чином, для отримання посівного матеріалу необхідно 14 качалочних колб.

Отже, процес отримання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу препарату "Фосфатовіт" у ферментері об'ємом 3.20 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0.6 буде проходити у 3 етапи. Для біосинтезу біодобрива на основі штаму бактерій роду *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 потрібен ферментер, об'ємом 3.20 м^3, інокулятори об'ємом 0.40 м^3, 40 л.

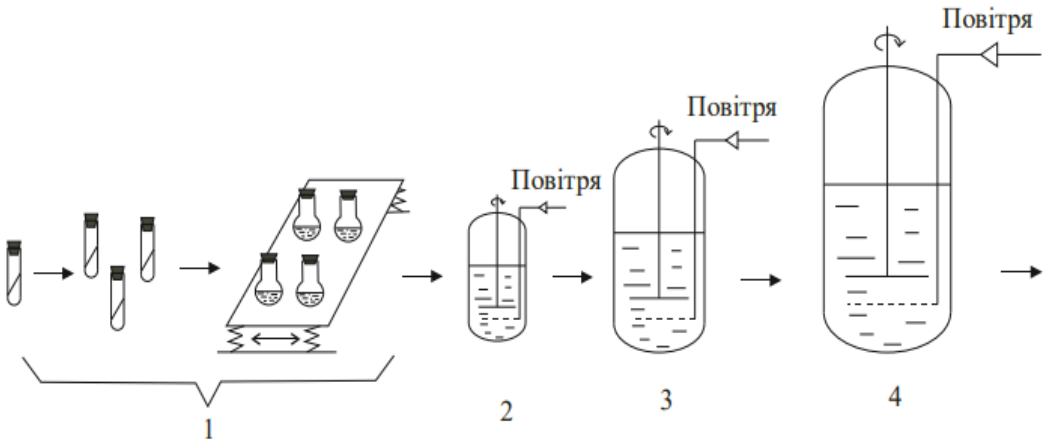

Рис. 3.1. Схема приготування посівного матеріалу *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906*:*

1 – вирощування в лабораторії; 2–3 − вирощування в інокуляторах об'ємом (м^3): 2 – 0,04; 3 – 0,4; 4 – виробничий біосинтез в ферментері об'ємом (м^3): 3.2.

РОЗДІЛ 4.
ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

4.1. Обґрунтування до ферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування та типу ферментера

Paenibacillus mucilaginosus Pm 2906- це облігатний аероб. Для культивування мікрорганізма в аеробних умовах слід використовувати аераційне повітря. Для контроля рівня тиску, який створюється під час подачі аераційного повітря в ферментер потрібно використовувати манометр.

Оскільки в процесі біосинтезу не відбувається утворення міцелію, не накопичуються метаболіти, які підвищують в'язкість середовища, і процес не вимагає дуже інтенсивного масообміну, пропонується використовувати найдешевшу та найпростішу за конструкцією мішалку – лопатеву

Ферментер має бути оснащений паровою сорочкою, мішалками, манометрами, стерилізувальними повітряними фільтрами, відбійниками, що забезпечують необхідний температурний, газовий і гідродинамічний режими в біореакторі (тобто процеси масо- і теплообміну).

Ферментер також слід обладнати датчиками для контролю pH середовища та контролю кількості піни.

Для даного виду культивування слід використовувати ферментер BIORUS 3000L.

Ферментер оснащений 6- лопатевою мішалкою, трьома відбійниками із нержавіючої сталі 316L та всіма необхідними елементами для культивування *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 [17].

Paenibacillus mucilaginosus Pm 2906 культивується при температурі 30^0C, постійній аерації у співвідношенні поживне середовище/повітря один до одного, постійному перемішуванні та при pH середовища 7.5-8.5 [3]. Даний рівень pH є нейтральним, отже середовище з такою кислотністю є сприятливими для розвитку сторонніх мікроорганізмів, які можуть погіршити ріст бактерії. Для того щоб не допустити контамінацію слід створити асептичні умови. Такі умови забеспечуются стерилізацією комунікацій, поживного середовища, повітря. Також для запобігання потрапляння сторонньої мікрофлори у ферментері створюється надлишковий тиск за допомогою подачі стерилізованого аераційного повітря. Асептичні умови неможливо досягти при культивуванні мікроорганізма поверхневим(твердо-фазовим) методом.

Одним із головних показників якості біодобрива є кількість біомаси, що зумовлює необхідність використання для його біосинтезу періодичне глибинне культивування [18].

4.1.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Бактерій роду *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 є аеробами, тому необхідною умовою їх розвитку є подача стерильного аераційного повітря у ферментер. Підготовку повітря потрібно здійснювати для очищення його від механічних часток, джерел контамінації.

Забір повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрезабірником у найвищій точці бодівлі на висоті приблизно 30 м. Із повітрезабірника повітря потрапляє у фільтри попередньої очистки, в яких звільняється від грубого пилу. Потім повітря потрапляє у другу підсистему, де проводиться його стиснення у турбокомпресорі до 0.35-0.5 МПа для випадіння зайвої вологи, адже конденсат може зіпсувати фільтри, які будуть використовуватися на наступних стадіях очистки.

Конденсування повітря проводять так:

При потраплянні повітря до другої підсистеми під дією компресора воно нагрівається до температури 120-150^{0}С. Для забезпечення осідання вологи у краплевловлювач повітря переохолоджують до температури 20-40^{0}С в теплообмінному апараті. Наступним етапом повітря знову нагрівають до температури 70-90^{0}С, адже при таких температурах осідання конденсату неможливе. Третя підсистема складається із двох фільтрів другого(Е=95%) та третього(Е=99,99%) рівня очищення де відбувається остаточне очищення повітря від забруднення. Фільтри третього рівня встановлюють безпосередньо перед кожним ферментером [19].

Для стерилізації повітря в боксах та лабораторіях, де працюють із посівною культурою та інокулятом повітря стерилізують за допомогою УФ-лампи

Очищення відпрацьованого повітря. У процесі ферментації утворюється велика кількість відпрацьованого повітря, яке може містити різні органічні сполуки, культуральну рідину у вигляді крапель.

Відпрацьоване повітря через колектор подається на головний фільтр, де воно очищається від всіх залишків процесу.

4.1.3. Вибір мийних та дезинфікуючих засобів

До дезінфікуючих речовин, з метою охорони безпеки людини та тварин, висувається ряд вимог.

- Дезінфікуючі засоби повинні мати широкий спектр антимікробної дії. Такі вимоги висуваються, адже мікроорганізми, які не загинули під час контакту з дезінфікуючим засобом, можуть набути резистентності та з'явитися мутаційні штами. Також антимікробна дія препарата не повинна змешуватися за низьких температур та змінах кислотності.
- Дезінфікуючий засіб повинен бути безпечним для людей і тварин. Для запобігання випадків отруєння, зміни стану здоров'я людей та тварин дезінфікуючи засоби ретельно перевіряють на канцерогенність, тератогенність,

ембріотоксичність, алергенні та кумулятивні властивості, шкірнорезорбтивну здатність.

- Дезінфікуючі засоби повинні мати низький рівень корозійної активності та агресивності до металів для запобігання пошкодженню поверхонь та апаратів.
- Дезінфікуючі засоби повині легко розчинятися у воді або утворювати стійкі емульсії.
- Деззасоби не повинні мати різкого запаху, щоб не зіпсувати якість продукції.
- Дезінфікуючі засоби повинні проявляти стійкість при зберіганні та використанні, а також вони повинні бути придатними до транспортування.
- Деззасоби не повинні втрачати свою активність у присутності твердої води та органічних речовин. Також вони повинні мати високу проникну здатність для кращого знезараження поверхонь.
- Дезінфікуючі засоби повинні швидко розпадатися в навколишньому середовищі до нешкідливих речовин.
- Деззасоби повинні мати низьку ціну та високу доступність.
- Дезінфікуючі засоби не повинні фарбувати та забруднювати об'єкти дезинфекції.

Як миючий засіб для миття обладнення, комунікацій, тари згідно таблиці 4.5 буде доцільно використовувати засіб для дезінфекції та передстерилізаційного очищення “Клиндез”

Засіб випускається у вигляді таблеток білого кольору, вагою 3.2 г, які добре розчинні у воді. Робочі розчини володіють антикорозійними, стабілізуючими властивостями, пом'якшують воду, мають емульгуючі, високі мийні властивості, не пошкоджують об'єкти, які виготовлені із корозійного матеріалу, добре змиваються, не залишають нальоту на поверхнях, що піддаються обробці. Засіб у готовому вигляді здатен зберігати свою активність протягом 16 днів.

Миючий засіб у своєму складі містить натрієву сіль дихлорізоціанурової кислоти - 80,5%, адипінову кислоту- 8.7%, бікарбонат натрію- 8.7%, карбонат настрію- 2.2%, поверхнево-активна речовина- 4.0%.

Робочі розчини на 10 л готують так: у промаркований посуд з корозійного матеріалу додають 10 л води та 7 таблеток миючого засобу для досягнення концентрації 0.1% [20].

Дезинфікуючий засіб із мийним ефектом «Dezaldum 20» (діючі речовини:мас.,%:16,5–19,75 алкілдиметилбензиламоній хлорид; 10,5–11,5 глутаровий альдегід). Норма витрат готового розчину становить 100 мл на 1 кв.м(згідно з методичними рекомендаціями щодо застосування дезінфікуючого засобу з мийним ефектом DEZALDUM 20). Робочий розчин з концентрацією 0.5% на 10 л готують так: у емальовані, склянні або пластмасові ємності додають 50 мл засобу та 9950 мл води кімнатної температури. Час знежараження становить 5 хвилин. Робочий розчин зберігається протягом 2 тижнів [21].

Дезінфекційний засіб з миючим ефектом «Біо Хлор –Т» (містить в якості діючої речовини дихлорізоціанурат натрію. (Na-соль ДХЦК), 65,5 %, адипінова кислота - 10%, бікарбонат натрію – 20%, сульфат натрію - 4,5%). Норма витрат готового розчину становить 100 мл/м^2.Готовий робочий розчин з концентрацією 0.3% на 10 л готуємо так: у емальовані, склянні або пластмасові ємності додають 2 мл засобу та 9998 мл води кімнатної температури. Робочий розчин зберігає свою активність протягом 5 діб [22].

Дезінфекційний засіб "ДЕЗолайт" з мийними властивостями (Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: діючими речовинами засобу є комплекс четвертинних амонійних сполук – 13,0±2% в т.ч. алкілдиметилбензиламоній хлорид – 6,0-7,0%, дидецилдиметиламоній хлорид – 7,0±8%; лютензол (неіонногенна ПАР) – 3,0±0,5%; функціональні домішки (етилендиамінтетроацетату – 3,0±0,5%; натрій метасилікату 5-водного – 0,3%; запашка - 0,2%), вода – до 100%).%). Норма витрат готового розчину становить 100 мл/м^2. Робочий розчин з концентрацією 0.5% на 10 л готують так: у

промаркований скляний, емальований, пластмасовий посуд додають 50 мл засобу та 9950 мл теплої води. Готовий розчин зберігає свою активність протягом 28 діб [24].

Опираючись на ціну дезінфікуючих засобів, згідно таблиці 4.5, для миття та дезинфекції стін, підлоги, вікон, вибираємо дезінфекувальний засіб з миючим ефектом «Dezaldum 20»

Таблиця 4.5

Назва миючого/ Дезинфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезинфекції	Концентрація робочого розчину,%	Загальна площа (об'єм)миття та/або дезинфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезинфікувального засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезинфекції за весь період виробництва,грн
Засіб дезінфікуючий з мийним ефектом «Dezaldum 20»[6]	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар, тара	0.5	3225	322.5	178.44 грн/л	287.73
	Обладнання, інвертар, комунікації		80000	8000		7137.6
Засіб дезінфекційний «Біо Хлор–Т»[7]	Стіни,підлога, вікна,двері,інвентар	0.3	3225	322.5	260 грн/кг	16.77
	Обладнання, інвертар, комунікації		80000	8000		416
Дезінфекційний засіб "ДЕЗолайт"з мийними Властивостями [8]	Обладнання, інвертар, комунікації	0.5	80000	8000	340 грн/л	13600
Засіб для дезінфекції та передстерилізаційного очищення «Клиндез»	Обладнання, інвертар, комунікації	0.1	80000	8000	200 грн/кг	3733

Порівняння миючих та дезинфікуючих засобів

Таблиця 4.6

Розрахунок потреби в дезінфекційних засобах для дезінфекції поверхонь у приміщеннях, обладнання

№	Найменування підрозділів об'єкта	Кількість підрозділів	Площа, що підлягає дезінфекції, кв.м(л)		Дезінфікуючий засіб			Кратність обробок		Потреба в деззасобах, л (кг)		
			При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні	Назва	Концентрація робочого розчину,%	Норма витрат робочого розчину на 1 кв.м	На добу	На 40 днів	На одну обробку		На 40 днів
										При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні	
1	Обладнення, нвертар,комунікації			4000	«Клиндез»	0.1	100 мл/ $м^2$		20	2000	2000	40000
2	Підлога		58	58	«Dezaldum 20»	0.5	100 мл/ $м^2$	1	40	5.8	5.8	232
3	Стіни, двері, вікна			45.25					20	4.5	4.5	90

4.1.4. Обґрунтування підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний та економічно вигідний синтез біомаси бактерій роду *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906(концентрація біомаси- 2.1 г/л, час культивування- 36 годин) досягається за умов росту на середовищі такого складу:

- Меляса- 20 г/л
- KH_2PO_4x3 H_2O- 0.6 г/л
- NaCl- 0.8 г/л
- $MgSO_4$ x7 H_2O- 0.4 г/л
- KNO_3- 0.3 г/л
- $FeSO_4$- 0.007 г/л
- $CaCO_3$- 4 г/л
- кукурудзяний екстракт- 5 г/л

Згідно розрахунків, наведених у 1 розділі, біосинтез бактерій роду *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 здійснюється у ферментері об'ємом 3.20 $м^3$, що містить 1.7 $м^3$ середовища. Одержання інокуляту відбувається у три етапи(у колбах на качалках, інокуляторі та посівних апаратах об'ємами 400 та 40).

4.1.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання інокуляту в колбах на качалках

На першій стадії вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках нам знадобиться 2 л поживного середовища. Тому для стерилізації поживного середовища обираємо автоклав з вертикальним завантаженням Daihan Scientific DH.WAC05047 [24]. Вирощування посівної культури проводимо у 14 колбах об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення 0.2

Таблиця 4.7

Розрахунок компонентів для приготування 2 л середовища

Компонент поживного середовища	**Концнтрація, г/л**	**Вміст компонента у 2 л середовища, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, мл**
меляса	20	40	А	1.6 (л)
кукурудзяний екстракт	5	10		
Вода		1550 (мл)		
NaCl	0.8	1.6	Б	109.3
KH_2PO_4x3 H_2O	0.6	1.2		
KNO_3	0.3	0.6		
Вода		109.3 (мл)		
$CaCO_3$	4	8	В	257
Вода		257		
$FeSO_4$	0.007	0.014	Г	26.2
$MgSO_4$ x7 H_2O	0.4	0.8		
Вода		26.2 (мл)		
Усього				**2 л**

Композиція А: Меляса та кукурудзяний екстракт готуються в 1 композиції, адже це термолабільні речовини. Композиція готується у колбі об'ємом 2.5 л. Для цього на технічних вагах зважують 10 г кукурудзяного екстракту та 40 г меляси, поміщають у колбу та додають 1550 мл води. Після приготування розчину його стерилізують в автоклаві з вертикальним завантаженням при t = 112 ^{0} С (30 хв)

Композиція Б: Композицію готуємо окремо від солей кальцію та магнію, адже вона містить фосфорні солі, адже може виипасти осад фосфатів кальцію та магнію. Приготування та стерилізація композиції проводиться у колбі, об'ємом

200 мл. Для цього на технічних терезах зважують 1.6 г NaCl, 1.2 г KH_2PO_4x3 H_2O, 0.6 г KNO_3, поміщають у колбу та додають 109 мг води. Після приготування розчину проводять його стерилізацію у автоклаві з вертикальним завантаженням при t = 131 ºС (30 хв)

Композиція В: $CaCO_3$ має здатність до підлужнення середовища, отже композицію потрібно готувати окремо від інших сполук. Композиція готується у колбі об'ємом 350 мл. Для цього на технічних терезах зважують 8г $CaCO_3$, поміщають його у колбу, додають 257 мл дистильованої води та проводять стерилізацію в автоклаві з вертикальним завантаженням при t = 131 ºС (30 хв).

Композиція Г: $FeSO_4$(0.014 г), $MgSO_4$ x7 H_2O(0.8 г), вода(26.2 мл). Розчин об'ємом 26.2 мл готують у колбі об'ємом 50 мл та стерилізують в автоклаві при t = 131 ºС (30 хв)

4.1.6 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокляту в посівних апаратах об’ємом 40 та 400 л

Для біосинтезу культуральної рідини бактерій роду *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 в інокуляторі об’ємом 40 л знадобиться 20 л поживного середовища.

Таблиця 4.8

Розрахунок компонентів для приготування 20 л середовища

Компонент поживного середовища	**Концнтрація, г/л**	**Вміст компонента у 20 л середовища, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, мл**
меляса	20	400	А	16 (л)
кукурудзяний екстракт	5	100		
Вода		15.5(л)		
Конденсат				1.6 (л)
NaCl	0.8	16	Б	1.09 (л)
KH_2PO_4x3 H_2O	0.6	12		
KNO_3	0.3	6		
Вода		1.09 (л)		
$CaCO_3$	4	80	В	2.57 (л)
Вода		2.57 (л)		
$FeSO_4$	0.007	0.14	Г	261.6
$MgSO_4$ x7 H_2O	0.4	8		
Вода		261.6(мл)		
Усього				**20 л**

Композиція А: Меляса (400 г), кукурудзяний екстракт (100 г), вода (15.5 л).Приготування композиції здійснюється в реакторі при швидкості перемішування 50-100 об/хв з подальшим перенесенням в інокулятор для стерилізації. Стерилізацію проводять при t = 112 ^{0} С (30 хв).

Композиція Б: NaCl (16 г), KH_2PO_4x3 H_2O (12 г), KNO_3 (6 г), кількість води- 1.09 л. Приготування здійснюється у колбі об'ємом 1.6 л. Стерилізація проводиться в автоклаві при t = 131 ºС (30 хв).

Композиція В: $CaCO_3$ (80 г), кількість води- 2.57 л. Приготування здійснюють у колбі об'ємом 4 л. Композицію стерилізують в автоклаві при t = 131 ºС (30 хв)

Композиція Г: $FeSO_4$ (0.14 г), $MgSO_4$ x7 H_2O (8 г), вода (261.6 мл). Приготування композиції здійснюється у колбі об'ємом 400 мл. Стерилізація компонентів проводиться в автоклаві при t = 131 ºС (30 хв).

На стадії приготування і стерилізації поживного середовища для інокулятору об'ємом 400 л об'єми композицій будуть занадто великими для стерилізації в автоклаві, тому солі фосфору та магнію об'єднуємо в одну композицію та проводимо стерилізацію в інокуляторі об'ємом 400 л з попереднім підкисленням середовища для унеможливлення випадання осаду.

Таблиця 4.9

Розрахунок компонентів для приготування 200 л середовища

Компонент поживного середовища	**Концнтрація, г/л**	**Вміст компонента у 200 л середовища, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, л**
меляса	20	4 кг	А	160.7
кукурудзяний екстракт	5	1 кг		
Вода		155.7 (л)		
Конденсат				16.07
NaCl	0.8	160	Б	13.5
KH_2PO_4x3 H_2O	0.6	120		
KNO_3	0.3	60		
$FeSO_4$	0.007	1.4		
$MgSO_4$ x7 H_2O	0.4	80		
Вода		11 (л)		
Конденсат				1.35
$CaCO_3$	4	800	В	25.7
Вода		20.79 (л)		
Конденсат				2.57
Усього				**200 л**

Композиція А: Меляса (4 кг), кукурудзяний екстракт (1 кг), вода (125.5 л). За допомогою об'ємно- вагового дозатора компоненти поміщають у реактор. Сполуки розмішують у реакторі при 50-100 об/хв та переносять в інокулятор де їх стерилізують при t = 112 ^{0} С (30 хв).

Композиція Б: NaCl(160 г), KH_2PO_4x3 H_2O(120 г), KNO_3(60 г), $FeSO_4$(1.4 г), $MgSO_4$ x7 H_2O(80 г), вода(13.5 л). Приготування композиції здійснюється у реакторі з перемішуючим пристроєм(50-100 об/хв), додається розчин хлоридної кислоти (ДР 2.1.1) до досягнення pH 4-4,5 та проводиться стерилізація при t = 131 ºС (30 хв)

Композиція В: $CaCO_3$(800 г), кількість води- 25.7 л. Приготування композиції здійснюється у реакторі об'ємом 40 л при швидкості обертання 50-100 об/хв. Стерилізацію компонентів проводять у реакторі при температурі 131 °С упродовж 30 хв.

2.2.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтез

Для культивування бактерій роду *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 у ферментері об'ємом 3.20 м^3 знадобиться 1700 л середовища.

Мелясу та кукурудзяний екстракт для економії витрат виробництва перемішування компонентів здійснюють у реакторі, а стерилізацію у виробничому ферментері. Розчини NaCl, KH_2PO_4x3 H_2O, KNO_3, $FeSO_4$, $MgSO_4$ x7 H_2O стерилізують у реакторі, об'ємом 200 л з попередньою подачею розчину хлоридної кислоти до досягнення pH 4-4,5 для унеможливлення випадіння осаду. Для кращого розчинення солей середовище підігрівають до температури 40 ^oC. $CaCO_3$ готують та стерилізують у збірнику об'ємом 300 л.

2.3 Обґрунтування вибору розчинів для регуляції pH та піногасника

Для регуляції pH у середовища для культивування бактерій роду *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 у посівному апараті 40, 400 л та ферментері об'ємом 3.20 м^3 будемо використовувати 6% розчин HCL, для підкислення середовища у посівному апараті 40, 400 л та ферментері об'ємом 3.20 м^3. Для пілужнення поживного середовища у посівному апараті 40, 400 л та ферментері об'ємом 3.20 м^3 використовується 6% розчин NaOH.

У якості піногасника використовується силіконовий піногасник Silfoam SE 2. Даний піногасник може використовуватися у розведеному та нерозведеному вигляді. Одною з головних переваг піногасника Silfoam SE 2 є його ціна та витрати. Для піногасіння часто використовують різноманітні жири. Найчастіше для піногасіння використовують олеїнову килоту, адже вона не має ніякої харчової цінності. Недоліком даних видів піногасника є норми їх витрат які становлять 0.2-1.0%. Також жири у процесі асиміляції мікроорганізмами розщеплюються до жирних кислот, які можуть змінити pH середовища [19].

Піногасник Silfoam SE 2 є економічно вигіднішим, адже його ціна становить 20.262 грн/кг при нормах витрат у 0.02-0.5%, тоді як ціна на представника жирних кислот- олеїнової кислоти становить 200 грн/л

Таблиця 4.10

Порівняльна характеристика піногасників

Назва піногасника	Норми витрат	Ціна	Джерела
Олеїнова кислота	0.2-1.0%	200 грн/л	[9]
Silfoam SE 2	0.02-0.5%	20.26 грн/кг	[10]

РОЗДІЛ 5.

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу біодобрива на основі біомаси *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906

Таблиця 5.11

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)	Джерела
ПЗ 1	Пристрій забірний	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень.	
Ф 2	Фільтр попередній	1	Фільтр OMI QF0050 Продуктивність - 5000 л/хв Максимальний тиск - 16 бар Ступінь очищення - груба очистка Ступінь фільтрації - частинки до 5 мікрон	1
К 3	Компресор	1	Компресор SCR 40 PM Продуктивність- 1.04-5.2 $м^3$/хв Тиск- 7-10 бар Потужність електродвигуна- 30 кВт	2
Т 4 Т 6	Теплообмінник-охолоджувач Теплообмінник-нагрівач	2	Пластинчастий теплообмінник PARAFLOW Площа теплообміну- 3500 $м^2$ Товщина пластин- 0,4 — 0,6 мм Робочий тиск- 0-30 бар	3
Р 5	Ресивер вологовідділювач	1	Ресивер вертикальний повітряний РВ 500.15.00 Виробник- REMEZA Об'єм- 500 л Вага- 135 кг Робочий тиск- до 16 бар	4
Ф 7	Головний фільтр	1	Фільтр HEPA H 11 Виробник- Luftov Ступінь очистки- 97%	5

Продовження таблиці 5.11.

Ф 8 Ф 9 Ф 10	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр Aircast AF 0306 Продуктивність- 335 $м^3$/год Максимальний робочий тиск- 16 бар Температурний діапазон- 1.5-65^oC	6
Р 11	Реактор- змішувач для приготування композиції В для інокулятора об'ємом 40 л	1	Реактор- змішувач Виробник- ACS(Україна) Загальний об'єм- 25 л Оснащений манометром, лопатевою мішалкою та рубашкою	7
Р 12	Реактор- змішувач для приготування композиції В для інокулятора об'ємом 400 л	1	Реактор- змішувач Виробник- ПРОМБІОФІТ Загальний об'єм- 200 л Оснащений мішалкою та рубашкою	8
Р 13	Реактор- змішувач для приготування композиції А для інокулятора об'ємом 400 л	1	Реактор- змішувач Виробник- ПРОМБІОФІТ Загальний об'єм- 23 л Оснащений мішалкою та рубашкою	9
Р 14	Реактор- змішувач для приготування композиції Б для інокулятора об'ємом 400 л	1	Реактор- змішувач Виробник- САН Загальний об'єм- 40 л Оснащений мішалкою	10
Р 15	Реактор- змішувач для приготування композиції А для інокулятора об'ємом 3.20 $м^3$	1	Реактор- змішувач Виробник- ACS(Україна) Загальний об'єм- 200 л Оснащений мішалкою та рубашкою	11
Р 16	Реактор- змішувач для приготування композиції Б для інокулятора об'ємом 3.20 $м^3$	1	Реактор- змішувач Виробник- ACS(Україна) Загальний об'єм- 300 л Оснащений мішалкою та рубашкою	12
Р 17	Реактор- змішувач для приготування композиції В для інокулятора об'ємом 3.20 $м^3$	1	Реактор- змішувач Виробник- Huixin Загальний об'єм- 2000 л Оснащений мішалкою та рубашкою	13
Р 18	Реактор- змішувач для приготування піногасника	1	Реактор- змішувач Виробник- EasyChem Загальний об'єм- 15 л	14
ЗП 1	Засівний пристрій	1	Засівний пристрій для внесення посівного матеріалу в асептичних умовах в інокулятор	

Закінчення таблиці 5.11.

ФР 1	Інокулятор об'ємом 40 л	1	Інокулятор BioFlo 510 Загальний об'єм- 40 л Оснащений мішалкою(25-130 об/хв), рубашкою, датчиками pH та піноутворення, пристроєм для асептичного отримання проб, пристроєм для подачі субстрату. Виготовлений із сталі марки 316 L	15
ФР 2	Інокулятор об'ємом 400 л	1	Інокулятор ABEC Fermenter Загальний об'єм- 400 л Оснащений сорочкою, мішалкою(до 1750 об/хв) та всіма необхідними датчиками	16
ФР 3	Виробничий ферментер об'ємом 3.20 $м^3$	1	Ферментер Загальний об'єм- 3200 л Оснащений рубашкою, перемішуючим пристроєм	17
Н 2	Відцентровий насос	1	Відцентровий насос з магнітною муфтою FLUIMAC FMP-06.10 PP Продуктивність: 1200 л/год Потужність: 0.55 кВт	18
Н 1 Н 3 Н 4		3	Відцентровий насос з магнітною муфтою BTS Engineering MP-HX-250 GFRPP Продуктивність: 120 л/год Потужність: 0.37 кВт	19
Н 5 Н 6		2	Відцентровий насос з магнітною муфтою BTS Engineering MP-HX-555 GFRPP Продуктивність: 500 л/год Потужність: .3.7 кВт	20
Н 7		1	Відцентровий насос з магнітною муфтою Debem DM 10 Продуктивність: 4000 л/год Потужність: .0.55 кВт	21
Н 8		1	Відцентровий насос з магнітною муфтою FLUIMAC CM006/PVDF Продуктивність: 7000 л/год Потужність: .0.25 кВт	22
Д 1 Д 2 Д 3 Д 4 Д 5	Об'ємно-ваговий дозатор	5	Ваговий дозатор- витратомір для сипучих речовин Точність дозування- 0.1% Потужність- 5 т/год	23

1. https://prom.ua/ua/p56945184-filtr-szhatogo-vozduha.html?&primelead=Mi41

2. https://entech-zahid.com.ua/ua/p1171168048-kompresor-scr-kvt.html

3. https://tapflo.ua/ua/products-2/teploobmenniki#spetsialne-vikonannya

4. https://fiac-ua.com/product/resiver-vozdushnyi-rv-500-15-36/

5. http://luftov.com.ua/hepa-filtr-ventilyatsionnyj/

6. https://wsedlasto.com.ua/ua/p1380232579-magistralnyj-filtr-tonkoj.html

7. https://ua.all.biz/reaktor-nerzhaveyushchij-laboratornyj-25l-g15081686
8.https://www.prombiofit.com/Equipment/upes.html?gclid=Cj0KCQiAtJeNBhCVARIsANJUJ2Fi8ZxJW0f07sqT6BsF_yyMV4lDgCPHoWp-0QL0uqyrIP-q_plROGUaAqN-EALw_wcB

9. https://flagma.ua/reaktor-23-l-o4524079.html

10. https://azovhimservis.all.biz/reaktor-nerzhaveyushchij-laboratornyj-40l-g15083700

11. https://prom.ua/ua/p1144927320-reaktor-200l-parovoj.html

12. https://flagma.ua/reaktor-300-litrov-o7112342.html

13. https://russian.alibaba.com/product-detail/2000l-agitator-reactor-62110826408.html

14. https://www.dia-m.ru/catalog/lab/reaktory-khimicheskie/reaktory-parallelnogo-sinteza/reaktor-khimicheskiy-15-l-easychem-dn300/

15. https://xn--80ac2aleg3a.xn--p1ai/catalog/fermentery-bioreaktory/bioflo-510/

16. http://ua.freezedryer-st.com/bioreactor/400-liters-fermenter-bioreactor.html

17. https://ru.made-in-china.com/co_yinuomachine/product_Stainless-Steel-Pharmaceutical-Steam-Jacketed-Apis-Chemical-Polymer-Decarboxylation-Saturated-Resin-Reactor-Equipment_uoiooushsg.html

18. http://fluimac.com.ua/ua/eqipment/magnetic-driven-centrifugal-pum/v-dcentroviy-nasos-z-magn-tnoyu-muftoyu-fmb-65-wr-v-n1-b-n/

19. https://prom-nasos.com.ua/catalog/pumps-by-type/magnetic-drive-pumps/nasos-z-magn-tnoyu-muftoyu-mp-hx-250-gfrpp-150l-min-16m-380v-able-motor/

20. https://prom-nasos.com.ua/catalog/pumps-by-type/magnetic-drive-pumps/nasos-z-magn-tnoyu-muftoyu-mp-hx-555-gfrpp-500l-min-35m-380v-able-motor/

21. https://prom.ua/ua/p987846336-germetichnyj-nasos-055.html

22. https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/magnetic-drive-pumps/v-dcentroviy-nasos-z-magn-tnoyu-muftoyu-compass-006-pvdf/

23. https://technowagy.com.ua/ru/products/vesovoj-diskretnyj-dozator-rashodomer-dlya-sypuchih-3/

РОЗДІЛ 6.
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка та стерилізація аераційного повітря

ДР 1.1. Забір повітря

Атмосферне повітря забирають за допомогою турбокомпресора через забірну шахту, яка розташована на висоті 20-30 м (де стабільна концентрація мікроорганізмів) Повітрозабірник (ПЗ 1) (обладнений металевою сіткою для зменшення кількості забруднення, яке може попасти у систему повітрезабору.

ДР 1.2. Попередня очистка повітря

Повітря із повітрозабірника потрапляє у фільтр грубої очистки (Ф 2) продуктивністю 5000 л/ хв, де повітря більше ніж на 90% звільняється від забруднення

ДР 1.3. Стиснення повітря

Із фільтра грубої очистки (Ф 2) повітря потрапляє у турбокомпресор (К 3) та стискається до тиску у 0.35-0.5 Мпа. Стиснення повітря приводить до підвищення його температури до 120-250^{o}С і збільшення вмісту вологи.

ДР 1.4. Охолодження повітря та виділення зайвої вологи

Повітря охолоджують та конденсують за допомогою теплообмінника-охолоджувача (Т 4). Щоб забеспечити випадання вологи повітря переохолоджують до температури 25-45^{o}С та концентрації W= 60-70% ра допомогою теплообмінника (Т 4).

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Для забеспечення надійної роботи фільтрів другого та третього рівнів, повітря переохолоджують за допомогою теплообмінника (Т 6) до темперетури 70-90^{o}С та вмісту вологи W= 50%

ДР 1.6 Очистка на головному фільтрі

Із теплообмінника (Т 6) повітря потрапляє на головний фільтр (Ф 7), який має ступінь очистки у 97%

ДР 1.7 Очистка на індивідуальних фільтрах

Із головного фільтра повітря потрапляє на фільтри індивідуальної очистки (Ф 8, Ф 9, Ф 10), які встановлюються перед кожним апаратом.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних речовин

ДР 2.1. Приготування 6 % розчину HCl для підкислення поживних середовищ

ДР 2.1.1. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 400 л

Для 200 л поживного середовища потрібно використати 400 мл розчину 6%-ї хлоридної кислоти для його підкислення в посівному апараті об'ємом 400 л.

Такий об'єм 6% розчину HCl готуємо так:

У колбу на 750 мл вносимо 333 мл дистильованої води і додаємо, при перемішуванні, 67 мл концентрованої 36% хлоридної кислоти, яку відміряємо мірним циліндром.

ДР 2.1.2. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 3.20 м^3

Для 1700 л поживного середовища потрібно використати 3400 мл розчину 6%-ї хлоридної кислоти для його підкислення в посівному апараті об'ємом 3200 л.

У колбу об'ємом 5 л поміщаємо 2.8 л питної води, 600 мл 36% хлоридної кислоти та перемішуємо для кращого розведення речовин.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 400 л

Для 200 літрів поживного середовища потрібно приготувати 400 мл розчину 6% NaOH для його підлуження в посівному апараті об'ємом 400 л.

Для приготування 400 мл розчину 6% NaOH на терезах зважуємо 24 г кристалічного натрію. Наважку поміщають у колбу об'ємом 750 мл, додають 400 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення та закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію проводять в автоклаві при 131ºС (0,15 МПа) протягом 30 хв.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 3.2м^3

Для 1700 літрів поживного середовища потрібно приготувати 3400 мл розчину 6% NaOH для його підлуження в посівному апараті об'ємом 3200 л.

Для приготування такого об'єму розчину потрібно зважити на терезах 240 г кристалічного натрію. Наважку поміщають у колбу об'ємом 6 л. Після додавання наважки вносять 4 л питної води та стерилізують в автоклаві при 131ºС (0,15 МПа) протягом 30 хв.

ДР 2.3. Приготування піногасника

Др 2.3.1 Приготування піногасника для біосинтезу в посівних апаратах та ферментері об'ємами 40, 400, 3200 л

Піногасник вносимо за необхідності, спостерігаючи за протіканням технологічного процесу. Піногасник вноситься у розрахунку 0.3% від загального об'єму середовища. Для середовища об'ємом 20 л нам знадобиться 60 мл піногасника. Для середовища об'ємом 200 та 1700 л- 600 та 9600 мл відповідно. Для об'єму середовища у 1700 л піногасник готуємо та подаємо через реактор (Р 18) з якого піногасник самопливом буде потрапляти на стадії біосинтезу.

Др 3. Приготування і стерилізація поживних середовищ

Др 3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування у колбах на качалках

Для вирощування інокулянту нам знадобиться 2 л поживного середовища

Таблиця 6.12

Компонент поживного середовища	**Концнтрація, г/л**	**Вміст компонента у 2 л середовища, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, мл**

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 20 л середовища

меляса	20	40	А	1.6 (л)
кукурудзяний екстракт	5	10		
Вода		1550 (мл)		
NaCl	0.8	1.6	Б	109.3
KH_2PO_4x3 H_2O	0.6	1.2		
KNO_3	0.3	0.6		
Вода		109.3 (мл)		
$CaCO_3$	4	8	В	257
Вода		257		
$FeSO_4$	0.007	0.014	Г	26.2
$MgSO_4$ x7 H_2O	0.4	0.8		
Вода		26.2 (мл)		
Усього				**2 л**

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 10 г кукурудзяного екстракту та 40 г меляси. Компоненти поміщають в колбу об'ємом 2.5 л, додають 1550 мл дистильованої води та перемішують.

Потім проводять стерилізацію в автоклаві при t = 112 ^{0} С (30 хв).

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 1.6 г NaCl, 1.2 г KH_2PO_4x3 H_2O, 0.6 г KNO_3. Наважки поміщають в колбу об'ємом 200 мл, додають 109.3 мл дистильованої води, перемішують та закривають ватно–марлевим корком і стерилізують в автоклаві при t = 131 ºС (30 хв).

ДР 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 8г $CaCO_3$. Наважку поміщають в колбу об'ємом 350 мл, додають 257 мл дистильованої води, перемішують та закривають ватно–марлевим корком і стерилізують в автоклаві при t = 131 ºС (30 хв).

ДР 3.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних терезах зважують 0.014 г $FeSO_4$, 0.8 г $MgSO_4$ x7 H_2O. Наважки

Компонент поживного середовища	**Концнтрація, г/л**	**Вміст компонента у 20 л середовища, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, мл**

поміщають в колбу об'ємом 50 мл, додають 26.2 мл дистильованої води, перемішують та закривають ватно–марлевим корком і стерилізують в автоклаві при t = 131 ºС (30 хв).

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 40 л

Таблиця 6.13

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 20 л середовища

меляса	20	400	А	16 (л)
кукурудзяний екстракт	5	100		
Вода		15.5(л)		
Конденсат				1.6 (л)
NaCl	0.8	16	Б	1.09 (л)
KH_2PO_4x3 H_2O	0.6	12		
KNO_3	0.3	6		
Вода		1.09 (л)		
$CaCO_3$	4	80	В	2.57 (л)
Вода		2.57 (л)		
$FeSO_4$	0.007	0.14	Г	261.6
$MgSO_4$ x7 H_2O	0.4	8		
Вода		261.6(мл)		
Усього				**20 л**

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 100 г кукурудзяного екстракту та 400 г меляси. Компоненти поміщають в реактор- змішувач (Р 11) об'ємом 25 л, додають 15.5л дистильованої води та перемішують при 50-100 об/хв. Після перемішування композицію за допомогою відцентрового насоса (Н 1) переносять в інокулятор (ФР 1) та проводять стерилізацію при t = 112 ^{0} С (30 хв).

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 16 г NaCl, 12 г KH_2PO_4x3 H_2O, 6 г KNO_3. Наважки поміщають у колбу об’ємом 1.6 л та додають 1.09 л питної води.

Розчини солей перемішують, закривають колбу ватно-марлевим корком та стерилізують в автоклаві при t = 131 ºС (30 хв).

ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 80 г $CaCO_3$. Наважку поміщають в колбу об'ємом 4 л, додають 2.57 л дистильованої води, перемішують та закривають

Компонент поживного середовища	**Концнтрація, г/л**	**Вміст компонента у 200 л середовища, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, л**

ватно–марлевим корком і стерилізують в автоклаві при t = 131 ºС (30 хв).

ДР 3.2.4. Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних терезах зважують 0.14 г $FeSO_4$, 8 г $MgSO_4$ x7 H_2O. Наважки поміщають в колбу об'ємом 400 мл, додають 261.6 мл дистильованої води, перемішують та закривають ватно–марлевим корком і стерилізують в автоклаві при t = 131 ºС (30 хв).

ДР 2.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання інокуляту в інокуляторі об'ємом 400 л

Таблиця 6.14

меляса	20	4 кг	А	160.7
кукурудзяний екстракт	5	1 кг		
Вода		155.7 (л)		
Конденсат				16.07
NaCl	0.8	160	Б	13.5
KH_2PO_4x3 H_2O	0.6	120		
KNO_3	0.3	60		
$FeSO_4$	0.007	1.4		
$MgSO_4$ x7 H_2O	0.4	80		
Вода		11 (л)		
Конденсат				1.35
$CaCO_3$	4	800	В	25.7
Вода		20.79 (л)		
Конденсат				2.57
Усього				**200 л**

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 200 л середовища

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно- ваговий дозатор (Д 1) в реактор- змішувач (Р 12) об'ємом 200 л поміщають 1 кг кукурудзяного екстракту та 4 кг меляси, додають 125.5 л дистильованої води та перемішують компоненти при 50-100 об/хв. Потім за допомогою відцентрового насосу (Н 2) компоненти переносять до інокулятора (ФР 2) та проводять стерилізацію при t = 112 ^{0} С (30 хв).

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д 2) подають 160 г NaCl, 120 г KH_2PO_4x3 H_2O, 60 г KNO_3, 1.4 г $FeSO_4$, 80 г $MgSO_4$ x7 H_2O у реактор- змішувач (Р 13) об'ємом

23 л та додають 13.5 л питної води. Після завантаження компонентів додають розчин хлоридної кислоти (ДР 2.1.1) до досягнення pH 4-4,5(pH- метр) Для кращого розчинення солей розчин підігріваю до 40 ^{0}C та перемішують при 50-100 об/хв. Стерилізують середовище при t = 131 ºС (30 хв).

Потім розчини за допомогою насоса (Н 3) переносять в інокулятор (Ф 2) об'ємом 400 л.

Компонент поживного середовища	**Концнтрація, г/л**	**Вміст компонента у 1700 л середовища, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, л**

ДР 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 800 г $CaCO_3$. Наважку переносять у реактор-змішувач (Р 14) об'ємом 40 л, додають 25.7 л питної води. Для розчинення солі встановлюють режим перемішування при 50-100 об/хв. Стерилізують при температурі 131 °С упродовж 30 хв. Після проведення стерилізації розчин за допомогою насоса (Н 4) переносять в інокуляор (ФР 2)

ДР 2.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання біомаси у виробничого ферментері об'ємом 3200 л

меляса	20	34 (кг)	А	1366
кукурудзяний екстракт	5	8.5 (кг)		
Вода		1323.5 (л)		
Конденсат				136.6
NaCl	0.8	1.36 (кг)	Б	115
KH_2PO_4x3 H_2O	0.6	1.020 (кг)		
KNO_3	0.3	510		
$FeSO_4$	0.007	11.9		
$MgSO_4$ x7 H_2O	0.4	680		
Вода		115 (л)		
Конденсат				11.5
$CaCO_3$	4	6.8 (кг)	В	218.5
Вода		218.5 (л)		
Конденсат				21.82
Усього				**1700 л**

Таблиця 6.15

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1700 л середовища

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об’ємно- ваговий дозатор (Д 3) у реактор- змішувач (Р 17) об'ємом 2000 л додають 8.5 кг кукурудзяного екстракту та 34 кг меляси. Після завантаження компонентів у реактор подають 1323.5 л дистильованої води та перемішують при 50-100 об/хв. Потім за допомогою відцентрового насосу (Н 7) компоненти переносять у виробничий ферментер (ФР 3) об'ємом 3.20 $м^3$ та проводять стерилізацію при t = 112 ^{0} С (30 хв).

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д 4) подають 1.36 кг NaCl, 1.020 кг KH_2PO_4x3 H_2O, 510 г KNO_3, 11.9 г $FeSO_4$, 680 г $MgSO_4$ x7 H_2O у реактор- змішувач (Р 15) об'ємом 200 л та додають 115 л питної води. Після завантаження компонентів додають розчин соляної кислоти (ДР 2.1.2) до досягнення pH 4-4,5(pH- метр). Для кращого розчинення солей розчин підігріваю до 40 ^{0}C та перемішують при 50-100 об/хв, стерилізують середовище при t = 131 ºС (30 хв).

Потім розчини за допомогою насоса (Н 5) переносять у виробничий ферментер (ФР 3) об'ємом 3200 л.

ДР 3.4.3. Приготування та стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д 5) подають 6.8 кг $CaCO_3$ у реактор- змішувач (Р 16) об'ємом 300 л, додають 218.5 л питної води. Для розчинення солі встановлюють режим перемішування 50-100 об/хв. Стерилізують при температурі 131 °С упродовж 30 хв. Після стерилізації розчин за допомогою насоса (Н 6) переносять у виробничий ферментер (ФР 3)

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 зберігають у пробірках зі скошеним середовищем Эшби складу(%): сахароза- 2, KH_2PO_4- 0,02, $MgSO_4$- 0,02, NaCl- 0,02, $CaCO_3$- 0,05, NH_4NO_2- 0,02, K_2SO_4- 0,5, агар- 2 при 4°С. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 4.2. Отримання робочої культури

Культуру із ТП 3.1 пересівають петлею в чашки Петрі із середовищем Эшби складу(%): сахароза- 2, KH_2PO_4- 0,02, $MgSO_4$- 0,02, NaCl- 0,02, $CaCO_3$- 0,05, NH_4NO_2- 0,02, K_2SO_4- 0,5, агар- 2 та вирощують протягом 36 годин при температурі 30^0C.

ТП 4.3. Вирощування в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об’ємом 2.5 л з стерильною композицією Г (від ДР 3.1.1) зливають простерилізовані композиції А, Б, В (від ДР 3.1.2.–3.1.4.), перемішують і розливають по 150 мл у 14 качалочних колб об’ємом 750 мл.

У чашки Петрі з культурою *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 вносять 5 мл фізіологічного розчину, який купуємо, та змивають клітини. Потім відбирають піпеткою супензію клітин та переносять у колби з поживним середовищем і вирощують при t=30 ^{0}C протягом 36 годин.

ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л

В інокулятор об’ємом 40 л з композицією А об'ємом 16 л (від ДР 3.2.1) вносять композицію Б об'ємом 1.09 л (від ДР 3.2.2.), В об'ємом 2.57 л (від ДР 3.2.3) та композицію Г об'ємом 216.6 мл (від ДР 3.2.4) через засівну колбу додать посівний матеріал 2000 мл (від ТП 3.3), включають перемішуючий пристрій (200-250 об/хв), аерацію та подають глуху пару та холодну воду в сорочку інокулятора, подають аераційне повітря (від ДР 1.7). За потреби слід внести 100 мл піногасника (від ДР 2.3.1). Культивування проводять при 30 ^{0}C протягом 36 годин. Відбір проб для здійснення мікробіологічного контролю та визначення біомаси проводять кожні 8 годин.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 400 л

В інокулятор з композицією А (від ДР 3.3.1) переносять 13.5 л композиції Б (ДР 3.3.2) із реактора та 25.7 л композиції В (від ДР 3.3.3). Потім засівною колбою додають 400 мл розчину NaOH (від ДР 2.2.1).

Після підлужнення в середовище вносять посівний матеріал через трубу перетискування (від ТП 3.4), включають перемішуючий пристрій (200-250 об/хв), подають аераційне повітря (від ДР 1.7), глуху пару та холодну воду в сорочку інокулятора. Культивування проводять при 30 ^{0}С протягом 36 годин. За потреби слід внести 1000 мл піногасника (від ДР 2.3.1). Відбір проб для здійснення мікробіологічного контролю та визначення біомаси проводять кожні 8 годин.

ТП 5. Виробничий біосинтез

ТП 5.1. Промислове культивування *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 в ферментері об'ємом 3200 л

У ферментер з композицією А (від ДР 3.4.1) переносять 115 л композиці Б (від ДР 3.4.2) із реактора та 218.5 л композиції В (від ДР 3.4.3) яка також переноситься з реактора. Потім із збіника додають 3400 мл розчину NaOH (від ДР 2.2.2).

Після підлужнення в середовище вносять посівний матеріал через трубу перетискування (ТП 3.5), включають перемішуючий пристрій (200-250 об/хв), подають аераційне повітря (від ДР 1.7), глуху пару та холодну воду в сорочку інокулятора. Культивування проводять при 30 ^{0}С протягом 36 годин. За потреби слід внести 10 л піногасника (від ДР 2.3.1). Відбір проб для здійснення мікробіологічного контролю та визначення біомаси проводять кожні 8 годин. Після процесу культивування культуральну рідину *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 за допомогою відцентрового насоса (Н 8) переносять у реактор для подальших процесів отримання препарату.

РОЗДІЛ №7

Контроль виробництва

7.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль проводиться методом розсіву бактерій на чашки Петрі з МПА і СА середовищем та подальшим їх мікроскопуванням [25].

На знежирене предметне скло за допомогою стерильної петлі наносять краплину культуральної рідини *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 та розподіляють за допомогою бактеріальної петлі по всій поверхні скла. Мазок висушують над полум'ям пальника, фіксують і розглядають з об'єктивом на 90х або 40х [14].

Бактерії штаму *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 мають форму паличок правильної форми із заокругленими кінцями та мають слизову оболонку із полісахаридів (рис. 5.1). Розміри клітин варіюються в межах 1-4 мкм [15].

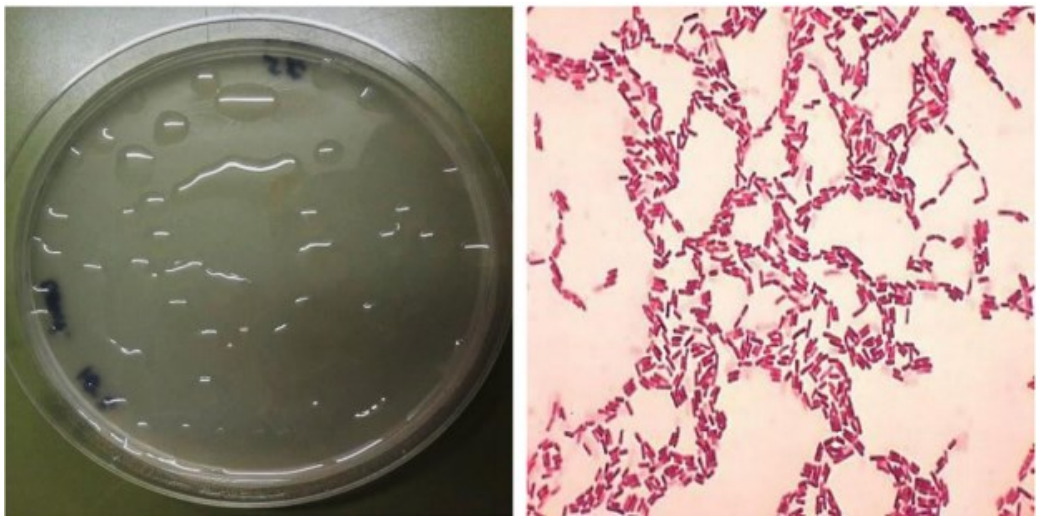

Рис.7.2. Колонії і клітини штаму *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 [16]

Такий спосіб виявлення сторонньої мікрофлори є надто тривалим в часі. Для швидшого виявлення сторонніх мікроорганізмів здійснюють мікроскопіювання за методом "роздавлена крапля"

7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.2.1 Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси бактерій роду *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 визначають гравіметричним методом.

Суть методу полягає у центрифугуванні пробірок з культурою з подальшим висушуванням у сушильній шафі та зважування на аналітичних вагах.

Визначення проводять за формулою:

$$M = \frac{(A - B)X1000}{V}$$

М-суха біомаса в г/л; А- маса центрифужної пробірки з осадом; В- маса центрифужної пробірки без осаду(г); V- Об'єм культуральної рідини, узятий для центрифугування, мл [26].

7.2.2 Визначення концентрації карбону та нітрогену

Джерела карбону визначають за допомогою оптичного методу з використанням реактиву DNSA.

Культуральну рідину центрифугують, потім відбирають 120 мл проби та додають реактив DNSA. Після додавання реактиву пробу витримують при температурі 100 ^{0}C, потім 5 хв при температурі 0 ^{0}C. Наступним етапом у пробірку з пробою додають 6 мл дистильованої води та вимірюють оптичну густину розчину при 540 нм на фотоелектроколориметрі [27].

Джерелом нітрогену слугує кукурудзяний екстракт. Визначення вмісту нітрогену у ньому проводять за мідним методом.

В основі методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть методу полягає в тому, що до слаболужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії $Cu_3(PO_4)_2$ у боратному буферному розчині. При цьому

утворюються розчинні мідні з’єднання. Для їхнього відокремлення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату додають оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з’єднання і перетворюється в ацетат міді. Щоб визначити вміст міді яка брала участь у реакції, до розчину додають йодид калію. У результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентній кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитровують розчином тіосульфату натрію [28].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пат. № 2015000929 RU. Штам *Paenibaclllus mucilaginosus*, используемый в качестве удобрения и для стимуляции роста и защиты растений от грибковых болезней/ Пластінін Сергій Аркадійович. Опубл 25.12.2015.

2. Канарский А.В., Канарская З.А., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н. Эффективность культивирования бактерий рода *Paenibacillus mucilaginosus* на питательной среде на основе сахарозы. Научный журнал НИУ ИТМО. 2019. doi: 10.17586/2310-1164-2019-12-3-62-72.

3. Пат. № 2015148020 RU. Штамм бактерий *Paenibacillus mucilaginosus*, способ стимуляции роста и защиты растений от болезней и применение штамма бактерий Paenibacillus mucilaginosus в качестве удобрения и агента биологического контроля (противопатогенного средства) в профилактике или лечении заболевания растений / Пластинин С.А., Здорнов А.В., Никульшин В.А. Опубл 16.05.2017. Бюл. № 22.

4. Пат. № 2408722C1 RU. Штамм бактерий *Bacillus mucilaginosus* Bac 1208, обладающий повышенными фосфор и калий мобилизующими свойствами и удобрение на его основе / Пластинин С.А., Никульшин В.А., Здорнов А.В. Опубл. 10.01.2011.

5. M. Singh, D. Gupta, A. Pandey, A. Kumar. Amelioration in sustainable agriculture. 2019 . doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00003-3.

6. Канарская З.А., Канарский А.В., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н. Прикладная химия и биотехнология том 9 N 3. 2019. 509–518. doi: 10.21285/2227-2925-2019-9-3-509-518

7. Мережа садових гіпермаркетів “Дарвін” Біодобриво “Фосфатовіт”: https://darvin-market.ru/catalog/products/udobrenie-zhidkoe-fosfatovit-universalnoe-mikrobiologicheskoe-220ml-4627073510029/

8. “Центральная станция защиты растений”. “Фосфатовит 220 мл удобрения”. https://shop.szr.su/catalog/udobreniya/azotovit_i_fosfatovit_udobreniya/4114/

9. “Кактус”.” Фосфатовит универсальное микробиологическое удобрение” https://www.cactus.plus/productpage/%D1%84%D0%BE%D1%81%D1%84%D0%B

0%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%82%D1%83%D0%BD%D0%B8%D0%B2%D0%B5%D1%80%D1%81%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D1%8B%D0%B9

10. “Agronet. Com. ua”. ”Азотовіт і Фосфатовіт- інструкція із застосування, склад та відгуки”. https://agronet.com.ua/azotovogo-i-fosfatovit-instruktsiya-iz-zastosuvannya-sklad-ta-vidguki.html

11. Садовий центр природного земледелия “Плодородие”. ”Фосфатовит” https://plodorodie76.ru/shop/bioudobrenia/mikrobiologicheskie-preparaty/fosfatovit/

12. “Промишленные инновации”. “Фосфатовит - микробиологическое удобрение, повышающее доступность фосфора и калия для растений” http:// http://www.floraprice.ru/articles/udobreniya-podkormki-biopreparaty/fosfatovit-mikrobiologicheskoe-udobrenie.html.

13. Экологическое земледелие “Фосфатовіт 220мл” https://eco24.shop/catalog/mikrobiologicheskie_udobreniya/267/

14. Віннікова О.В., Раєвська І.М. Практикум з мікробіології. 2016. - 66 с.

15. Cui Shang, Anwei Chen, Guiqiu Chen, Huanke Li, Song Guan, Jianmin He. Appl Biochem Biotechnol. 2016. doi: 10.1007/s12010-016-2195-4.

16. A. Vardanian, E. Kurzbaum, Y. Farber, M. Butnariu, R. Armon. Folia Microbiologica. 2018, 63:401–404. https://doi.org/10.1007/s12223-017-0567-y.

17. “Biorus”.” Промышленный ферментер BIORUS 3000L”. https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-(laboratornyie-i-promyishlennyie)/promyishlennyij-fermenteryi-i-bioreaktoryi-(rossiya-,-biorus%C2%AE-)/promyishlennyij-fermenter-biorus-3000l.html

18. Вембер В.В. Методичні вказівки до проведення практичних (семінарських) занять та довиконання самостійної роботи з курсу «Основи мікробіології». 2012. – 85с.

19. Т.П. Пирог, О.А. Ігнатова. Загальна біотехнологія: Підручник.-К.:НУХТ, «009.-336 с.

20. Інтернет-магазин дизінфікуючих засобів. Дизінфікуючий засіб «Клиндез». https://clean-ua.com.ua/ru/klinidez-1kg/

21. Санітарно-гігієнічне обладнення ТОВ «АТМА». Засіб дезінфікуючий для поверхонь DEZALDUM 20 5л. https://atma.ua/profesijna-himiya/spetsializovani-zasoby/zasib-dezinfikuyuchyj-dlya-poverhon-dezaldum-20-5l-da015000/

22. Дезцентр плюс. Био-хлор Т. https://dezmed.com.ua/ru/store/khlorsoderzhashhie-preparaty/bio-khlor-t/

23. Prom.ua, ТОВ «Гігієна-Мед Стерил». Засіб дезінфекції ДЕЗолайт. https://prom.ua/ua/p1175063176-sredstvo-dezinfektsii-dezolajt.html

24. Пущинские лаборатории/ Автоклав WAC-47 + 2 проволкових корзин. https://www.laboratorii.com/oborudovanie-dlja-laboratorij/avtoklavy/avtoklav-wac-47-2-provolochnykh-korziny/ . Дата: 01.11.2021

25. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв. 2019. - 252 с.

26. Корнієнко І.М. Методичні вказівки до лабораторних робіт з дисципліни «Промислова та екологічна біотехнологія». Опубл. 18.05.2017.

27. Морозова Ю. А., Скворцов Е. В., Алимова Ф. К., Канарский А. В. Биосинтез ксилаз и целлюлаз грибами роду *Trichoderma* на послеспиртовой барде.

28. Куц А.М., Бондар М.В., Булій Ю.В. Методичні вказівки до виконання лабораторного практикуму студентам заочної форми навчання напряму напряму підготовки 6.051701 ‘‘Харчові технології та інженерія”. НУХТ, 2011. – 53 с.