

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

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

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

« » лютого 2022 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНИКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

« » лютого 2022 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Промислова біотехнологія»

на тему: Біотехнологічні аспекти очистки ґрунтів від важких металів

Виконала: здобувачка ІІ курсу, групи 01

ГАВРИЛЕНКО Ярослава Володимирівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

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

Консультанти _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Андрій БАВОЛ
(ім'я та прізвище) (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) незарядженої допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

«03» листопада 2021 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ГАВРИЛЕНКО Ярославі Володимирівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологічні аспекти очищення ґрунтів від важких металів

керівник роботи СЛОБОДЯН Ольга Петрівна, доцент,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від «02» листопада 2021 року № 865-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи $K_{колб} = 0,2$; $K_{на} = 0,6$; $K_{фа} = 0,6$; $K_{ф} = 0,5$; біопрепарат для
очистки ґрунту від важких металів; *Bacillus fastidiosus* ВКПМ В-4368

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Огляд літературних джерел, обґрунтування вибору біологічного агенту, техніко-економічне обґрунтування, параметри культивування біологічного агенту, обґрунтування способу виділення цільового продукту, особливості технології виробництва, методи контролю виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема та технологічна схема (2 листа А1)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена дослідженню біотехнологічних аспектів очистки ґрунтів від важких металів. Сьогодні існує маса методів вилучення важких металів з ґрунту. Але аби досягти відмінних результатів методики варто використовувати комплексно. Для кваліфікаційної роботи запропоновано виготовляти біопрепарат на основі штаму продуценту *Bacillus fastidiosus* ВКІІМ В-4368. Розрахована потужність виробництва складає 2,5 м³ культуральної рідини за цикл.

Головним фактором в даній роботі є вибір та характеристика біологічного агента, характеристика кінцевої продукції виробництва, процес біосинтезу та виділення, ці етапи включають в себе допоміжні роботи (приготування мийних засобів, підготовка повітря, приготування та стерилізація поживного середовища, тощо) та основні процеси (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторі та посівному апараті, виробничого біосинтезу, підкислення культуральної рідини, пакування готової продукції), підбір обладнання для ферментаційних та післяферментаційних процесів.

Складається зі вступу, шести розділів, графічних матеріалів (апаратурної та технологічної схем формату А1) та списку використаної літератури (89 джерел).

Кваліфікаційна робота викладена на 73 сторінках друкованого тексту, містить 11 таблиць, 4 рисунків.

Ключові слова: *Bacillus fastidiosus* ВКІІМ В-4368, важкі метали, очисник ґрунту, біопрепарат, поживне середовище, біосинтез, культуральна рідина, підкислення, знешкодження відходів, зберігання продукції на складі, контроль готової продукції.

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. МЕТОДИКИ ОЧИЩЕННЯ ҐРУНТІВ ВІД ВАЖКИХ МЕТАЛІВ.....	5
1.1. Причини забруднення ґрунтів важкими металами.....	5
1.2 .Біотехнологічні методи очистки ґрунтів від важких металів.....	6
1.3. Вплив факторів на мікробне очищення від важких металів.....	20
РОЗДІЛ 2.ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.	22
2.1. Потреба в цільовому продукті	22
2.2. Розрахунок потужності виробництва	24
2.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	26
РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	28
3.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування.....	28
3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера...	33
3.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту	35
3.4. Обґрунтування вибору товарної форми випуску продукту мікробного синтезу (упаковки).....	36
РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	38
РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	41
РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	54
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	63
ДОДАТКИ	

ВСТУП

Глобальною проблемою людства на сьогоднішній день є забруднення довкілля важкими металами в основному відбувається за рахунок атмосферних викидів підприємств [15, 23], відходів тваринницьких ферм та внаслідок застосування мінеральних добрив і отрутохімікатів [13, 41]. Органічні добрива — гній і компост, також містять значну кількість важких металів. У результаті внесення у ґрунт органіки, в ньому зростає концентрація таких хімічних елементів як свинець, кадмій, мідь, цинк, залізо, марганець [5]. Враховуючи повільне виведення важких металів з ґрунту, при тривалому надходженні навіть відносно невеликих кількостей кадмію і свинцю, їх концентрація з часом може досягати дуже високих показників. Значна кількість кадмію надходить у навколишнє середовище з продуктами горіння. Вміст кадмію у деревній золі коливається у межах від 2 до 30 мг/кг [3, 12], а в золі з соломи сягає 10 мг/кг [12].

Значне забруднення кадмієм атмосфери, ґрунту і води відбуваються при лісових пожежах. Оскільки зола має лужну реакцію, наявний у її складі кадмій нерозчинний у воді і погано засвоюється рослинами, проте він накопичується у ґрунті і при закисленні стає доступним для рослин [30].

Суттєву частку в забрудненні кадмієм і свинцем ґрунтів, які знаходяться вздовж автомагістралей вносять викиди автомобілів. Після припинення дії чинників, що збільшують вміст цих важких металів, їх концентрація у ґрунтах довгий час залишається високою внаслідок тривалого терміну виведення. Зокрема, у багатьох країнах, незважаючи на відмову від виробництва бензину, до складу якого входить свинець, вміст цього металу у ґрунтах вздовж доріг надалі залишається високим [43].

Тому аби уникнути вищевказаних проблем у світі було проведено значну кількість досліджень для вивільнення важких металів з ґрунту. Серед доступних та широковживаних є: механічні, фізико-хімічні та біологічні методи.

Актуальністю кваліфікаційної роботи є застосування технологій, заснованих на використанні біопрепаратів, це перспективний спосіб ліквідації забруднень. Цей спосіб відрізняє високий ступінь очищення, економічність, простота, надійність і екологічність; крім того, він вдало комбінується з механічними і фізичними способами. Технологія біоочищення полягає в нанесенні біопрепаратів на забруднену поверхню або його змішуванні із забрудненими субстратами у присутності біогенних елементів (азоту, фосфору, калію і ін.) у вигляді звичайних мінеральних добрив при інтенсивній аерації.

Новизною роботи є виготовлення біопрепарату на основі штаму *Bacillus fastidiosus* ВКПМ В-4368. Даний штам є ефективним очисником від кадмію, свинцю, цинку та решти важких металів.

РОЗДІЛ 1. МЕТОДИКИ ОЧИЩЕННЯ ҐРУНТІВ ВІД ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

1.1 Причини забруднення ґрунтів важкими металами

В останні роки при оцінці стану навколишнього середовища і нормуванні її якості стає домінуючий екологічний підхід. Зокрема, пропонується оцінювати ступінь негативного впливу хімічного забруднення на основі підходу за ступенем порушення екологічних та господарських функцій, які виконуються ґрунтом в природній екосистемі, агроекосистемі або урбосистемі [1]. Як критерій порушення екофункцій використовують інтегральний показник біологічного стану ґрунту, який базується на основі набору найбільш інформативних біологічних показників, перший реагує на антропогенний вплив.

Важкі метали, що потрапляють в навколишнє середовище в результаті виробничої діяльності людини, є небезпечними забруднювачами біосфери [2]. Вони здатні накопичуватися в окремих ланках трофічного ланцюга і таким способом вони потраплятимуть в організми вищих тварин і людини, пригнічуючи їх метаболічну активність і негативно впливаючи на життєдіяльність. У зв'язку з цим актуальним є огляд сучасних технологій очищення ґрунтових об'єктів природного середовища, забруднених важкими металами.

Забруднення навколишнього середовища неминує призводить до необхідності оцінювати можливі наслідки даного явища та розробляти заходи щодо його усунення. Потік поллютантів, що потрапляють в ґрунт, стають причиною деформації мікробоценозів при одноразовому впливі і їх еволюції при пролонгованому потраплянні важких металів. Характер змін в складі і функціонуванні мікробоценозів фіксується набагато швидше, ніж в фітоценозах, завдяки високій швидкості розмноження більшості

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Гавриленко Я.В.</i>			РОЗДІЛ 1. МЕТОДИКИ ОЧИЩЕННЯ ҐРУНТІВ ВІД ВАЖКИХ МЕТАЛІВ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Слободян О.П.</i>					5	73
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков</i>						

представників мікробіоти. Тому ідея використання мікроорганізмів в біомоніторингу надзвичайно приваблива для екологів, бактеріологів, альгологів, мікологів, протозоологів та біотехнологів.

У світі існують органічні та неорганічні забруднювачі, але забруднення ґрунтів важкими металами є масштабною проблемою сьогодення. В Україні на забруднення ґрунтів важкими металами припадає понад 37% випадків, 33,7% випадків забруднення мінеральними маслами, 13,3% випадків – поліциклічними ароматичними вуглеводнями і т. д.[3].

Очищення забруднених ґрунтів від важких металів, залишків пестицидів є невідомою проблемою для України. Забруднення ґрунту вважається результатом функціонування підприємств металургії та хімічної промисловості, а також нераціонального застосування хімічних засобів захисту рослин в аграрному секторі виробництва. Діапазон таких препаратів, а також площі забруднених ґрунтів зростають з кожним роком[4].

Тож для того аби вирішити дану проблему, в дипломному проекті наведені методи очистки ґрунтів від важких металів, які активно використовуються у всьому світі.

1.2 Біотехнологічні методи очистки ґрунтів від важких металів

В наукових роботах вітчизняних вчених описуються різноманітні методи очистки, зокрема: механічні, фізико-хімічні та біологічні.

Сутність механічного методу очистки полягає в тому, що верхній шар ґрунту необхідно знімати та поміщати в контейнер на біотехнологічне зберігання. Але повертаючи очищений шар ґрунту на місце, до нього повертаються важкі метали котрі накопичилися в нижчому шарі ґрунту. Отже, даний метод є неефективним, та досить затратним.

Фізико-хімічні методи побудовані на відповідних комплексах десорбентметал та додатково вимивання за допомогою розчинника. В порівнянні з механічними методами, фізико-хімічні методи менш затратні та краще очищають ґрунт. Але є й негативний нюанс, вимивання комплексу десорбентметал різними розчинниками може негативно впливати на

властивості ґрунтів. Тож аби використовувати даний метод на практиці варто не забувати про наступні фактори: рН, температура, час, природа десорбуючої речовини тощо.

Екологія нині є поширеним трендом в світі, тож біологічні методи досить популярні сьогодні, оскільки вони є ефективні та нетоксичні за рахунок свого складу. Проте існують різновиди біологічних методів до них відносять: біоремедіацію, фітоекстракцію, очищення за використання мікроорганізмів, очищення за допомогою препаратів ПАР, очищення комплексних забруднень нафтою і важкими металами за допомогою мікроорганізмів і препаратів ПАР.

Біоремедіація це процес, за допомогою якого органічні або неорганічні відходи біологічно розчеплюються або перетворюються, як правило, в нешкідливі матеріали. Процес може функціонувати природним чином або може бути посилений додаванням акцептора електронів, поживної речовини або інших чинників. Таким чином, в ньому використовуються відносно недорогі низькотехнологічні методи, які, як правило, користуються великим суспільним визнанням і часто можуть бути виконані на місці [43].

Щоб біоремедіація була ефективною, мікроорганізми повинні ферментативно атакувати забруднювачі і перетворювати їх в нешкідливі продукти. Оскільки біоремедіація може бути ефективною тільки там, де умови навколишнього середовища допускають зростання і активність мікроорганізмів, її застосування часто включає маніпулювання параметрами навколишнього середовища, щоб дозволити протікати більш швидкими темпами [43].

Принципи біоремедіації можна розділити на кілька методів, включаючи біофільтрацію, біовентіляцію, біосорбцію, компостування, біоаугментацію, біореактор, землеробство і біостимуляцію [42]. Вчені зазначають, що контроль і оптимізація процесів біоремедіації є складним фактором. Ці чинники включають наявність мікробної популяції, здатної розкласти забруднювачі, доступність забруднювачів для мікробної

популяції і фактори навколишнього середовища, такі як тип ґрунту, температура, рН, присутність кисню або інших акцепторів електронів і поживні речовини.

Біосорбція - це група всіх процесів, під час яких жива чи мертва біомаса видаляє важкі метали з ґрунту[44].

Практичне застосування біосорбції для видалення або відновлення важких металів в основному є результатом оборотності цього процесу. Десорбція дозволяє витягувати метали (що вигідно в разі більш цінних важких металів, таких як золото, мідь і цинк) або їх видаляти. У процесі десорбції металів, пов'язаних мікроорганізмами, застосовуються розчини слабких розчинів мінеральних кислот (наприклад, 0,1 М НСІ) або хелатуючих з'єднань (наприклад, 10 мМ ЕДТА) [45]. В діапазоні рН 5-7 іони металів, таких як Cu^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} і Co^{2+} , міцно пов'язані з мікробної біомасою. Зниження рН до значення 2 викликає вивільнення металів з біосорбентів. Однак іони металів, такі як Au^{2+} і Ag^{2+} , залишаються при цьому рН в біосорбенті [44].

Біосорбенти можуть виступати [46]:

- Біомасою мікроорганізмів є вторинним продуктом в каналізаційній або фармацевтичної промисловості, а також в процесах очищення стічних вод;

- Мікроорганізми з культивуються і розмножуються на спеціальній основі із зазначенням здатності ефективно виводити метали;

- Сорбенти рослинного або тваринного походження (у вигляді горіхової шкаралупи, танінів з кіркою, морських рослин, перегною, мохового торфу і т. д.)

Науковці [63] досліджували біосорбцію іонів Cu (II) міцеліальними гранулами *Rhizopus oryzae*. Оцінювали вплив діаметра гранул, рН розчину, часу контакту, початкової концентрації металу та температури. Ефективність

видалення металів іонів Cu (II) з використанням міцелієвих гранул спостерігалася як 34 мг / г через дві години.

Біоаугментація - внесення (у вигляді біопрепаратів) спеціалізованих мікроорганізмів, чужорідних для даного місця проживання, які заздалегідь були виділені з природних джерел або спеціально генетично модифіковані та селекціоновані. Вони володіють необхідною біодеградуючою активністю, стійкі до високих концентрацій поллютанта і не володіють небажаними побічними ефектами. Внесені мікроорганізми розкладають основну масу забруднень, знижують їх негативний вплив на біоту і тим самим стимулюють процеси самоочищення. [41]

До біопрепаратів для рекультивації і відновлення родючості ґрунтів можна віднести:

- різні органічні відходи та ін. матеріали, модифіковані при хімічній або мікробіологічній дії, в процесі анаеробного зброджування, аеробної ферментації, компостування або вермикомпостування;
- спеціалізовані препарати на основі мікроорганізмів і ферментів: біодобрива, які включають азотфіксатори, препарати ендомікоризних грибів та ін.;
- біопрепарати проти збудників різних захворювань рослин (засоби захисту рослин), для поліпшення фітосанітарного стану ґрунтів. [43]

У науковій роботі Шуліпи Є.О., йде згадка про біоаугментацію в основу даного методу покладено розробка біопрепарату на основі гумінових кислот [5].

Мікробіологічні перетворення важких металів - це реакції окислення, відновлення, метилування та диметилування. У реакціях беруть участь ферментні системи мікроорганізмів. Практично корисними можуть бути реакції відновлення значно токсичних або цінних металів, такі як грампозитивні бактерії, виділені з колекторів шкіряного заводу, що викликають відновлення високотоксичного хрому (VI) до менш токсичного хрому (III), який може бути видалений з навколишнього середовища [44].

Будь-які бактерії, мікроскопічні гриби, можуть відновлювати іони металів (особливо цінних, таких як золото або срібло) до металевої форми. Ця реакція може відбуватися в вакуолях, на поверхні клітини і в позаклітинному середовищі, що важливо з точки зору вилучення цього металу [44,45].

В результаті активності мікроорганізмів може відбуватися осадження або кристалізація сполук важких металів, що викликає помірне перетворення металу в форму, що в той же час знижує їх токсичність. Деякі процеси осадження та біокристалізації беруть участь в біогеохімічних циклах, таких як, накопичення заліза, марганцю, мінералізація срібла і марганцю[45].

Біовилуження, в основі цього процесу лежить перетворення з'єднань металів, присутніх в навколишньому середовищі у вигляді важкорозчинних речовин (найчастіше сульфідів), в легкорозчинній формі, видалення металів з яких є легким завданням [44].

Здатність грибів до біовилуження, мобілізація металів з промислових відходів пов'язана в основному з двома процесами: вмістом різних органічних кислот в середовищі існування (лимонна кислота, глюконова кислота, щавлева кислота) і виділенням речовин, що поліпшують колір обличчя. До таких грибів можуть бути включені наступні типи: *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*, *Alternaria sp.* , *Cladosporium sp.* дані гриби відзначаються високою стійкістю до таких факторів як рН і температура. Застосовується в основному тоді, коли неможливо застосувати класичні методи хімічного або бактеріального вилуговування з застосуванням *A. ferrooxidans* і *A. thiooxidans* [42].

Біологічні методи вилуговування в основному використовуються в біогідрометалургії. Мікробіологічні процеси можуть застосовуватися для вилуговування металів з сульфідних і оксидних мінералів. Такі метали як арсин, сурма, вісмут, цинк, кобальт, золото, свинець, мідь, молібден, нікель, ванадій і уран можуть бути вилучені за допомогою біогідрометалургійних

методів. На даний момент промислове застосування цих методів в світі обмежується в основному вилуговуванням міді, золота і урану[45].

Китайські вчені вивчали способи біологічного вилуговування забруднених важкими металами ґрунтів через штам *Burkholderia*, що виробляє біоповверхневі речовини *Burkholderia* sp. Z-90, і вони показали, що ефективність видалення Zn, Pd, Mn, Cd, Cu та As у ґрунтах може бути досягнута до 44,0%, 32,5%, 52,2%, 37,7%, 24,1% та 31,6%, відповідно. Deng використовував корінні бактерії *Penicillium chrysogenum* штам F1 для вилуговування важких металів із забрудненого ґрунту, і біодоступність та токсичність важких металів значно зменшилися з моменту перетворення специфікації важких металів[38].

Існують різні види **фіторе mediaції**: фітоекстракція, фітостабілізація, фітодеградація, фітостимуляція, ризофільтрація, ризодеградація, фітовипаровування тощо [44,45].

Фітоекстракція – це видалення важких металів та інших поллютантів з забрудненого ґрунту за допомогою рослин. Даний спосіб був досить популярним за часів існування СРСР. Прикладом слугує тополя, оскільки вона витримує всі вимоги, а саме : стійкість до високих концентрацій металів у ґрунті, здатність поглинати декілька металів одночасно у високих концентраціях, забезпечення ефективного транспорту важких металів із кореневої системи у зелену частину рослини, висока швидкість росту, стійкість до різноманітних хвороб і шкідників.

Поглинання забруднюючих речовин та їх розподіл у рослинах залежить від їх біодоступності, яка складається із доступності поллютантів (їх фізико-хімічних властивостей : розчинність у воді, молекулярна маса тощо), характеристик середовища (кислотність, гранулометричний склад ґрунту, рівень гумусу, вологість та ін.) і фізіологічних та морфологічних особливостей рослин (рівень стійкості до дії забруднювачів, рівень розвиненості кореневища тощо). [39]

Особливість **фітоекстракції** – поглинання забруднювачів кореневою системою рослин разом з поживними речовинами й транслокація їх у надземні органи. По завершенні вегетації й транслокаційних процесів надземні органи рослин скошуюють і піддають відповідній переробці [47]. Наприклад, після озолення зібраної біомаси зола стає джерелом кольорових металів. Якщо одержання металів із золи обходиться дорожче їхньої собівартості, то біомасу рослин компостують. Ефективність фітоекстракції визначається коефіцієнтом біоаккумуляції, що дорівнює відношенню концентрації металів у рослинах до концентрації їх у ґрунті або в забрудненій воді [48].

У роботі *Adejumo Sifau* та ін. (2011) досліджено вплив неорганічного добрива (NPK, 100 кгN/га), компостів із касави (*Manihot utilissima Pohl.*) і тітонії (*Tithonia diversifolia*) у концентраціях 20 і 40 т/га на процес іммобілізації Pb у ґрунті, в якому вирощували кукурудзу (*Zea mays L.*). Встановлено, що концентрація рухомого свинцю у ґрунтовому середовищі при застосуванні компосту із тітонії і касави у кількості 40 т/га, знизилась на 71,6% і 67,33% а при 20 т/га – відповідно на 66,06% і 49,47%. Додавання компосту сприяло збільшенню висоти рослини на 89 – 94%, а також площі листків та їх кількості (особливо при внесенні у ґрунт компосту із тітонії у концентрації 40 т/га) [35].

У дослідженнях китайські вчені (*Puhui Ji* та ін., 2011) у якості фіторемедіанта забруднених кадмієм ґрунтів (1,91 мг/кг) також використовували *Solanum nigrum L.*, але для покращення росту рослини у ґрунт також додавали добрива [36]. Згідно із отриманими результатами, для збільшення вилучення металу на 75% рекомендовано саджати рослину двічі на рік у забруднений ґрунт [37]. Додавання добрив (NH_4NO_3 у концентрації 400 кг/га, NH_4NO_3 і $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ – 600:300 кг/га і 300:600кг/га, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ – 600 кг/га) не сприяло збільшенню біомаси рослини і скороченню терміну фіторемедіації. Таким чином, *Solanum nigrum L.* є найбільш ефективним у процесі очищення за умови помірного рівня забруднення ґрунтів, а також має

відносно велику біомасу врожаю у порівнянні з іншими відомими фіторемедіантами – альпійською яруткою (*Thlaspi caerulescens*) і кардаминописом галлера (*Arabidopsis halleri*) [38].

Фітостабілізація являє собою ефективний захід використання рослинності для очищення ґрунту від забруднюючих речовин шляхом модифікації хімічних речовин, використання біологічних та фізичних процесів у ґрунті. Переміщення забруднювача у ґрунті може бути зменшено внаслідок всмоктування та накопичення його коренями; адсорбції кореневою системою; опадів; комплексоутворення або зменшення валентності металів у ґрунті в межах кореневої зони; зв'язування з гуміновими (органічними) речовинами через процес гуміфікації. Крім того, рослинність може зменшувати вітрову та водну ерозію ґрунту, запобігаючи розповсюдженню забруднювача в стоки, перешкоджати викидам пилу, утворенню вихлопних газів [49].

Літературних даних та наукових досліджень про ремедіаційну здатність енергетичних культур сьогодні бракує, але низка науковців відмічає, що очищення ґрунтів від полютантів ефективніше відбувається шляхом фітостабілізації. Над питанням фітоочищення працюють науковці Польщі та Румунії [19] Франції, США [20,21,22]. Варто відзначити, що експерименти здебільшого проводяться в лабораторних умовах, а не в польових. Це, ймовірно, пов'язано з тим, що вказані культури є новими, інтродукованими до інших кліматичних умов, тому основні дослідження спрямовані на вивчення їх генетичних, адаптивних, агрономічних та фізіологічних властивостей на незабруднених землях [20]. Посилаючись на проведені переважно за кордоном окремі дослідження, варто констатувати, що за високих концентрацій іонів важких металів пригнічується ріст і накопичення вегетативної біомаси в рослинах [22].

Дослідження європейських наукових інститутів [23,24,25] свідчать про те, що високі концентрації важких металів пригнічувально впливають на ріст та розвиток деяких видів енергетичних культур через пошкодження коренів

та зниження мінерального живлення, особливо азоту і фосфору. На противагу цьому, в польових умовах (протягом двох сезонів) інших досліджень енергетичні культури формували потужну фітомасу та високу врожайність на промислово забруднених землях [26,27]. Енергетичні рослини неоднаково взаємодіють з поживним середовищем, а рівні опору до стресових факторів залежать від умов вирощування і можуть відрізнятися в різних видів і популяції [23,26,27].

Деякі дослідники відзначають, що вирощена енергетична культура в межах забруднених сільськогосподарських районів може призвести до надмірної концентрації металів у тканинах рослин і повторних викидів забруднюючих речовин в атмосферу під час спалювання біомаси [31]. Вибір культур для біоенергетичних цілей повинен враховувати ґрунтові та кліматичні умови регіону, а також технічні можливості фермерів. Адже встановлено, що накопичення іонів важких металів у межах різних тканин рослинного організму розподіляється в такому порядку: корені > стебла > листки [28,29].

Лабораторні дослідження румунських учених за порівняльного аналізу двох біоенергетичних культур показали, що іони важких металів накопичуються не тільки в кореневій системі, а й у надземній. Експеримент проводили на штучно забрудненому свинцем суглинковому і піщаному ґрунтах. Отриману сировину як біопаливо використовували у вигляді січки, брикетів, паливних гранул [32,33].

Незважаючи на переваги фіторемедіація має ряд недоліків: високі концентрації поллютантів у середовищі можуть бути токсичними для рослин і мікроорганізмів; важкі метали повинні бути біологічно доступними для рослин; процес очищення може займати великий проміжок часу; окрім того токсичність і біологічна активність деградованих сполук мало досліджена [47].

Поряд з цим у сучасних наукових публікаціях неповною мірою висвітлені особливості накопичення важких металів енергетичними

культурами, механізм переходу забруднювачів із ґрунту в рослини; потребує уточнення й використання моделі очищення ґрунтів від поллютантів, що і обумовило актуальність наших досліджень в обраному напрямку [50].

Ще одним методом очистки є використання **поверхнево-активних речовин**. В якості відомих ПАР виступають рамноліпіди, сурфактин, софороліпіди, сапонін та інші ПАР[51].

Вчені досліджували штам, що продукує рамноліпід штам *Lysinibacillus sphaericus* даний штам вводили в ґрунт у формі піни, таким способом були видалені наступні метали Cd, Pb, Zn та Ni. Даний спосіб добре видаляє катіони важких металів.

На базі національного університету харчових технологій досліджувався даний метод. Поверхнево-активними речовинами виступали наступні штами продуценти *Pseudomonas aerogenosa* JBR 425, *P. aerogenosa* DS10-129, *P. aerogenosa* BS2, вченими було встановлено, що попередньо зазначені штами мають здатність знижувати концентрацію металів (As, Cu, Pb, та Zn). [5]

У літературному джерелі [67] вивчалася можливість видалення купруму із руди за умов використання препаратів ПАР (рамноліпідів). Як досліджений зразок вико ристовували 1 кг руди, в жому містилося 8,950 мг купруму, час експозиції становив 6 діб за температури 25 °С із значенням рН 6. Результати показали, що найнижчі показники видалення купруму (28 %) із руди спостерігалися за внесення 10 мл 2% розчину рамноліпиду у зразок із 1 г руди. Додавання до рамноліпідів 1 % розчину гідроксиду натрію супроводжувалося збільшенням ступеня виділення — 42 %. Максимальні показники видалення купруму із руди спостерігалися за внесення 0,15—0,3 мМ рамноліпідів у зразок.

Науковці [66] досліджували вплив гліколіпідів, синтезованих *P. aerogenosa* AB4, на видалення важких металів (Cd^{2+} та Pb^{2+}) із ґрунту. Штам AB4 вирощували упродовж 7 діб при 40 °С, кількість синтезованих ПАР досягала 40 г/л. Досліджувані зразки (1,5 кг ґрунту) вносили 5 г Cd^{2+} та 5 г

Pb^{2+} , а кількість гліколіпідів становила 1 та 2 % (об'ємна частка від маси забруднення). За таких умов залишкова кількість катіонів кадмію становила 50 та 46 %, п्लумбуму — 43 та 45 % відповідно до концентрацій гліколіпідів [16].

Сурфактин - це ліпопептид, вироблений *B. subtilis*, що складається з семи амінокислот у 14-вуглецевій сполуці. Штам *B. subtilis* A21 був ефективним для видалення важких металів, таких як Cd, Co, Zn, Pb, Ni та Cu (26–44%), за різних умов. В літературних джерелах описано, що ефективність ПАР збільшується за умови введення пінного розчину до ґрунту[52].

У літературному джерелі [52] досліджували періодичне промивання ґрунту для оцінки доцільності використання сурфактину з *Bacillus subtilis*. Результати показали, що 0,25% сурфактину / 1% NaOH може вивести 25% міді, 6% цинку з ґрунту, 15% міді та 6% цинку з осадів. Серія з п'яти промивань ґрунту 0,25% сурфактином (1% NaOH) змогла видалити 70% міді та 22% цинку.

Дріжджі *Candida bombicola* виробляють біофосфат із софороліпідів. Даний софороліпід ефективно видаляє Zn та Cu, менш ефективно Pb.

Неіонний сапонін на рослинній основі - ще один біосурфактант, який вивчався для видалення важких металів з різних типів ґрунтів. Максимальне виведення кадмію та цинку з регезолу становило 90–100% відповідно. На відміну від вище описаних ПАР, сапоніни можуть бути вилучені з різних частин рослин, таких як насіння, плоди, коріння та стебла, і часто класифікуються як тритерпеноїди та стероїдні сапоніни. Таке широке розповсюдження робить масове виробництво простішим та менш затратним[51,52].

Сидерофори - це селективні та специфічні хелатоутворювачі заліза, що виділяються живими організмами, такими як бактерії, дріжджі, гриби і рослини. Сидерофори мають відносно низьку молекулярну масу і надзвичайно високу спорідненість до іонів тривалентних металів (Fe^{3+}), який погано розчиняється і переважно міститься в середовищах,

що окиснюються киснем. Існує три різних типи сидерофорів; а саме гідроксаматні сидерофори, катехолати (фенолати) сидерофори та карбоксилатні сидерофори. Сидерофори гідроксамату є найпоширенішою групою сидерофорів. Він складається з $C(=O)N(OH)R$, де R є амінокислотою та її похідним, які в основному виробляються бактеріями та грибами[51,52].

Катехолатні сидерофори зв'язуються із залізом шляхом утворення шестигранного октаедричного комплексу. Кілька відомих бактерій, таких як *E. Coli* і *Salmonella typhimurium* виробляють цей тип сидерофорів.

Карбоксилатні сидерофори зв'язуються з іонами заліза через карбоксильну та гідроксильну групи, і виробляються ризосферними бактеріями, такими як *Rhizobium*, а також деякими іншими типами бактерій[53].

Ризоремедіація - це поєднання двох підходів, тобто фіторемедіації та біоаугментації, для очищення забруднених субстратів. Ризоремедіація відноситься до використання мікроорганізмів, присутніх у ризосфері рослин, що використовуються для цілей фіторемедіації. Ризосферні та ендофітні бактерії, стійкі до важких металів, екологічно чисті та економічно вигідні для рекультивації забрудненого важкими металами ґрунту[54].

Використання стійких до металу бактерій, що продукують сидерофор, розташованих поблизу ризосфери, забезпечує рослини поживними речовинами (зокрема залізом), які можуть зменшити шкідливі наслідки забруднення металами. Для очистки ґрунту від важких металів використовуються наступні мікроорганізми *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Pseudomonas* та *Rhizobium*[54].

Отже, кожна з наведених вище методик має свої переваги та недоліки, але перед вченими стоїть задача створити не лише методику очистки але й біологічно чистий препарат в основу якого входитимуть мікроорганізми котрі видаляють важкі метали з ґрунту.

Але окрім вище наведених методик вчені ввели новий термін «мікоризотерапія» трактується дане поняття наступним чином. Біологічний спосіб оздоровлення ґрунту за рахунок мікоризного гриба. У мікоризній взаємодії міцелій гриба колонізує органи рослини-хазяїна внутрішньо- або зовнішньоклітинно[55].

Якщо це коріння, то гриб фактично стає його продовженням й утворює відростки-гіфи, які густо розростаються. У цьому симбіозі відбувається такий собі «обмін». Рослина дає грибу цукор, який утворює під час процесу фотосинтезу, бо у гриба немає хлорофілу, тож накопичення цукрів у ньому не відбувається. А гриб навзаєм значно (практично 100-кратно) збільшує площу живлення рослини та в разі посушливих умов «дотягується» до глибших шарів, у яких міститься волога. І так вони один одного «підтримують і підтягують» [56].

Стосовно екологічного відновлення можна сказати одне, що наука не стоїть на місці, і кожна наукова сфера допомагає один одному. Беручи до уваги біотехнологічний напрямок, він є доволі перспективним, економічно та екологічно вигідним. Оскільки маючи один вид мікроорганізму можна отримати масу різних продуктів мікробного синтезу.

Досить часто в науковій літературі описуються підвиди основних методів очистки ґрунтів від важких металів, до них можна віднести наступні згадки:

- В літературних джерелах є згадка про електроремедіацію в даному методі використовують пристрій капілярно-пористого середовища від забруднень. До пристрою подають ґрунт та сорбційний агент, який власне і видаляє важкі метали з ґрунту[8].
- Цікавим способом є використання біологічної активації природних цеолітів з метою підвищення ефективності морденітвмісних туфів шляхом насичення їх фосфат мобілізуючими мікроорганізмами для підвищення біологічної активності, трофічного режиму ґрунтів, продуктивності культур агроценозів. [6]

- В роботі Самохвалової В.Л., описано метод ремедіації ґрунтів який базується на використанні сульфату заліза з додатковим внесенням біогумусу як активатору самоочищення. Перевагою даного методу є те що, ми маємо змогу впливати не на один важкий метал, а на групу наприклад Cd, Pb, Cr, Zn. [9]
- Іншим відомим способом очищення ґрунтів від ВМ [11] є спосіб, що передбачає видалення забрудненого шару ґрунту, відділення великих сторонніх домішок та біомаси, подрібнення забрудненого шару до водотривких агрегатів, диспергацію у водному середовищі з отриманням пульпи, яку обробляють ультразвуком з метою руйнації водотривких агрегатів. Далі проводять фракціонування з отриманням очищеної крупнодисперсної мінеральної та органо-мінеральної фракцій, злив забрудненої мілкодисперсної мінеральної, органо-мінеральної та органічної фракцій з подальшим їх осадженням, переробкою або похованням.
- Українськими вченими запропоновано новий спосіб та прилад для видалення екологічно небезпечних речовин від забрудненої маси, що включає стадії додавання розчину гідроксидів Ca, Na, K до забрудненої маси, яка піддається диспергації та утримується однорідна суміш. Далі проводиться центрифугування або пресування, самодренування однорідної суміші, екологічно небезпечні речовини (суха маса) видаляються. Проводять фільтрацію рідини, яка містить забруднюючі речовини, контамінанти залишаються на фільтрах[12].
- У літературному джерелі [64] провели дослідження яке показало, що гриби бузкового листа *Raecilomyces* накопичують лише 24% хрому з відпрацьованих хромових стоків, доповнених тростинним цукром, тоді як 100% видалення спостерігали із синтетичного середовища.
- Науковці [65], досліджували вплив чотирьох штамів: *Viridibacillus arenosi* B-21, *Sporosarcina soli* B-22, *Enterobacter cloacae* KJ-46 та *E. cloacae* KJ-47 на забруднений ґрунт важкими металами Pb, Cd та

Cu. Дослідження показало, що бактеріальні суміші мають більшу стійкість та ефективність для відновлення важких металів порівняно з використанням одношарової культури через 48 годин з ефективністю відновлення 98,3% для Pb, 85,4% для Cd та 5,6% для Cu.

Універсального методу очищення ґрунтів від ВМ не існує: ефективність методу залежить від властивостей ґрунту, ступеня адаптації росту рослин і цілого ряду інших факторів. Вибір конкретної технології для обробки забрудненої ділянки залежить від хімічної структури забруднюючих домішок і інших характеристик [10]. Серед описаних вище методів очистки доцільніше використовувати біологічні методи. Оскільки ефективні, більш рентабельні та безпечні, та існує думка, що біологічні способи ре медіації ґрунтів повинні з часом замінити традиційні методи (вивіз забрудненого матеріалу на звалища або екстракцію з використанням органічних кислот і синтетичних ПАВ). Ще одним плюсом біологічних методів очистки це удосконалення та дешева вартість за рахунок потреби в їх розвитку [14].

Отже, дана сфера є актуальною в Україні оскільки незначна конкуренція на ринку. Тож якщо залучити інвесторів на виробництво даної лінії біопрепаратів можна досягти значних успіхів. Також випустивши біопрепарат для очистки ґрунтів від важких металів можна очистити зону відчуження та, що в Чорнобилі. Окрім України розвиток цієї сфери набуває шаленої популярності і закордоном де присутня зацікавленість у відновленні екології.

1.3 Вплив факторів на мікробне очищення від важких металів

Схильність важких металів до стимуляції або придушення мікроорганізмів визначається загальною концентрацією іонів металів, хімічними формами металів і відповідними факторами, такими як окисно-відновний потенціал.

Фактори навколишнього середовища, такі як температура, рН, низькомолекулярні органічні кислоти і гумінові кислоти, можуть змінювати

трансформацію, транспортування, стан важких металів і біодоступність важких металів для мікроорганізмів [40].

Важкі метали мають тенденцію до утворення вільних іонних частинок при кислих рівнях рН, при цьому більше протонів є для насичення ділянок зв'язування металів. При більш високих концентраціях іонів водню поверхню адсорбенту заряджається більш позитивно, що знижує тяжіння між адсорбентом і катіонами металів, тим самим збільшуючи його токсичність. Температура грає значну роль в адсорбції важких металів. Підвищення температури збільшує швидкість дифузії адсорбата через зовнішній прикордонний шар [41].

Розчинність важких металів збільшується з підвищенням температури, що покращує біодоступність важких металів [41]. Однак дія мікроорганізмів посилюється з підвищенням температури в прийнятному діапазоні, і це підсилює мікробний метаболізм і активність ферментів. Стабільність комплексу мікроби-метал залежить від ділянок сорбції, конфігурації мікробної клітинної стінки і іонізації хімічних фрагментів на клітинній стінці. Результат процесу розкладання залежить від субстрату і ряду факторів навколишнього середовища.

Отже, вище перелічені фактори мають вагомий вплив на мікроорганізми котрі використовуються в якості очисників від важких металів.

РОЗДІЛ 2.ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

2.1 Потреба у цільовому продукті

Наразі екологічна позиція набуває шаленої популярності, оскільки темпи розвитку промислової та хімічної індустрії нині не можуть існувати без технологій та ступенів очистки. Тож без біотехнологічної сфери нікуди.

Що стосується методів та біопрепаратів для очистки ґрунту від важких металів, дані методи є біотехнологічною розробкою. Оскільки важкі метали не є камінцями чи бур'янами які можна легко видалити з ґрунту, а знаходяться у піщинках ґрунту.

Отже, аби полегшити очистку закордонні вчені вивели на ринок кілька препаратів для очистки ґрунтів. В якості діючих речовин виступають мікроорганізми, а саме: штам *Bacillus megaterium* ВКМ В-396, штам *Bacillus subtilis* ВКПМ В-5328, штам *Pseudomonas putida* ВКМ В-1301, штам *Pseudomonas putida* ВКПМ В-5624, штам *Rhodococcus erythropolis* ВКПМ АС-1269, штам *Bacillus fastidiosus* ВКПМ В-4368, штам *Bacillus thuringiensis* НМ7, штам *Acinetobacter sp.* В9, штам *Micrococcus luteus* DE 2008. Дані штамми мікроорганізмів вилучають з ґрунту наступні метали: Cu – 60%, Zn – 60%, Pb – 50%, As – 50%, Cd – 30%[57].

Що стосується українського ринку біопрепаратів то, був проведений аналіз ринку дані подані в таблиці 2.1 , але на практиці використовується ціла технологія очистки ґрунтів від важких металів які наведені вище.

Європа спеціалізується більше на біологічних методах очистки, найпопулярнішими є: біоремедіація, фіторемедіація та використання ПАР. В описаних методиках використовують дані мікроорганізми: *Bacillus cereus* strain ХМCr-6, *Kocuria flava*, *Bacillus cereus*, *Sporosarcina ginsengisoli*, *Pseudomonas veronii*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter cloacae* В2-DНА, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium spp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Xanthomonas*

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО – ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушіє
Розроб.	Гавриленко Я.В.						22	73
Перевір.	Слободян О.П.							
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков							Кафедра БТМ

campestris, Bacillus spp., Zygomonas mobilis, Leuconostoc, Pseudomonas spp.

Препарати які містять в собі вище наведені мікроорганізми вилучають такі важкі метали : Cr, Cu, As, Cd, Zn, Ni, Pb[58,59].

Але якщо брати до порівняння Україну, то у Європі активно розвивається платформа для очистки ґрунтів від важких металів, а також є чітко сформований план дій на відновлення ґрунту, водою і навколишнього середовища. Ключові фактори, що сприяють зростанню ринків, включають посилення державних ініціатив щодо захисту довкілля, зростаюча увага до розвитку екологічних галузей і швидкий приріст населення та індустріалізація в країнах, що розвиваються. Розвиток передових технологій очистки та постійне розширення промислової галузі створюють високий попит на екологічне відновлення для ефективних промислових операцій у розпал COVID-19[59].

Ключовими гравцями на ринку є наступні компанії: Clean Harbors, Inc. (США), AECOM Technology (США), DEME NV (Бельгія), Golder Associates Corporation (Канада), Jacobs Engineering Group (США), Brisea Group (США), ENTACT, LLC (США), Terra Systems (США), Engineering and Maintenance Solutions (EMS) (Австралія) та HDR, Inc. (США). Ці гравці все частіше здійснюють придбання, контракти, співпрацю, партнерство та розширення, щоб збільшити свої частки на ринку. Їхня мета повернути природний стан природі[58].

Україна має потребу в даному біопрепараті оскільки, налічує велику кількість заводів які не справляються з очисткою відходів, а також Чорнобильська зона, в якій трапилася велика катастрофа, та відбувся викид радіоактивних і важких металів. На українському ринку біопрепарати цієї групи зустрічаються рідко. Світовий ринок біопрепаратів налічує наступні: «Сойлекс», «Біодеструктор», «Ленойл», «ГлалукОйл» та інші[5,6,7]. В якості діючої речовини виступають наступні мікроорганізми: штам *Bacillus megaterium* ВКМ В-396, штам *Bacillus subtilis* ВКІМ В-5328, штам




Pseudomonas putida ВКМ В-1301, штам *Pseudomonas putida* ВКІМ В-5624, штам *Rhodococcus erythropolis* ВКІМ АС-1269, тощо.

2.2 Розрахунок потужності виробництва

Вагомою частиною є розрахунок потужності виробництва. Завдяки даному розрахунку можна спланувати обсяги випуску біопрепарату, скласти графіки балансу та обсягу вкладів. Був проведений аналіз ринку біопрепаратів для очистки ґрунтів від важких металів результати наявні в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Аналіз виробників біопрепарату для очистки ґрунтів від важких металів [72-75]

Назва препарату	Виробник	Об'єм	Витрати	Препарати вна форма:	Фото продукції
<i>Гумат Ґрунт Органік Біо Актив</i>	ООО «НІП ЛІСТ ФОРТЕ», Україна	10 л	1-6 л/га	Культураль на рідина	
<i>Органік Баланс</i>	ТОВ «БТУ ЦЕНТР», Україна	10 л	1-6 л/га	Культураль на рідина	
<i>Dr. Earth Clean Detox для ґрунту</i>	Dr. Earth, Inc. PO Box 460, USA	500 г	1,5-3 кг/га	Порошок	
<i>Бакпрепарат БАК-ВЕРАД</i>	ООО «Приоритет», Росія	2 кг	1-2 кг/га	Порошок	

На території України є забруднена Чорнобильська зона площею 260000 га. Для розрахунку техніко - економічного обґрунтування візьмемо 0,1 % від загальної площі $F_{об} = 26\ 000$ га. Норми препарату – $n_{пр}$ - 6 л/га.

Загальна кількість препарату на обробку

$$V_{гп} = F_{об} \cdot n_{пр} = 26\ 000 \cdot 6 = 156\ 000 \text{ л} = 156 \text{ м}^3$$

Для обрахунку варто враховувати тремін зберігання біопрепарату для очистки ґрунту від важких металів. Термін зберігання рідкого препарату складає до 3 місяців. Відповідно, кількість робочих днів має бути менша за термін зберігання. Прийmemo 80 днів.

$$N_{эф} = 80 \times 24 = 1920 \text{ год}$$

Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{цф} = T_{ф} + T_{др} = 26,5 \text{ (год)}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (18 год) та час підготовки ферментера до роботи. Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (1,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація апарату (1 год), охолодження апарату (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

$$n_{ц} = N_{эф} / T_{цф} = 1920 / 26,5 = 72,4 \text{ Приймаємо } 73 \text{ циклів.}$$

Об'єм препарату, який треба одержати за цикл:

$$V_{пр}^{н} = V_{гп} / n_{ц} = 156 / 73 = 2,1 \text{ м}^3$$

Об'єм КР, який треба одержати за цикл:

$$V_{кр}^{н} = K_1 \cdot V_{пр}^{н} / (1 - E_{ф}) = 1,1 \cdot 2,1 / (1 - 0,1) = 2,5 \text{ м}^3$$

Робочий об'єм ферментера $V_{рф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 2,5 / (1 - 0,1) = 2,7 \text{ м}^3$, де $E_{ф}$ – втрати КР при біосинтезі від краплевиносу - 0,1...0,2 частки.

Можливий геометричний об'єм ферментера

$$V_{гф} = V_{рф} / K_3 = 2,7 / 0,6 = 4,5 \text{ м}^3$$

Найближчий стандартний об'єм – $V_{стф} = 5 \text{ м}^3$. Уточнюємо K_3

$$K_3 = V_{рф} / V_{стф} = 2,7 / 5 = 0,5 \text{ Що допустиме } K_3 = 0,5 \dots 0,6.$$

2.3 Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу

Виробниче культивування *Bacillus fastidiosus* ВКПМ В-4368 для одержання біопрепарату очисника ґрунту від важких металів здійснюють у ферментері об'ємом 5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5.

Робочий об'єм ферментера становить:

$$V_{\text{роб}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 2,5 / (1 - 0,1) = 2,7 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 2,7 м³ культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб.1}} = 2,7 \times 0,1 = 0,27 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування у посівному апараті об'ємом 0,4 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для засіву посівного апарату (одержання 270 л культуральної рідини) необхідно:

$$V_{\text{роб.2}} = 270 \times 0,1 = 27 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу одержують культивуванням біологічного агента в інокуляторі об'ємом 40 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для отримання 27 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб.3}} = 27 \times 0,1 = 0,27 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для одержання посівного матеріалу становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{роб.3}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 2700 / (750 \cdot 0,2) = 18$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 18 качалочних колб, з вмістом інокуляту по 150 мл в кожній колбі.

Для зручності результати розрахунку представлені в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Результати розрахунку

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{г}$, м ³ (л)	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{роб}$, м ³ (л)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
1.	4,5	0,5	2,7
2.	400 (л)	0,6	270 (л)
3.	40 (л)	0,6	27 (л)
4.	750 (л)	0,2	2,7 (л)

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу біопрепарату очисника ґрунту від важких металів відбуватиметься у ферментері об'ємом 5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5 та буде проходити у чотири етапи.

РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

3.1 Обґрунтування вибору біологічного агента

Оскільки дана проблема є доволі актуальною в наш час, а технології постійно удосконалюються тож і відповідно з'явилися методи які здатні очистити ґрунти від важких металів. Для вирішення даної проблеми існує маса способів, але ефективними та безпечними є біологічні. Оскільки вони не несуть значної шкоди ґрунту так як хімічні та механічні методи. До того ж в якості препаратів для очистки використовують препарати в основу яких входять різні групи мікроорганізмів та грибів.

В якості біологічних агентів використовуються різноманітні мікроорганізми. Переважно це ґрунтові бактерії (*Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Micrococcus*, тощо), гриби (мікориза), дріжджі (*Candida*). Кожен з мікроорганізмів має різний спектр дії. Отже, щоб обрати продуктивний, ефективний, доступний, та якісний біологічний агент необхідно порівняти: особливості процесу культивування, склад поживного середовища, відсоток очистки ґрунту від важких металів та умовну вартість середовища.

Серед вивчених літературних джерел обираємо наступні біологічні агенти: *Bacillus fastidiosus* ВКПМ В-4368, *Bacillus thuringiensis* НМ7, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 1066, *Micrococcus luteus* DE 2008. Деякі з них зустрічаються в складі українських та іноземних препаратів для очистки ґрунів. Для зручності визначення кращого мікроорганізму створені порівняльні таблиці, а саме: порівняльна таблиця біологічних агентів *таблиця 3.1*, вартість поживного середовища *таблиця 3.2* та умовна вартість цільового продукту *таблиця 3.3*. Кожна з таблиць описує продуценти з різних сторін, таким чином Тож для того, щоб визначити який біологічний агент є кращим створені порівняльні таблиці 3.1, 3.2 та 3.3.

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушіє
Розроб.		Гауриленко Я.В.					28	73
Перевір.		Слободян О.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков						Кафедра БТМ

Таблиця 3.1

Порівняльна характеристика біологічних агентів

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Відсоток очистки ґрунту від ВМ, %	Тривалість культивування, год	Особливості процесу	Література
<i>Bacillus fastidiosus</i> ВКІМ В-4368	Глюкоза - 10 (NH ₄) ₂ HPO ₄ - 1 KH ₂ PO ₄ - 0,3 MgSO ₄ - 0,1 K ₂ HPO ₄ - 0,7	Cu - 96% Sr - 92% U - 90%	18	перемішування 320 об/хв t=20-22 pH=5,5	[68]
<i>Bacillus thuringiensis</i> НМ7	Пептон - 10 NaCl - 5 Екстракт яловичини - 3	Mn (II) - 95%	72	перемішування 120 об/хв t=30 pH=5,6 - 6,0	[69]
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 1066	Глюкоза- 1 Сахароза- 1 Глюконова кислота - 1 Цитрат Na - 1 Яблучна кислота - 1 Манітол - 1 Крохмаль - 1 KH ₂ PO ₄ - 2 Na ₂ HPO ₄ - 3 MgSO ₄ - 0,2 NaCl - 0,1	Cd - 70%	48	перемішування 320 об/хв t=28 pH=6,8	[70]

<i>Micrococcus luteus</i> DE 2008	Триптон - 10 Дріжджовий екстракт - 5 NaCl - 10	Pb – 62.5% Cu – 67%	12	перемішування 220 об/хв t=27 рН= 6,5 – 7,1	[71]
--------------------------------------	--	------------------------	----	---	------

З табличних даних видно, що кожен мікроорганізм здатен натягувати на себе не лише один важкий метал, а й групу так наприклад штам *Bacillus fastidiosus* ВКІМ В-4368 здатен очищати ґрунт від Cu; Sr;U. А штам *Micrococcus luteus* DE 2008 очищає від Pb та Cu. Якщо брати до уваги штам *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 1066 та штам *Bacillus thuringiensis* НМ7 то дані мікроорганізми теж досить непогано борються з наступними важкими металами Cd та Mn. Кожен з наведених мікроорганізмів відіграє важливу роль для очистки ґрунтів, але в біотехнологічному виробництві провідну роль також відіграє економічний сигмент адже біологічний агент повинен не тільки добре вбирати в себе важкі метали але й його поживне середовище не повинно бути надто дорогим. Таблиця вартості поживного середовища наведена нижче.

Таблиця 3.2

Вартість поживного середовища

Біологічний агент	Компоненти поживного середовища	Вміст компонентів, г/л	Ціна компонентів, грн/кг	Вартість компонентів (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Bacillus fastidiosus</i> ВКІМ В-4368	Глюкоза	10	45	4,5	1
	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1	10,2	0,0102	2
	KH_2PO_4	0,3	80	0,021	3
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	12	0,0012	4
	K_2HPO_4	0,7	48	0,034	5
Вартість 1 л середовища – 4,5 грн					
<i>Bacillus thuringiensis</i> НМ7	Пептон	10	950	9,5	6
	NaCl	5	10	0,05	7
	Екстракт яловичини	3	3450	10,35	8
Вартість 1 л середовища – 19,9 грн					
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 1066	Глюкоза	1	45	0,45	6
	Сахароза	1	24,5	0,02	11
	Глюконова кислота	1	53	0,05	12
	Цитрат Na	1	105	0,1	13
	Яблучна кислота	1	68	0,06	14
	Маніт	1	3676,5	3,67	15
	Крохмаль	1	25	0,02	16

	KH ₂ PO ₄	2	80	0,16	3
	Na ₂ HPO ₄	3	45	0,13	17
	MgSO ₄	0,2	12	0,002	4
	NaCl	0,1	10	0,001	7
Вартість 1 л середовища – 4,66 грн					
<i>Micrococcus luteus DE 2008</i>	Триптон	10	4980	49,8	10
	Дріжджовий екстракт	5	1632	8,2	9
	NaCl	10	10	0,1	7
Вартість 1 л середовища – 58,1 грн					

Примітка* Ціни наведено станом на січень 2022 р.

1. <https://prom.ua/p431752360-glyukoza-poroshok.html>
2. <https://harkov.flagma.ua/sulfat-ammoniya-o5051674.html>
3. <https://prom.ua/p256138128-kalij-fosfornokislyj.html>
4. <https://prom.ua/p40341252-magnij-sernokislyj-mnogovodnyj.html?&primelead=MS4xNw>
5. <https://prom.ua/p1059462783-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?>
6. <https://shop.hlr.ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html>
7. <https://russian.alibaba.com/product-detail/factory-price-NaCl-powder-Sodium-Chloride-60708458061.html>
8. <https://standartslab.com.ua/p1201437231-ekstrakt-yalovichini-nejtralizovaniy.html>
9. http://agar.com.ua/Additives_for_microbiology_ru/Yeast_Extract_250
10. <https://prom.ua/p935954387-tripton-tryptone.html>
11. https://eko.zakaz.ua/ru/products/ekomarket00000000641139/tsukor/?gclid=CjwKCAiAxJSPBhAoEiwAeO_fPzvDSARyr_bZSsPJjhj9uKob-95ijOauv1SXAkWRXfncq6DNj39tCRoCvVcQAvD_BwE
12. <https://flagma.ua/uk/glyukono-delta-lakton-o9380165.html>
13. <https://prom.ua/ua/p1030565732-tsirat-natriya-331.html?&primelead=MS4zOA>
14. <https://prom.ua/ua/p1071687765-yablochnaya-kislota.html>
15. https://prom.ua/p1416925364-mannit-mannitol-mannitol.html?utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=cpa_10_50_produkty_pitaniya&gclid=CjwKCAiAxJSPBhAoEiwAeO_fP7z3Sfp7lSKQdn8WmkJZO1e4vhYXez_BErU6Bmw2UIMIRDMcn1mUhBoCeq4QAvD_BwE
16. <https://prom.ua/ua/p1235280019-krahmal-kartofelnyj-vyshij.html>
17. <https://flagma.ua/uk/natriy-fosfornokisly-2-zameshch-pishchevoy-o2618839.html>

З порівняльної таблиці вартості видно, що найдорожчим поживним середовищем є для штаму *Micrococcus luteus DE 2008* оскільки до складу поживного середовища входять дороговартісні компоненти, таким чином його

промислове застосування є економічно недоцільним. Ще одним з дороговартісних штамів є штам *Bacillus thuringiensis* HM7. Економічно доцільно використовувати наступні штами: штам *Bacillus fastidiosus* ВКІІМ В-4368 та штам *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 1066. Дані штами мають незначну різницю по вартості поживного середовища. Тож аби обрати продуцент який буде відповідати необхідним вимогам варто скористатися таблицею 3.3 де зведені дані про умовну вартість цільового продукту.

Таблиця 3.3

Умовна вартість цільового продукту

Біологічний агент	Вартість 1л середовища, грн	Відсоток очистки ґрунту від ВМ, %	Умовна вартість 1г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год
<i>Bacillus fastidiosus</i> ВКІІМ В-4368	4,5	Cu – 96% Sr – 92% U – 90%	0,004	18
<i>Bacillus thuringiensis</i> HM7	19,9	Mn (II) – 95%	0,02	72
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 1066	4,66	Cd – 70%	0,004	48
<i>Micrococcus luteus</i> DE 2008	58,1	Pb – 62,5% Cu – 67%	0,06	48

Порівнявши дані з узагальнюючої таблиці чітко видно, що для виробничих цілей краще всього підходить *Bacillus fastidiosus* ВКІІМ В-4368 оскільки він є недороговартісним, не тривалий у культивуванні та очищує такі важкі метали Cu; Sr; U.

3.2 Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

Існує кілька способів культивування, а саме: періодичне, безперервне, глибинне, поверхневе. Яким саме способом буде відбуватися процес культивування залежить від характеристик біологічного агенту.

Штам *Bacillus fastidiosus* ВКІМ В-4368 – аероб [31]. Особливістю аеробних бактерій є потреба в кисні. Тож у рідких середовищах аеробні бактерії можуть рости лише на поверхні, оскільки з віддаленням від поверхні умови наближаються до анаеробних. Аби уникнути анаеробних умов, і підтримувати нормальний ріст бактеріальної культури у глибоких фракціях культуральної рідини необхідна аерація. Отже, оптимальним способом вирощування даної культури є аерацією з перемішуванням, тому її можна вирощувати у глибоких шарах[42].

Додатково варто визначити як саме буде протікати процес культивування безперервно чи періодично. Отже, порівняємо ці два способи між собою.

Під час вирощування культури періодичним способом можна відстежити фази росту мікроорганізму, але це займає досить тривалий час. В методі безперервного культивування, відстежити фазу росту мікроорганізму майже не можливо. Оскільки у ферментер в якому відбувається процес культивації, постійно надходить свіже поживне середовище та одночасно відводиться відпрацьована культуральна рідина. Звісно даним методом можна домогтися ефекту постійної концентрації та решти незмінних умов. Але основним недоліком цього способу є асептичні умови культивування. [3].

Відповідно можна зробити висновок, що культивування штаму *Bacillus fastidiosus* ВКІМ В-4368 доцільно проводити в умовах періодичного глибинного культивування з аерацією.

Виходячи з способу культивування підберемо ферментер. Згідно техніко-економічному обрахунку процес ферментації відбувається у ферментері об'ємом 5 м³. Згідно вище обраними способами процесу культивації, оберемо ферментер.

Для культивування *Bacillus fastidiosus* ВКІМ В-4368 обираємо ферментер в якому відбувається аерація, оскільки продуцент є аеробом, тому створюють аеробні умови продуванням стерильного повітря [16].

Оскільки ферментацію *Bacillus fastidiosus* ВКІМ В-4368 передбачається проводити глибинним способом в ферментерах. В даній роботі передбачено використання промислового ферментеру об'ємом 5 м³ фірми *Solaris biotechnology* (Італія) (рис.3.1.) який обладнаний перемішуючим пристроєм, оскільки процес

культивування *Bacillus fastidiosus* вбачає забезпечення інтенсивного перемішування середовища.



Рис. 3.1. Загальна будова ферментера *Solaris biotechnology*

Промислові ферментери серії I компанії *Solaris biotechnology* повністю автоматизовані та високотехнологічні, відрізняються високою якістю складання, досконалою якістю сталі, чудовим виконанням та італійським дизайном.

Датчики, що здійснюють збирання потокових даних, можуть бути замінені під час процесу без порушення стерильності апарату. Стерильність під час виконання всіх технологічних операцій (посіву, відбору проб, вивантаження матеріалу та подачі реагентів) забезпечується діафрагмовим паровим вентилем. Легкий доступ до комунікацій дозволяє виконувати технічне обслуговування будь-якої складності без жодних труднощів.

Ферментери **серії I** обладнані високоінтелектуальним контролером процесів SBC-12 для управління процесами ферментації.

3.3 Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Нині відома досить велика кількість методів виділення і очищення мікробіологічного препарату з культуральної рідини. Як зазначено вище завод виготовлятиме свою продукцію в рідкій формі [3].

Рідка препаративна форма добре змішується з прісною водою, однак практично не сумісна навіть з слабомінералізованими водами і тому в чистому вигляді не придатна для закачування в пласт.

Культуральна рідина, насичена мікроорганізмами, які пристосовані споживати різні класи органічних речовин, у тому числі і вуглеводні нафти, і при розливі в пластикову тару, культуральна рідина додатково збагачується легкоокисними високомолекулярними сполуками ЕПС, внаслідок чого він буде володіти значною біохімічною активністю. Тому аби уникнути даної проблеми в промисловості культуральну рідину підкислюють соляною кислотою (до рН 4-5). Після готовий розчин подають на лінію розливу.

3.4. Обґрунтування вибору товарної форми випуску продукту мікробного синтезу

Мікробіологічний препарат для очищення ґрунту від важких металів випускатиметься в рідкій формі, але варто зважати на те, що штам *Bacillus fastidiosus* ВКПМ В-4368 є світлочутливим. Тож цей фактор необхідно враховувати при виборі пакування.

В якості тари використовуються промислові пластикові каністри різного об'єму (0,5 л, 1 л, 5 л, 10 л) та відповідного забарвлення (аби уникнути прямого контакту сонячних променів). Пластикові каністри повинні бути герметично запаяні фольговим обідком та закриті кришкою[7].



Рис. 3.2 Форма пакування рідка[8]

Додатково на каністрі з готовим до використання препаратом повинна бути розміщена етикетка. На етикетці має міститись наступна інформація: назва самого препарату, адреса виробництва, склад препарату, вміст діючої речовини, сертифікати якості якщо вони наявні, інструкцію по використанню, тощо.

Окрім, типу фасування та форми маркування важливим фактором є умови та термін зберігання. Упаковану продукцію зберігають у складських приміщеннях або в холодильних камерах, приміщення повинні бути добре вентиляльованими та провітрюваними, та відповідати належному температурному режиму від +5 до +18 °С. Оскільки, склад біопрепарату є світлочутливим то приміщення повинно бити захищеним від впливу прямих сонячних променів, джерел тепла і вологи [53].

РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання зображеного на апаратурній схемі, наведена в таблиці 4. 1

Таблиця 4.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
Д 3 Д 6 Д 8 Д 17 Д 19 Д 21 Д 23 Д 25 Д 28	Об'ємно - ваговий дозатор	10	Дозатор виробництва НВП "Техноваги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1% [31].
Р 4	Реактор змішувач для каустичної соди	1	Реактор об'ємом 10 м ³ , оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв (Україна) [32]
Н 2 Н 5	Насос відцентровий	4	Відцентровий насос фірми ЕВАРАсерії ЕВАРА 3М, продуктивністю до 72 м ³ /год [33]
Р 7	Реактор змішувач для дезактину	1	Реактор об'ємом 10 м ³ , оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв (Україна) [34]
Р 9	Реактор змішувач для гембару	1	Реактор об'ємом 10 м ³ , оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв (Україна) [35]
ПЗ 10	Повітрязабірни к	1	Обладнений металевою сіткою для видалення механічних забруднень [36]

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ</i>			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Гауриленко Я.В.			РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ 38	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Слободян О.П.				38	73	
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Ф 11	Фільтр грубої очистки	1	Фільтруючий матеріал – химволокно ФВР, Е=90% (Україна) [37]
К 12	Компресор	1	Компресор GX7 фірми AtlasCopco (Швеція), потужність 14 л/с, робочий тиск 1 МПа [38]
Т 13	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник охолоджувач серії АС-13,5 фірми «Уралкомпресормарш»(Росія) продуктивністю 13,5 нм ³ /год [39]
Р 14	Ресирвер	1	Ресирвер серії РВ 430/16 фірми «Уралкомпресормарш» (Росія), об'єм 430 л, робочий тиск 1,6 МПа [40]
Т 15	Теплообмінник нагрівач	1	Корпуса теплообмінника ЕО фірми Airone (Росія) виготовлений із оцинкованої сталі товщиною [41]
Ф 16	Фільтр головний	1	Фільтруючий матеріал –волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, Е=99%[42]
Р 18	Реактор змішувач		Реактор об'ємом 8 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 300 об/хв [43]
Р 20	Реактор змішувач		Реактори об'ємом 20 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 300 об/хв [43]
Р 22	Реактор змішувач		Реактори об'ємом 63 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 320 об/хв [43]
Р 24	Реактор змішувач		Реактори об'ємом 250 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 320 об/хв [43]
Р 26	Реактор змішувач		Реактори об'ємом 500 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 320 об/хв [43]
Р 29	Реактор змішувач	1	Реактори об'ємом 2000 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 320 об/хв [43]
ЗП 30	Засівний пристрій	1	Виготовлений із нердавіючої сталі, розташований над ферментером[44]
Ф 31 Ф 33 Ф 35	Індивідуальні фільтри	4	Фільтри марки BonescoActive carbon filter (Швеція), Е=99.996[37,42,45]
ІН 32	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 40 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість

Продовження таблиці 4.1

			перемішування 320 об/хв [43]
ІН 34	Посівний апарат	1	Інокулятор об'ємом 400 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 320 об/хв [43]
Фр 36	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 5 м ³ , з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 320 об/хв <i>Solaris biotechnology</i> [43]
АР 37	Автомат розливочний	1	Апарат напівавтоматичний Bag in Box. Напруга 220 В, 50 Гц. Потужність компресора 1,5 кВт, 900 об/хв. Виробник: Італія [14]

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Початок якісного виробництва залежить від якісної санітарної підготовки. Тому аби відповідати стандартам якості створені нормативні документи де чітко описані правила виробництва та контроль якості продукції.

ДР 1.1. Підготовка персоналу до виробництва

До виробничої діяльності допускаються лише ті співробітники, які пройшли відповідну професійну підготовку і пройшли інструктаж з безпеки праці та ознайомитись з інструкцією по техніці безпеки на виконувану роботу, а також інструктаж по санітарному мінімуму. Ці процедури проводяться зі співробітником у відділі охорони праці або спеціально призначеною особою на підприємстві. Персонал, що не пройшов інструктаж, не допускають до роботи.

ДР 1.2. Приготування миючих та дезинфікуючих засобів

На біотехнологічному підприємстві, невідомною умовою є чистота виробничого обладнання та приміщення. Тож власне для цього використовують миючі і дезинфікуючі засоби. Оскільки виробництво займає відповідні габарити потребується чимала кількість очисних засобів. Для цього на виробництві є відповідний блак стерилізації або співробітник, назначений керівником цеху, ділянки, підрозділу за наказом.

Розчини готують в емальованому посуді або в бутлях з товстого темного скла. Посуд, де зберігаються розчини, обов'язково повинен бути щільно прикритим кришкою або корком. Приготування розчинів проводиться у спеціальній кімнаті, що прилягає до санвузла. Бажано, щоб це була темна або напівтемна кімната, стіни та підлога її вистелені кахлями, також є раковина для миття рук.

ДР 1.2.1. Приготування каустичної соди

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ 41	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Гавриленко Я.В.</i>					41	73
<i>Перевір.</i>		<i>Слободян О.П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Для отримання робочого розчину 2% каустичної соди потрібно розвести 10 л води та 2,5 кг каустичної соди, готовий розчин придатний для використання (до ДР 1.3.1, ДР 1.4.1).

ДР 1.2.2. Приготування розчину дезактину

Для приготування 1 л 0,2% робочого розчину дезактину необхідно 2 мл концентрату дезактину та 998 мл води питної. Всі компоненти вносяться у скляну або емальовану ємкість за допомогою мірного циліндра та смплеру. Приготований робочий розчин дезактину можна зберігати не більше 3 днів в щільно закритій тарі (до ДР 1.3.1).

ДР 1.2.3. Підготовка розчину гембару

Зі складу надходить концентрат Гембару (25 %), який розводять водою до потрібної концентрації (0,5 %). Готують робочий розчин у збірнику об'ємом 800 л. Щоб отримати 560 л (0,5 %) розчину Гембару наливають 24 л 25% Гембару та 536 л водопровідної води і включають перемішуючий пристрій, далі готовий розчин наливають у скляну або емальовану ємність та користаються в якості дезінфікуючого засобу(до ДР 1.3.1).

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

Підготовка виробничих приміщень є одним з важливих процедур на виробництві. Для забезпечення чистоти, прибирання проводиться згідно графіку та нормативним вимогам.

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання виробничих приміщень здійснюється персоналом 1 раз на зміну. Робочий персонал повинен бути вдягнутий у гумові рукавиці, взуття та фартух, з метою уникнення пошкоджень шкіри та одягу дезінфікуючими розчинами. Стіни, двері і інші поверхні протирають поролоновою губкою, яка змочена дезінфікуючими робочими розчинами Каустичної соди (від ДР 1.2.1), Дезактину (від ДР 1.2.2) та Гембару (від ДР 1.2.3), потім цими ж розчинами миють підлогу. При проведенні прибирання приміщень користуються 0,2% робочими розчинами Дезактину та Гембару. Відпрацьований розчин направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Важливо змінювати миючі засоби аби уникнути резистентності забруднювачів. Тому робочий розчин Гембару змінюється на Дезактин. Генеральне прибирання проводиться раз на місяць. Миючим розчином обробляють всі поверхні приміщень зокрема: стіни, підлогу, стіни, вікна та двері. Залишковим миючим розчином протирають підлогу. По закінченню прибирання обов'язково відпрацьований розчин направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

ДР 1.4. Підготовка технологічного обладнання

Під час стадії підготовки технологічного обладнання співробітник мие робоче обладнання, ополіскує його та перевіряє цілісність обладнання.

ДР 1.4.1. Миття, дезінфекція та ополіскування

Для полегшення процесу миття використовується безконтактна СІР мийка, в якості миючого розчину використовують 2 % розчин Каустичної соди (від ДР 1.2.1). В обов'язковому порядку відпрацьований миючий розчин передати на знешкодження. По завершенню миття ферментер ополіскують холодною водою упродовж 10 хв. Відпрацьована вода передається на стадію знешкодження відходів.

ДР 1.4.2. Технічний огляд

Перед процесом стерилізації проводять технологічний огляд обладнання на наявність пошкоджень, вм'ятин, впадин, в яких можуть залишатись залишки можливого забруднення, що може призвести до перехресної контамінації. Якщо знайдені порушення їх усувають.

ДР 1.4.3. Перевірка на герметичність

Перевірка обладнання на герметичність проводиться за допомогою витокошукача. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість легкої галогеновмісної речовини, зазвичай це чотирихлористий карбон або шестифтористий сульфат, закривають усю запірну арматуру та нагрівають апарат до 30 °С і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Якщо апарат не герметичний, то при наближенні датчику витокошукача, пристрій подаватиме сигнал. Перевірка одного апарату таким методом в середньому складає 1,5-2 години.

ДР 1.4.4. Стерилізація обладнання

Після дезінфекції, ополіскування та перевірки обладнання та комунікацій на герметичність у ферментер стерилізують насиченою водяною парою, яку подають під тиском 0,28 – 0,3 МПа. Процес ділиться на три стадії. Додатково в сорочку апарата подають глуху пару і прогрівають апарат до температури 80-90 °С. Після подають гостру пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, перед цим відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для виведення пари з апарату. Довести апарат до температури стерилізації 130 – 135 °С закрити всю запірну арматуру, крім парової, та витримати час стерилізації (60 хвилин). При охолодженні закривається вся запірна арматура подачі пари в апарат. У сорочку подається холодна вода. Процес охолодження відбувається до досягнення температури до 30-40 °С і надлишковому тиску $P=0,003 - 0,005$ МПа. В середньому процес стерилізації одного ферментера складає 2,5 години. На стадії стерилізації обладнання контролюється температура, тиск водяної пари (0,28 – 0,3 МПа), час стерилізації (1 година) та відсутність сторонньої мікрофлори.

ДР 2 Підготовка стерильного технологічного повітря

Виробничий процес повинен проходити в стерильних умовах, і лише прибирання мало. Тож зазвичай біотехнологічні виробництва додатково обладнують фільтраційними системами.

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря

Відбір атмосферного повітря відбувається на висоті 20 м від найвищого приміщення за допомогою збирача повітря.

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу та механічних часточок

Повітря очищують від грубого аерозолі за допомогою фільтру грубої очистки. Ступінь очищення – 80 %.

ДР 2.3. Стиснення (компресування) повітря

Повітря стискають у компресорі до 0,35 МПа, стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до 120–250 °С і збільшення вмісту вологи.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи

Стиснене повітря охолоджують в охолоджувачі повітря до температури 25-30 °С для вивільнення залишкової вологи. Повітря подають на ресивер для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи ($W = 60-70 \%$).

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Охолоджене повітря нагрівають до 35 °С для зменшення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів. Нагрів відбувається в теплообміннику.

ДР 2.6. Очищення на головному фільтрі

По завершенню вище наведених стадій. Повітря додатково очищують на головному фільтрі. Ступінь очищення – 95 %. Аби уникнути повітряного забруднення додатково змінюють фільтри. Цей процес відбувається згідно графіку, а саме 2 рази в рік. Якщо протягом року фільтр забивається, мокріє тощо то відбувається позапланова заміна фільтрів.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Всі інокулятори і ферментер оснащують індивідуальним фільтром для заключної очистки повітря. Ступінь очищення досягає 99,999 % (до ТП 4.5, ТП 4.6, ТП 4.7, ТП 5).

ДР 3 Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживних середовищ для колб на качалках

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у таблиці 5.1.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування
посівного матеріалу в колбах на качалках об'ємом 750 мл**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 270 мл середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	10	2,7	А	102,7
Вода		100 (мл)		
$(NH_4)_2HPO_4$	1	0,27	Б	67,24
K_2HPO_4	0,7	0,19		
KH_2PO_4	0,3	0,08		
Вода		66,7 (мл)		
$MgSO_4$	0,1	0,03	В	100,03
Вода		100 (мл)		
Разом:		270		270

**Усі композиції готуються у лабораторному посуді і стерилізуються в автоклаві.*

ДР 3.1.1. ДР Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 2,7 г глюкози наважку переносять в попередньо простерилізовану колбу на 250 мл, з коефіцієнтом заповнення 0,2, додають 100 мл води та перемішують. Закривають колби ватно-марлевими пробками і стерилізують в автоклаві за температури 112 °С на 20 хв(до ТП 4.4).

ДР 3.1.2. Приготування композиції Б

На аналітичних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують наважку 0,27 г гідрофосфату амонію, 0,19 г гідроортофосфату калію та 0,08 г дигідроортофосфату калію переносять в попередньо простерилізовану колбу на 250 мл, з коефіцієнтом заповнення 0,2, додають 66,7 мл води та перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 131 °С на 40 хв(до ТП 4.4).

ДР 3.1.3. Приготування композиції В

На аналітичних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують наважку 0,03 г сульфату магнію переносять в попередньо простерилізовану колбу на 250 мл, з коефіцієнтом заповнення 0,2, додають, 100 мл

води та перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 131 °С на 40 хв(до ТП 4.4).

ДР 3.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ для 40 л інокулятора

Таблиця 5.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування посівного матеріалу в малому інокуляторі об'ємом 40 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 27 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	10	270	А	17
Вода		16,73 (л)		
$(NH_4)_2HPO_4$	1	27	Б	6
K_2HPO_4	0,7	18,9		
KH_2PO_4	0,3	8,1		
Вода		5,946 (л)		
$MgSO_4$	0,1	2,7	В	4
Вода		3,997 (л)		
Разом:		27		27

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному посуді зважують глюкозу 270 г та поміщають в інокулятор об'ємом 20 л, сюди ж вносять 16,73 л води перемішують перемішуючим пристроєм та стерилізують при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 20 хв(до ТП 4.5).

ДР 3.2.2. Приготування композиції Б

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 27 г гідрофосфату амонію, 18,9 г гідроортофосфату калію та 8,1 г дигідрофосфату калію поміщають в інокулятор об'ємом 8 л, сюди ж додатково вносять 5,946 л води перемішують перемішуючим пристроєм та стерилізують при температурі 131 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 40 хв(до ТП 4.5).

ДР 3.2.3. Приготування композиції В

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 2,7 г сульфату магнію, поміщають в робочий інокулятор об'ємом 40 л,

сюди ж додають 3,997 л води перемішують перемішуючим пристроєм та стерилізують при температурі 131 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 40 хв(до ТП 4.5).

ДР 3.3 Приготування та стерилізація поживних середовищ для 400 л інокулятора

Таблиця 5.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 400 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 270 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	10	2700	А	170
Вода		167,3 (л)		
$(NH_4)_2HPO_4$	1	270	Б	50
K_2HPO_4	0,7	189		
KH_2PO_4	0,3	81		
Вода		49,46 (л)		
$MgSO_4$	0,1	27	В	50
Вода		49,973 (л)		
Разом:		270		270

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі попередньо зважують глюкозу 2700 г поміщають в інокулятор об'ємом 250 л, сюди ж додають 167,3 л води та стерилізують при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 20 хв (до ТП 4.6).

ДР 3.3.2. Приготування композиції Б

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному посуді зважують 270 г гідрофосфату амонію, 189 г гідроортофосфату калію та 81 г дигідроортофосфату калію зважені компоненти поміщають в інокулятор об'ємом 63 л додають 49,46 л води та перемішують. Стерилізують при температурі 131 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 40 хв (до ТП 4.6).

ДР 3.3.3. Приготування композиції В

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 27 г сульфату магнію поміщають в робочий інокулятор об'ємом 400 л

додають 49,973 л води і перемішують. Стерилізують при температурі 131 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 40 хв (до ТП 4.6).

ДР 3.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого ферментера об'ємом 5 м³.

Таблиця 5.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування поживного середовища ферментера об'ємом 5 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 2,7 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	10	27	А	1700
Вода		1673 (л)		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	2,7	Б	400
K ₂ HPO ₄	0,7	1,89		
KH ₂ PO ₄	0,3	0,81		
Вода		394,6 (л)		
MgSO ₄	0,1	0,27	В	600
Вода		599,73 (л)		
Разом:		2700		

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі попередньо зважують 27 кг глюкози поміщають в інокулятор об'ємом 2 м³ додають 1673 л води та перемішують. Стерилізують при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 20 хв (до ТП 5).

ДР 3.4.2. Приготування композиції Б

На ваговому дозаторі зважують 2,7 кг гідрофосфату амонію, 1,89 кг гідроортофосфату калію та 0,81 кг дигідроортофосфату калію зважені компоненти вносять в інокулятор об'ємом 500 л та додають 394,6 л води. Стерилізується гострою парою за температури 131 °С протягом 40хв, безпосередньо в інокуляторі (до ТП 5).

ДР 3.4.3. Приготування композиції В

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 0,27 кг сульфату магнію поміщають в робочий ферментер об'ємом 5 м³

додають 599,73 л води перемішують. Стерилізують при температурі 131 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 40 хв (до ТП 5).

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП.4.1. Підтримання колекційної культури

Штам *Bacillus fastidiosus* ВКПМ В-4368 зберігають у пробірках на МПА в прохолодних умовах за температури 3 – 4 °С під гумовою пробкою. А для збереження колекційної культури пересів музейної культури проводять 1 раз на рік. Розмножують на МПА або на МПБ при температурі 30 °С. Роботи з колекційною культурою відбуваються в ламінарних боксах за дотримання стерильних умов.

ТП 4.2. Одержання робочої культури з колекційної

Музейна культура штам *Bacillus fastidiosus* ВКПМ В-4368, зберігається в пробірках на середовищі МПА. Для отримання робочої культури здійснюється розсів петлею в пробірки зі скошеним агаром на МПА. Вирощують при температурі 30 °С протягом 48 год у термостаті.

ТП 4.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Вирощені в термостатних умовах колонії штаму *Bacillus fastidiosus* ВКПМ В-4368. Розмножують далі в пробірках зі скошеним МПА. Умови вирощування – температура 30 °С протягом 48 год в термостаті (до ТП 4.4).

ТП 4.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування штаму *Bacillus fastidiosus* ВКПМ В-4368 в колбах на качалках попередньо готується поживне середовище. В стерильну колбу об'ємом 750 мл вносимо раніше приготувані розчини композиції А (від ДР 3.1.1), композиції Б (від ДР 3.1.2) та композиції В (від ДР 3.1.3) в кількості 270 мл. Таким чином готується решта колб з поживним середовищем.

У пробірку з робочою культурою *Bacillus fastidiosus* ВКПМ В-4368, вирощеною на МПА (від ТП 4.3) і, вносять 10 мл стерильної питної води, за допомогою петлі суспендують клітини і піпеткою в асептичних умовах відбирають одержану суспензію та вносять у колби з розлитим поживним

середовищем. Для засіву однієї колби використовують біомасу, одержану з однієї пробірки.

Після вирощування у колбах на качалці 120 об/хв впродовж 18 год при 30 °С, культуральну рідину в асептичних умовах з колб переносять в засівну колбу об'ємом 5 л (до ТП 4.5).

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л.

В інокулятор об'ємом 40 л вносять заздалегідь приготовані розчини композиції А (від ДР 3.2.1), композиції Б (від ДР 3.2.2) та композиції В (від ДР 3.2.3) , а також перекачують посівний матеріал із засівної колби через патрубок відкривши вентиль (від ТП 4.4) і вмикають перемішуючий пристрій. У інокулятор подається стерильне стиснуте повітря (від ДР 2.7), а виводиться відпрацьоване. У кожух інокулятора подається вода, а також виводиться оборотна вода.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 30 °С, тривалість – 18 год. Швидкість перемішування становить 320 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор об'ємом 400 л (до ТП 4.6)..

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 400 л.

В інокулятор об'ємом 400 л вносять заздалегідь приготовані розчини композиції А (від ДР 3.3.1), композиції Б (від ДР 3.3.2) та композиції В (від ДР 3.3.3), а за допомогою труби перетискування – посівний матеріал (від ТП 4.5), і вмикають перемішуючий пристрій. В інокулятор подається стерильне стиснуте повітря (від ДР 2.7), а виводиться відпрацьоване. У кожух інокулятора подається вода, та виводиться оборотна вода.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 30 °С, тривалість – 18 год. Швидкість перемішування становить 320 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою відцентрового насоса у виробничий ферментер об'ємом 5 м³(до ТП 5).

ТП 5. Виробничий Біосинтез

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з об'ємом 5 м³ . У попередньо простерилізований ферментер в асептичних умовах за допомогою

винтового насосу вносять стерильне поживне середовище, а саме композицію А (від ДР 3.4.1), композицію Б (від ДР 3.4.2) та композицію В (від ДР 3.4.3). Через вентель за допомогою відцентрового насосу перекачують – посівний матеріал (від ТП 4.6) і вмикають перемішуючий пристрій. Перемішуючим пристроєм слугує турбінна мішалка закритого типу, якою обладнаний ферментер. Швидкість перемішування становить 320 об/хв. Також подається стерильне повітря (від ДР 2.7). Тривалість виробничого культивування становить 18 годин при температурі 30-32 °С.

В апараті створюється надлишковий тиск ($P = 0,02 - 0,05$) подачею стерильного стисненого повітря. рН середовища підтримують на рівні 6,8-7,2 аміачною водою.

З дотриманням правил асептики з посівного апарату відбирають проби через кожні 4 годин, в якій аналізують: вміст глюкози, азоту, вміст бактеріальної культури та мікробіологічну чистоту. Після виробничого біосинтезу культуральну рідину перекачують на стадію підкислення (до ТП 6.1).

ТП 6. Відділення біомаси

ТП 6.1 Підкислення культуральної рідини

Після ферментації культуральну рідину підкислюють соляною кислотою до рН 4-5 та в рубашку ферментеру подають охолоджену воду для охолодження культуральної рідини до температури 10 °С. Під час зберігання культуральної рідини, підтримують дану температуру. Культуральну рідину відправляють на стадію розливу (до ТП 7.1).

ПМВ 7. Пакування у первинну упаковку

ПМВ 7.1 Пакування рідкого препарату

Культуральну рідину з реактору (від ТП 6.1) подають на лінію розливу та розливають у пластикові каністри об'ємом 0,5; 1; 5 та 10 л. Розлита в тару продукція додатково маркується етикетками з загальною інформацією для споживача. Надалі фасована продукція передається на склад.

ЗВ 8. Знешкодження відходів

ЗВ 8.1 Знешкодження рідких відходів

Стічні води можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху стічні води спочатку стерилізують і нейтралізують. Потім їх спрямовують на очисні споруди, де здійснюють механічне очищення. Ступінь очищення стічних вод становить 50-70%.

ЗВ 8.2 Знешкодження газоподібних відходів

Очищення газоподібних відходів здійснюють у фільтрах з попереднім охолодженням відпрацьованого повітря та зниженням вологості у вологовідбійниках з подальшим нагріванням, щоб уникнути попадання крапельної вологи і змочування фільтрів.

Під час очищення відпрацьованого повітря використовують фільтри з волокнистих матеріалів.

РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Протягом процесу культивування періодично (кожні 4 год) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, а також вмісту джерела вуглецю (глюкоза) та азоту (амонійний азот).

6.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль проводиться в кілька етапів, а саме методом мікроскопіювання та розсівом на чашки Петрі (для перевірки чистоти біопрепарату).

Відбір проб культуральної рідини здійснюється у стерильних умовах з колб за допомогою стерильної піпетки, у випадку відбору проб з інокуляторів і ферментера цей процес відбувається за допомогою пробовідбірників.

Мікроскопіювання

Для мікроскопіювання готують препарат «роздавлена крапля» на знежиреному предметному склі, на яке наносять краплю культуральної рідини, накривають покривним скельцем і розглядають його з імерсією (збільшення 90×).

Під мікроскопом повинні спостерігатися грампозитивні малорухливі паличкоподібні клітини *Bacillus fastidiosus* з закругленими кінцями 1-1,8 мкм в довжину (рис 6.1) [46]. Під мікроскопом не повинно спостерігатися сторонньої мікробіоти.

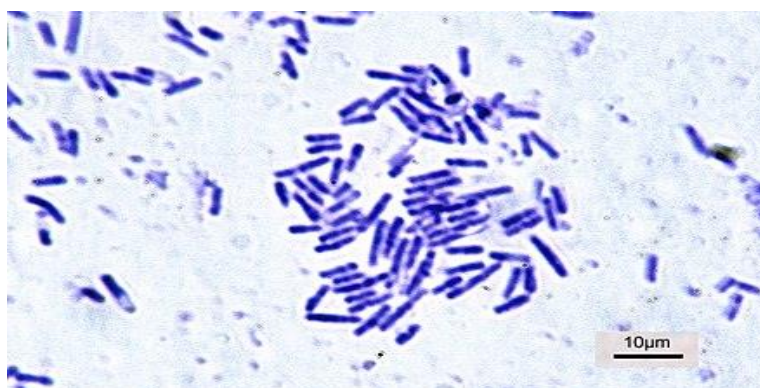


Рис 6.1. Клітини *Bacillus fastidiosus* під мікроскопом

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Гавриленко Я.В.			РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА 54	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Слободян О.П.					54	73
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Висів на агаризовані середовища

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій та сушло-агаром (СА) для виявлення грибів та дріжджів і інкубують при температурі 37 та 30 °С відповідно.

Через 24 години росту на МПА при 37 °С *Bacillus fastidiosus* утворює бежеві колонії діаметром до 5 мкм; поверхня колоній гладка, краї рівні, структура однорідна, консистенція пастоподібна [47] (рис 5.2). Відсутність колоній сторонніх бактерій свідчить про чистоту культури.

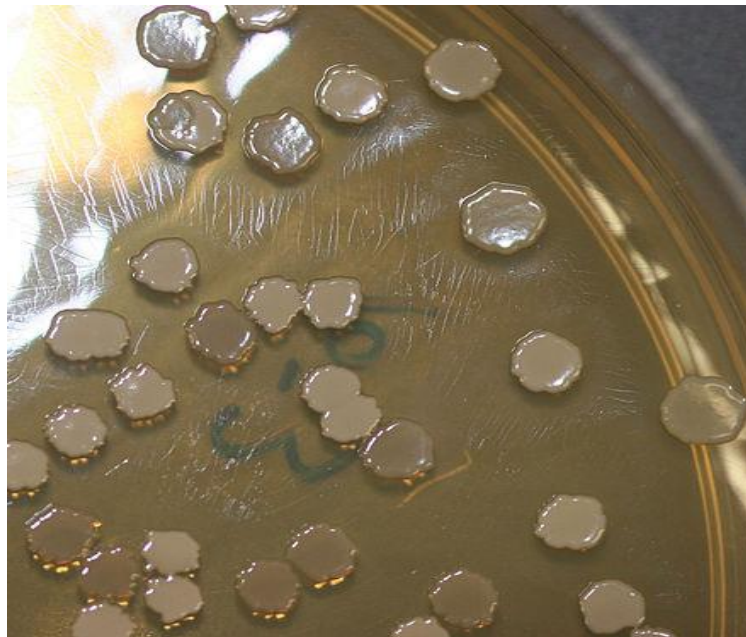


Рис. 6.2. Колонії Bacillus fastidiosus

Також проводять мікробіологічний контроль чистоти поживного середовища. Для цього в асептичних умовах відбирають пробу. Далі наливають по кілька крапель у чашки Петрі з СА та МПА і ставлять у термостати на 30°С та 37°С відповідно.

Відсутність колоній сторонніх мікроорганізмів свідчить про чистоту культури.

6.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

6.2.1. Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка. Для проведення даного методу знадобляться кілька пробірок з 9 мл стерильної

водопровідної води, та відібрана проба культуральної рідини. У зазделегідь підготовані пробірки з 9 мл стерильної водопровідної води вносять по 1 мл культуральної рідини. Утворену суміш перемішують, та вимірюють оптичну густину за допомогою спектрофотометра УФ-1700 (*Shimadzu*, Кіото, Японія) при довжині хвилі 600 нм. Одиниця оптичної густини OD 600 відповідає 0,31 г/л біомаси [48].

Визначення концентрації джерела вуглецю

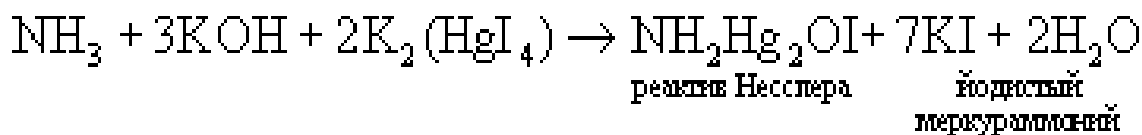
В якості джерела вуглецю в поживному середовищі виступає глюкоза. Концентрацію глюкози визначають за допомогою глюкозо аналізатора YSI 2700 [49].

Для визначення концентрації глюкози відбирають пробу 20 мл культуральної рідини, потім центрифугують при 13200 об/хв. протягом 10 хв. Відбирають 10 мл супернатанту. Запускають глюкозо аналізатор, при увімкненні з його корпусу автоматично видається голка з ручним впорскуванням. Коли голка аналізатору витягнута та нерухома, пробірку з супернатантом, підносять до голки та кінчик голки зануюють в пробірку. Тримаючи пробірку у такому положенні, натискають «Аспіраційний зразок». Утримують пробірку, доки голка для відсмоктування не повернеться назад до корпусу пристрою. Після повернення голки до пристрою починається аналіз зразку. В середньому тривалість аналізу займає 60 секунд.

Визначення концентрації джерела азоту

В складі поживного середовища джерелом азоту слугує сульфат амонію. В даному випадку сульфат амонію виступає в якості амонійного азоту. Визначають такий тип азоту за допомогою відомого колориметричного методу з реактивом Несслера [50].

Для проведення колориметричного методу потрібен розчин комплексної солі $K_2(HgI_4)$, який, вступає в реакцію з іонами амонію, дає реакцію йодистого меркурамоні, що утворює примітивне жовтувате забарвлення. Контраст кольору пропорційний концентрації аміаку.



У мірні колби на 100 мл, наливають по 50 мл води, після чого додають 1, 2, 3, 4, 5 ... 50 мл робочого розчину хлористого амонію, 0,5 мл сегнетової солі і 1 мл реактиву Несслера. Внівши необхідні реактиви до мірних колб, доводять водою до мітки 100 мл та перемішують. Через 15 хв вимірюють оптичну густину на фотоколориметрі з синім світлофільтром і будують калібрувальну криву за відповідними методиками.

Щоб визначити амоній відбирають 1 мл культуральної рідини вносимо в пробірку та додаємо 0,5 мл сегнетової солі та 1 мл реактиву Несслера, компоненти перемішуємо між собою. Через 15 хв визначають оптичну густину забарвленого жовтого розчину на фотоколориметрі з синім світлофільтром. Концентрацію амонію визначають за калібрувальним графіком.

6.2 Методики контролю готової продукції

Визначення титру в процесі культивування

В період культивування кожні 4 години відбираються проби культуральної рідини яку попередньо переглядають під мікроскопом для візуального визначення ступеня насичення штам *Bacillus fastidiosus* ВКПМ В-4368.

Пробу культуральної рідини розводять водою в 10 і 100 разів, для цього в мірні колби відбирають пробу піпеткою по 1 мл культуральної рідини і доводять водою до об'єму 10 і 100 мл після чого суспензію перемішують, і скляною паличкою по краплі наносять на робочу зону камери Горяєва, покривають покривним склом та притирають. Залишки рідини видаляють фільтрувальної папером.

Камеру поміщають на предметний столик, в об'єктиві зі збільшенням 40х підраховують число бактеріальних клітин. Сам підрахунок відбувається в десяти великих квадратах камери, розташованих в середньому ряду сітки, пропустивши при цьому 2 перших і 2 останніх квадрата. За умови перевищення кількості клітин

у великому квадраті, аналіз проводиться повторно із більшим розведенням культуральної рідини [48-49].

Обрахувавши середнє арифметичне числа клітин в одному великому квадраті, підставляють його в формулу для визначення титру (Т) а точніше культури:

$$T = 25 \times 10^4 \times ar,$$

де а – середньоарифметичне число клітин у великому квадраті; р – розведення (10; 100 і т. п).

Таблиця 6.3

6.3 Карта контрольних точок виробництва

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
К _x 1.2.1 Підготовка робочого розчину Каустичної соди	Концентрація розчину каустичної соди	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	C = 2 %
К _x 1.2.2 Приготування робочого розчину Дезактину	Концентрація розчину Дезактину	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	C = 0,2 %
К _x 1.2.2 Приготування робочого розчину Гембару	Концентрація розчину Гембару	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	C = 0,5 %
К _T , К _M 1.3.1, 1.3.2 Підготовка виробничих приміщень	М/б чистота поверхонь виробничих приміщень (стіни, підлога, двері)	Змиви тампонами або метод відбитків	Після прибирання	В змивах з площею 10 x 10 см допускається ріст КУО < 800 см ³ (ДР 1.3.1) та КУО < 800 см ³ (ДР 1.3.2) (бактерій і грибів сумарно);
К _T 1.4.1 Технологічний контроль миття обладнань та	Обладнання та комунікації, температура	Термометр технічний, годинник	Під час проведення миття	t = 40-50 °C, τ = 20 хв

комунікацій				
К _Т 1.4.2, 1.4.3 Технологічний контроль герметичності обладнання	Обладнання та комунікації, тиск	Датчик	Після миття та ополіскування обладнання	P=0,02 МПа, τ = 1год
К _Т , К _М 1.4.4 Стерилізація обладнання	Обладнання, режим стерилізації вузлів, тиск, температура, мікробна контамінація.	Манометр, термометр м/б метод, висіви на чашки Петрі	Температура та тиск визначаються безперервно під час виробничого процесу.	p = 0,003, 0,005 Мпа, t = 125-130°C, τ = 1 год
К _Т 2.1 Забір атмосферного повітря	Повітря, ступінь чистоти	Часточки бруду	Безперервно при заборі повітря	H = 20 м
К _Т 2.2 Попереднє очищення від пилу та механічних часточок	Повітря, ступінь чистоти	Часточки бруду; манометр	Безперервно при подачі повітря	E = 80%
К _Т 2.3 Компресування повітря	Повітря, температура, тиск стиснення повітря	Термометр, манометр технічний	Після компресування повітря	p = 0,35 Мпа, t = 120-250 °C
К _Т 2.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Повітря, температура, вологість повітря	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря, видалення зайвої вологи	t = 25-40°C, W=60-70%
К _Т 2.5 Нагрівання повітря	Повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання	t = 40-50°C
К _Т 2.6 Очищення на головному фільтрі	Повітря, вміст часток, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очищення повітря у головному фільтрі	E = 95 %
К _Т 2.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря, ступінь чистоти	Часточки бруду; манометр	Безперервно при подачі повітря	E = 99%
К _М К _Т 3.1.1, Приготування та	Композиція А, температура, час,	технічні ваги	мікробіологічний контроль після	V=250мл,

стерилізація поживного середовища	стерильність		стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 20\text{ хв}$,
$K_M K_T$ 3.1.2 Приготування та стерилізація поживного середовища	Композиція Б, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	$V=250\text{мл}$, $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$,
$K_M K_T$ 3.1.3 Приготування та стерилізація поживного середовища	Композиція В, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	$V=250\text{мл}$, $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$,
$K_M K_T$ 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль, технічні ваги	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 20\text{ хв}$, відсутність сторонньої мікробіоти
$K_M K_T$ 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль, технічні ваги	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність сторонньої мікробіоти
$K_M K_T$ 3.2.3 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція В, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль, технічні ваги	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність сторонньої мікробіоти
K_T, K_M 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 20\text{ хв}$, відсутність сторонньої мікробіоти
K_T, K_M 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль технічні ваги	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність сторонньої мікробіоти
K_T, K_M 3.3.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль технічні	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність сторонньої мікробіоти

		ваги		
К _т , К _м 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 20 хв, відсутність сторонньої мікробіоти
К _т , К _м 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність сторонньої мікробіоти
К _т , К _м 3.4.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, м/б контроль технічні ваги	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність сторонньої мікробіоти
К _т , К _м 4.1. Підтримання колекційної культури	Температура, час, асептичність	Термометр технічний, мікробіологічний контроль	Температура, час та зовнішній вигляд визначається безперервно під час підтримання культури	t = 3-4 °С, τ = 3-4 місяці., відсутність сторонньої мікробіоти
К _м , К _т 4.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Температура, час, асептичність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час і зовнішній вигляд визначається під час виробничого процесу. Мікробіологічний контроль по закінченню процесу	t = 30 °С, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
К _т , К _м 4.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	t = 30 -32 °С, τ = 48 год, w=240 об/хв., відсутність сторонньої мікробіоти
К _т , К _м 4.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури в інокуляторі і в кінці процесу	t = 30-32 °С, τ = 18 год, w=120 об/хв. відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження таблиці 6.3

Кт, Км 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 40 л.	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури в інокуляторі і в кінці процесу	$t = 30-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 18\text{ год}$, $w=320\text{ об/хв.}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 400 л.	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури в посівному апараті і в кінці процесу	$t = 30-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 18\text{ год}$, $w=320\text{ об/хв.}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5 Виробниче культивування	Посівний матеріал, тривалість культивування швидкість перемішування, вміст лізину, рН, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, манометр, мікробіологічний контроль, рН метр, колориметричний метод	Під час вирощування культури у ферментері. Відбір проби культуральної рідини відбувається кожні 8 год	$\text{pH} = 6,8-7,2$ $t = 30-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 18\text{ год}$, $w=320\text{ об/хв.}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт 6.1 Підкислення культуральної рідини	рН	рН метр	Під час проведення технологічного процесу	$\text{pH} = 4-5$

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Колесников С. И. Разработка региональных и локальных нормативов содержания химических веществ в почве по биологическим показателям // Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии : Материалы междунар. симпозиума и молодежной школы. МГУ. М. : ГЕОС, 2016. С. 120–122.
2. Биологический мониторинг природно-техногенных систем / Под общ. ред. Т. Я. Ашихминой, Н. М. Алалыкиной. Сыктывкар, 2011. 388 с.
3. М. І. Кулик, М. А. Галицька, М. С. Самойлік, І. І. Жорник Фіторемедіаційні аспекти використання енергетичних культур в умовах України (2018) *Agrology*, 1(4), 373–381 doi: 10.32819/2617-6106.2018.14020
4. М. І. Кулик, М. А. Галицька, М. С. Самойлік, І. І. Жорник Фіторемедіаційні аспекти використання енергетичних культур в умовах України (2018) *Agrology*, 1(4), 373–381 doi: 10.32819/2617-6106.2018.14020
5. Антонюк Н. О. Шляхи очищення довкілля від забруднення важкими металами / Н. О. Антонюк, Н. А. Гриценко // Наукові праці НУХТ -2014 - Том 20 – №5.
6. Штика О. С. Оцінка ефективності сучасних технологій ремедіації ґрунтів, забруднених важкими металами / Київ: НАУ, 2014. – С. 47-60.
7. Самохвалова В. Л. Біологічні методи ремедіації ґрунтів, забруднених важкими металами / Біологічні студії. – 2014. т. 8, № 1. – С. 217-236.
8. Самохвалова В. Л. Використання антидотів за забруднення системи ґрунт-рослина важкими металами/ Науковий вісник . – 2014, № 20. – С. 52-56.
9. В.Л. Самохвалова, А.І. Фатєєв, С.Г. Зуза, В.О. Зуза [Спосіб ремедіації ґрунту техногенно забрудненого важкими металами](#)/Агрохімія і ґрунтознавство. – 2014,С. 101-110.
- 10.Плазменная очистка воды и грунта от тяжелых металлов и радионуклидов / С.В. Петров // Энерготехнологии и ресурсосбережение. — 2013. — № 5. — С. 38-46.

11. Пацула О. І., Фецюх А. Б., Буньо Л. В. Використання *SALIX VIMINALIS L.* для фітореMediaції ґрунтів, забруднених важкими металами // Екологічні науки. – Том 2, № 1 (20), 2011. – С. 101-106.
12. Щербаченко О. І. Важкі метали як токсичний фактор забруднення природного середовища. Стійкість і адаптація рослин до їх впливу / О. І. Щербаченко // Наукові записки Державного природознавчого музею / Інститут екології Карпат НАН України – Львів, 2014 – Вип. 30. – С. 157- 182.
13. Фурдичко О.І., Дем'янюк О.С. Якість і безпека сільськогосподарської продукції в контексті продовольчої безпеки. Агроекологічний журнал. 2014. № 1. С. 7–12.
14. Flathman, P. E., & Lanza, G. R. (1998). Phytoremediation: Current Views on an Emerging Green Technology. *Journal of Soil Contamination*, 7(4), 415–432. doi: 10.1080/10588339891334438
15. Kumar, P. B. A. N., Dushenkov, V., Motto, H., & Raskin, I. (1995). Phytoextraction: The Use of Plants To Remove Heavy Metals from Soils. *Environmental Science & Technology*, 29(5), 1232– 1238. doi: 10.1021/es00005a014
16. Pandey, V. C., Bajpai, O., & Singh, N. (2016). Energy crops in sustainable phytoremediation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 58–73. doi: 10.1016/j.rser.2015.09.078
17. Cao, A., Cappai, G., Carucci, A., & Lai, T. (2008). Heavy metal bioavailability and chelate mobilization efficiency in an assisted phytoextraction process. *Environmental Geochemistry and Health*, 30(2), 115–119. doi: 10.1007/s10653-008-9136-2
18. Cheraghi, M., Lorestani, B., Khorasani, N., Yousefi, N., & Karami, M. (2011). Findings on the Phytoextraction and Phytostabilization of Soils Contaminated with Heavy Metals. *Biological Trace Element Research*, 144(1), 1133–1141. doi: 10.1007/s12011- 009-8359-0
19. Nsanganwimana, F., Pourrut, B., Mench, M., & Douay, F. (2014). Suitability of *Miscanthus* species for managing inorganic and organic contaminated land and

- restoring ecosystem services. A review. *Journal of Environmental Management*, 143, 123–134. doi: 10.1016/j.jenvman.2014.04.027
20. Nurzhanova, A., Pidlisnyuk, V., Kalugin, S., Stefanovska, T., & Drimal, M. (2015). *Miscanthus X Giganteus* as a new highly efficient phytoremediation agent for improving soils contaminated by pesticides residues and supplemented contaminants. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 80(3), 361–366.
21. Pidlisnyuk, V. V., Erickson, L. E., Trögl, J., Shapoval, P. Y., Popelka, J., Davis, L. C., Stefanovska, T. R., & Hettiarachchi, G. M. (2018). Metals uptake behaviour in *Miscanthus x giganteus* plant during growth at the contaminated soil from the military site in Sliach, Slovakia. *Polish Journal of Chemical Technology*, 20(2), 1–7. doi: 10.2478/pjct-2018-0016.
22. Liu, Y.-N., Guo, Z.-H., Xiao, X.-Y., Wang, S., Jiang, Z.-C., & Zeng, P. (2017). Phytostabilisation potential of giant reed for metals contaminated soil modified with complex organic fertiliser and fly ash: A field experiment. *Science of The Total Environment*, 576, 292–302. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.065
23. Kayama, M. (2001). Comparison of the Aluminum Tolerance of *Miscanthus sinensis* Anderss. and *Miscanthus sacchariflorus* Benth in Hydroculture. *International Journal of Plant Sciences*, 162(5), 1025–1031. doi: 10.1086/322890
24. Al Souki, K. S., Louvel, B., Douay, F., & Pourrut, B. (2017). Assessment of *Miscanthus x giganteus* capacity to restore the functionality of metal-contaminated soils: Ex situ experiment. *Applied Soil Ecology*, 115, 44–52. doi: 10.1016/j.apsoil.2017.03.002
25. Fernando, A., Rettenmaier, N., Soldatos, P., & Panoutsou, C. (2018). Sustainability of Perennial Crops Production for Bioenergy and Bioproducts. *Perennial Grasses for Bioenergy and Bioproducts*, 245–283. doi: 10.1016/B978-0-12-812900-5.00008-4
26. Zub, H. W., & Brancourt-Hulmel, M. (2009). Agronomic and physiological performances of different species of *Miscanthus*, a major energy crop. *Sustainable Agriculture*, 2, 469–486. doi: 10.1007/978-94-007-0394-0_21

27. Evangelou, M. W. H., Papazoglou, E. G., Robinson, B. H., & Schulin, R. (2015). Phytomanagement: Phytoremediation and the Production of Biomass for Economic Revenue on Contaminated Land. In *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, 1, 115–132. doi: 10.1007/978-3-319-10395-2_9
28. Korzeniowska, J., & Stanislawska-Glubiak, E. (2015). Phytoremediation potential of *Miscanthus × giganteus* and *Spartina pectinata* in soil contaminated with heavy metals. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), 11648–11657. doi: 10.1007/s11356-015-4439-1
29. Prelac, M., Bilandžija, N., & Zgorelec, Ž. (2016). Potencijal fitoremedijacije teških metala iz tla pomoću Poaceae kultura za proizvodnju energije: Pregledni rad. *Journal of Central European Agriculture*, 17(3), 901–916. doi: 10.5513/jcea01/17.3.1789
30. Tripathi, V., Edrisi, S. A., & Abhilash, P. C. (2016). Towards the coupling of phytoremediation with bioenergy production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 57, 1386–1389. doi: 10.1016/j.rser.2015.12.116
31. Jha, A. B., Misra, A. N., & Sharma, P. (2017). Phytoremediation of heavy metal-contaminated soil using bioenergy crops. In: K. Baudh, B. Singh, & J. Korstad (Eds.), *Phytoremediation Potential of Bioenergy Plants* (63–96). Springer, Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-3084-0_3
32. Pidlisnyuk, V., Stefanovska, T., Lewis, E. E., Erickson, L. E., & Davis, L. C. (2014). *Miscanthus* as a Productive Biofuel Crop for Phytoremediation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33(1), 1–19. doi: 10.1080/07352689.2014.847616
33. Antonkiewicz, J., Kołodziej, B., & Bielińska, E. J. (2016). The use of reed canary grass and giant miscanthus in the phytoremediation of municipal sewage sludge. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10), 9505–9517. doi: 10.1007/s11356-016-6175-6
34. Abhilash, P. C., & Yunus, M. (2011). Can we use biomass produced from phytoremediation? *Biomass and Bioenergy*, 35(3), 1371–1372. doi: 10.1016/j.biombioe.2010.12.013

35. Adejumo S. A. In situ remediation of heavy metal contaminated soil using Mexican Sunflower (*Tithonia diversifolia*) and Cassava waste composts / S. A. Adejumo, A. O. Togun, J. A. Adediran, M. B. Ogundiran // *World Journal of Agricultural Sciences*. – 2011. – № 7(2) – P. 224 – 233
36. Puhui J. Strategies for enhancing the phytoremediation of cadmium-contaminated agricultural soils by *Solanum nigrum* L. / J. Puhui, S. Tieheng, Yu. Song, M. Leigh Ackland, Y. Liu // *Environmental Pollution*. – 2011. – № 159. – P. 762 – 768.
37. X. Deng , L. Chai , Z. Yang , C. Tang , Y. Wang and Y. Shi , *J. Hazard. Mater.*, 2013, **248–249** , 107 —114
38. Miller R. M. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils / R. M. Miller // *biopolymers* / U. L. Lao, A. Chen, M. R. Matsumoto et al. // *Environ. Health Perspectives*. 1995. Vol. 103. P. 59-62.
39. [Ki-Hyun Kim](#). Remediation of soils contaminated with heavy metals with an emphasis on immobilization technology // DOI: [10.1007/s10653-017-9964-z](https://doi.org/10.1007/s10653-017-9964-z)
40. Ayangbenro, A. S. , & Babalola, O. O. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: A review of microbial biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health* , 14(1), 94. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>
41. Bandowe, B. A. M. , Bigalke, M. , Boamah, L. , Nyarko, E. , Saalia, F. K. , & Wilcke, W. (2014). Polycyclic aromatic compounds (PAHs and oxygenated PAHs) and trace metals in fish species from Ghana (West Africa): Bioaccumulation and health risk assessment. *Environment International* , 65, 135-146. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.12.018>
42. Siddiquee, S. , Rovina, K. , Azad, S. A. , Naher, L. , Suryani, S. , & Chaikaew, P. (2015). Heavy metal contaminants removal from wastewater using the potential filamentous fungi biomass: A review. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* , 7(6), 384–395. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000243>

43. Su, C. (2014). A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques. *Environmental Skeptics and Critics* , 3(2), 24.
44. Kisielowska, E. , Hołda, A. , & Niedoba, T. (2010). Removal of heavy metals from coal medium with application of biotechnological methods. *Górnictwo I Geoinżynieria* , 34, 93–104.
45. S. J. Ye , G. M. Zeng , H. P. Wu , C. Zhang , J. Dai , J. Liang , J. G. Yu , X. Y. Ren , H. Yi , M. Cheng and C. Zhang , Biological technologies for the remediation of co-contaminated soil, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2017, <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1304357> **37** , 1062 —1076
46. S. J. Ye , M. Yan , X. F. Tan , J. Liang , G. M. Zeng , H. P. Wu , B. Song , C. Y. Zhou , Y. Yang and H. Wang , Facile assembled biochar-based nanocomposite with improved graphitization for efficient photocatalytic activity driven by visible light, *Appl. Catal., B*, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.03.004> **250** , 78 —88
47. Chabukdhara, M. , Gupta, S. K. , & Gogoi, M. (2017). Phycoremediation of heavy metals coupled with generation of bioenergy. In *Algal biofuels* (pp. 163–188). Springer.
48. Cheraghi, M., Lorestani, B., Khorasani, N., Yousefi, N., & Karami, M. (2011). Findings on the Phytoextraction and Phytostabilization of Soils Contaminated with Heavy Metals. *Biological Trace Element Research*, 144(1), 1133–1141. doi: 10.1007/s12011-009-8359-0
49. Liu, Y.-N., Guo, Z.-H., Xiao, X.-Y., Wang, S., Jiang, Z.-C., & Zeng, P. (2017). Phytostabilisation potential of giant reed for metals contaminated soil modified with complex organic fertiliser and fly ash: A field experiment. *Science of The Total Environment*, 576, 292–302. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.065
50. Jha, A. B., Misra, A. N., & Sharma, P. (2017). Phytoremediation of heavy metal-contaminated soil using bioenergy crops. In: K. Baudh, B. Singh, & J. Korstad (Eds.), *Phytoremediation Potential of Bioenergy Plants* (63–96). Springer, Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-3084-0_3

51. Ashwini N. Rane, S.J. Geetha, Sanket J. Joshi. Biosurfactants. **2021**,, 183-206. <https://doi.org/10.1002/9781119671022.ch9>
52. Prasann Kumar, Shipa Rani Dey. Soil Microbial Diversity: Calling Citizens for Sustainable Agricultural Development. **2021**,, 23-49. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6949-4_2
53. Mousumi Debnath, Neha Chauhan, Priyanka Sharma, Indu Tomar. Potential of nano biosurfactants as an ecofriendly green technology for bioremediation. **2021**,, 1039-1055. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821496-1.00013-1>
54. Ruijie Yang, Haibing Wang, Meimei Shi, Yongguang Jiang, Yiran Dong, Liang Shi. Biosurfactant rhamnolipid affects the desorption of sorbed As(III), As(V), Cr(VI), Cd(II) and Pb(II) on iron (oxyhydr)oxides and clay minerals. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2020**, 153 , 105019. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105019>
55. Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., et al. (2019). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 10:1068. doi: 10.3389/fpls.2019.01068
56. Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R., and Bianciotto, V. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. *Front. Microbiol.* 6:1559. doi: 10.3389/fmicb.2015.01559
57. Биопрепарат «СОЙЛЕКС» [Электронный ресурс]: <http://bio-nefteshlamy.com/publics/item/90>
58. Microgenbiotech [Электронный ресурс]: <https://microgenbiotech.com/>
59. MarketsandMarkets [Электронный ресурс]: <https://www.prnewswire.com/news-releases/environmental-remediation-market-worth-158-8-billion-by-2026--exclusive-report-by-marketsandmarkets-301282031.html>
60. Smith, E. , Thavamani, P. , Ramadass, K. , Naidu, R. , Srivastava, P. , & Megharaj, M. (2015). Remediation trials for hydrocarbon-contaminated soils in arid environments: Evaluation of bioslurry and biopiling techniques. *International*

- Biodeterioration & Biodegradation , 101, 56–65. [Електронний ресурс]: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.029>
61. Srivastava, S. , Agrawal, S. B. , & Mondal, M. K. (2015). A review on progress of heavy metal removal using adsorbents of microbial and plant origin. *Environmental Science and Pollution Research* , 22(20), 15386–15415. [Електронний ресурс]: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5278-9>
62. Su, C. (2014). A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques. *Environmental Skeptics and Critics* , 3(2), 24.
63. Tiwari, S. , Singh, S. N. , & Garg, S. K. (2013). Microbially enhanced phytoextraction of heavy-metal fly-ash amended soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* , 44(21), 3161–3176. [Електронний ресурс]: <https://doi.org/10.1080/00103624.2013.832287>
64. Hussain, A. , Alamzeb, S. , & Begum, S. (2013). Accumulation of heavy metals in edible parts of vegetables irrigated with waste water and their daily intake to adults and children, District Mardan, Pakistan. *Food Chemistry* , 136(3–4), 1515–1523. [Електронний ресурс]: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.058>
65. Kader, J. , Sannasi, P. , Othman, O. , Ismail, B. S. , & Salmijah, S. (2007). Removal of Cr (VI) from aqueous solutions by growing and non-growing populations of environmental bacterial consortia. *Global Journal of Environmental Research* , 1(1), 12–17.
66. Chabukdhara, M. , Gupta, S. K. , & Gogoi, M. (2017). Phycoremediation of heavy metals coupled with generation of bioenergy. In *Algal biofuels* (pp. 163–188). Springer
67. Chatterjee, S. , Chatterjee, N. C. , & Dutta, S. (2012). Bioreduction of chromium (VI) to chromium (III) by a novel yeast strain *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC 9315). *African Journal of Biotechnology* , 11(83), 14920–14929.
68. Пат. на винахід 58557 UA. Спосіб очистки ґрунту від важких металів та радіонуклідів / Г.М. Ніковська, З.Р. Ульберг, Л.О. Коваль; опубл. 15.08.2003, Бюл № 8.

69. Huimin Huang, Yunlin Zhao, Yi Ding (2019) A high Mn *Dacillus thuringiensis* HM7, isolated from manganese ore and its biosorption characteristics [Електронний ресурс]: <https://doi.org/10.7717/peerj.8589>
70. Bhattacharya, A. , & Gupta, A. (2013). Evaluation of *Acinetobacter* sp. B9 for Cr (VI) resistance and detoxification with potential application in bioremediation of heavy-metals-rich industrial wastewater. *Environmental Science and Pollution Research* , 20(9), 6628–6637. [Електронний ресурс]: <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1728-4>
71. Puyen, Z. M. , Villagrasa, E. , Maldonado, J. , Diestra, E. , Esteve, I. , & Solé, A. (2012). Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant *Micrococcus luteus* DE2008. *Bioresource Technology* , 126, 233–237. [Електронний ресурс]: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.036>
72. Гумат Ґрунт Органік Біо Актив [Електронний ресурс]: <https://agro-hata.com.ua/ua/p1386759979-gumat-grunt-destruktor.html>
73. Органік Баланс [Електронний ресурс]: <https://btu-center.com/promisloviy-sektor/roslinnitstvo/biozhivlennya/organik-balans-kontsentrovaniy-universalniy-biopreparat/>
74. Dr. Earth Clean Detox для ґрунту [Електронний ресурс]: <https://drearth.com/product/clean-soil-detox/>
75. Бакпрепарат БАК-ВЕРАД [Електронний ресурс]: <https://www.sverad.ru/product/po-katalogu/bakpreparaty-bak-verad/bakpreparat-bak-verad-tip-1-forma-sukhaya/>
76. Ферментер *Solaris biotechnology* [Електронний ресурс]: http://www.reactor-lab.ru/equip/prom_reactory/promyshlennye-bioreaktory-fermentery-i-serii.php
77. Фільтри тонкої очистки [Електронний ресурс] // Airpol. – Режим доступу: <http://www.airpol.com.ua/catalog/ochystka-povtria/filters/filtry-tonkoi-ochystky/>
78. Системи воздухопідготовки [Електронний ресурс] // Уралкомпресормаш. – Режим доступу: http://www.ukm.ru/systemy_vozduhopodgotovki/

79. Компрессор винтовой Atlas Copco GX 7 10P / 400В 3ф 50Гц без N /
CE[Электронный ресурс] //Группа компаний Воздух. – Режим
доступу:<http://www.companyair.ru/kompressor-vintovoj-atlas-copco-gx7-10p-400v-3f-50hz-bez-n-ce>
80. Фильтр карманный грубой очистки воздуха G3-G4[Электронный ресурс]
//Айс-климат. – Режим доступу:<http://air-klimat.prom.ua/p203201321-filtr-karmannyj-gruboj.html>
81. Дозатори[Электронный ресурс] //Техноваги. – Режим
доступу:<http://www.technowagy.com.ua/uk/products/31>
82. Емкости из нержавеющей стали от 30 до 100000 литров[Электронный ресурс]
//ЧП "Стройторгсервис". – Режим доступу:<http://stprom.com.ua/p15745045-емкости-nerzhaveyuschej-stali.html>.
83. Трубкові насоси АТР[Электронный ресурс] //Насоси і насосне обладнання".
– Режим доступу:<http://www.prom-nasos.com.ua/pdf/atr.pdf>
84. Приточно-витяжні установки АФ[Электронный ресурс] // Вент Заводи. –
Режим доступу:<http://v-z.com.ua/ua/category/pritочно-vytzhnye-ustanovki -af/>
85. Диаэм – продажа лабораторного оборудования, расходных материалов и
реактивов.– Режим доступу:<http://www.dia-m.ru>.
86. Дозатор ваговий для сипучих продуктів [Электронный ресурс]:
<http://www.vostok.dp.ua/ukr/catalog/products/scale/doza/product.html?id=4117>
87. Автомат пакувальний [Электронный ресурс]: <https://prom.ua/ua/p29952421-fasovochno-upakovochnyj-avtomat.html>
88. Насос відцентровий [Электронный ресурс]:
<https://ukrnasos.com.ua/uk/%D0%BD%D0%B0%D1%81%D0%BE%D1%81%D0%B8-%D0%B2%D1%96%D0%B4%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%B2%D1%96-%D1%81%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D0%B9%D0%BD%D1%96-%D1%82%D0%B8%D0%BF%D1%83-%D1%86%D0%BD%D1%81/%D1%86%D0%BD%D1%81-60/>

89.КАРЛАШ Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв.
[Електронний ресурс]: конспект лекцій для для здобувачів освітнього
ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм
навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252