

**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)
_____ Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ____ » _____ 2021 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
_____ Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ____ » _____ 2021 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: _____ **Хітозани у контролі збудників бактеріальних хвороб зернових культур** _____

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 1

_____ Танана Максим Володимирович _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

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

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)
_____ (підпис)

Рецензент _____ Кулаков М.М. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології
і мікробіології

Пирог Т.П.

“ 28 ” жовтня 2020
року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Танана Максима Володимировича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Хітозани у контролі збудників бактеріальних хвороб зернових культур

керівник роботи Буценко Людмила Миколаївна к.б.н. доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “26” жовтня 2020 року № 868-к

2. Строк подання здобувачем роботи _____

3. Вихідні дані до роботи Bacillus amyloliquefaciens, хітозани, зернові культури, ферментер об'ємом 600 л, 26 000 літрів культуральної рідини за 110 трудоднів.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Характеристика хітозанів, техніко-економічне обґрунтування випуску продукту мікробного синтезу, обґрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу _____

1 апаратурна схема формату А1, 1 апаратурна схема формату А2, 2 технологічні схеми формату А2.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання _____ 28 жовтня 2020 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Розділ 1 Літературний огляд	29.10.20–12.11.20	
	Розділ 2 Техніко-економічне обґрунтування	13.11.20–27.11.20	
	Розділ 3 обґрунтування вибору технологічної схеми	28.11.20–5.12.20	
	Розділ 4 Специфікація обладнання	6.12.20–20.12.20	
	Розділ 5 Опис технологічної схеми	21.12.20–4.01.21	
	Розділ 6 контроль виробництва	7.01.21–21.01.21	

Здобувач

_____ (підпис)

Танана М.В.

_____ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Буценко Л.М.

_____ (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Представлено кваліфікаційну роботу виробництва препарату для захисту рослин, основою якого є висушена біомаса *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 з додаванням хітозанів.

Біомасу *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 пропонується використовувати у складі комбінованого препарату разом із хітозанами для комплексного захисту зернових культур. Штам *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 проявляє фунгіцидну та рістстимулюючу дію, в той же час як хітозани стимулюють певні процеси у рослинах, що призводять до різних захисних реакцій рослин-господарів у відповідь на мікробні інфекції, включаючи накопичення фітоалексинів, патогенрелігіннованих білків та інгібіторів протеїнази, синтез лігніну та утворення калози, руйнують біоплівки. Це дозволить нам отримати всесторонній препарат для захисту зернових культур.

В результаті техніко-економічного обґрунтування розрахована потужність виробництва становить 286 кг біомаси за 110 трудоднів. Технологія виробництва препарату для захисту рослин складається з допоміжних робіт (приготування та стерилізація поживного середовища, підготовка допоміжних розчинів) та основних процесів (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторах об'ємами 6 та 60 л, виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 600 л, центрифугування культуральної рідини, отримання напівфабрикату, сушіння препарату, просіювання препарату та його пакування), що наведені в технологічній та апаратурній схемах.

Кваліфікаційна робота складається з п'яти розділів, списку використаної літератури (101 найменувань), технологічної (формат А2) та апаратурної (формат А1) схем. Загальний обсяг роботи – 116 сторінок, 13 таблиць, 17 рисунків.

Ключові слова: біомаса, біосинтез, *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-1100, хітозани, комплексна дія, зернові культури, виділення.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	4
ВСТУП	6
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	7
РОЗДІЛ 1. Характеристика хітозанів.....	7
ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	38
РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ ПРОДУКТУ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ	38
2.1 Потреба у цільовому продукті	38
2.2 Розрахунок потужності виробництва	41
2.3 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	42
РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	45
3.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування.....	45
3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера.....	53
3.3 Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту	58
3.4 Обґрунтування вибору стадій отримання товарної форми.....	68
РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	71
РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	74
РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	87
ВИСНОВКИ	100
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	101

ВСТУП

До бактерій, які стимулюють зростання рослин, відносяться представники багатьох видів, що належать до різних родів ґрунтових мікроорганізмів. Використання бактерій в сільськогосподарській практиці представляється вельми перспективною альтернативою хімічним агрохімікатів, що дозволяє зменшити забруднення навколишнього середовища, оскільки їх виділяють, в основному, з природного середовища існування рослин. В цій зв'язку на особливу увагу заслуговують аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus*, які є типовими представниками ґрунтової мікрофлори і відрізняються потужним биосинтетическим потенціалом в поєднанні з високою екологічною пластичністю (сапробіонти, епіфіти, Ендофіти).

Відомо, що для бактерій характерним є позитивне (прямий і опосередкований) вплив на рослини: здатність до синтезу фітогормонів, антибіотичних, антифунгальних з'єднань і вітамінів; здатність до фіксації молекулярного азоту атмосфери, мобілізації нерозчинних фосфатів ґрунту і ін.

У зв'язку з цим дослідження фітостимулюючої і гормонсинтезуючої активності бактерії роду *Bacillus* для створення біопрепаратів широкого спектру дії для рослинництва є дуже доцільним.

Актуальність: створення біопрепаратів широкого спектру дії для рослинництва на основі бактерій *Bacillus amyloliquefaciens* є перспективними з огляду не тільки на широкий спектр високої антагоністичної активності до різних фітопатогенних мікроміцетів і бактерій, а й фітостимулюючої активності.

Новизна: Додавання до даної моделі хітозанів, які стимулюють певні процеси у рослинах, що призводять до різних захисних реакцій рослин-господарів у відповідь на мікробні інфекції, включаючи накопичення фітоалексинів, патогенрелігіннованих білків та інгібіторів протеїнази, синтез лігніну та утворення калози, це дозволить нам отримати всесторонній препарат для захисту зернових.

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Танана			ВСТУП			Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.		Буценко								4	2
Консультант								Кафедра БТМ ⁶			
Н. Контр.											
Затверд.		Пирог Т.П.									

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. Характеристика хітозанів

1.1 Характеристика хітозанів та джерела їх одержання

1.1.1 Хімічний склад і будова хітозанів

Авторами на чолі з А. Anitha описано хітозан як молекулярну форму хітину без ацетильних груп, що являє собою амінополісахарид з повною назвою згідно ІУПАК: 2-аміно-2-дезоксi- β -D-глюкан. Він утворюється при деацетилюванні хітину. Як і хітин, хітозан являє собою аморфно-кристалічний полімер, для якого також характерне явище поліморфізму [18].

На відміну від хітину, який малорозчинний у воді та кислотах, одержуваний при його деацетилюванні хітозан розчиняється навіть у розбавлених органічних кислотах, наприклад у водному розчині оцтової кислоти. Для розчинів хітозану характерна істотна залежність в'язкості від концентрації (при збільшенні концентрації розчину хітозану в 1-2%-му розчині оцтової кислоти з 2 до 4% в'язкість розчину збільшується приблизно в 30 разів).

Хітозан складається з глюкозаміну з'єднаного 1-4 глікозидними зв'язками, тож відповідно має здебільшого лінійну структуру.

Існує три основних типи поліморфної модифікації хітину і відповідно хітозану: α -хітозан, β -хітозан, γ -хітозан [18].

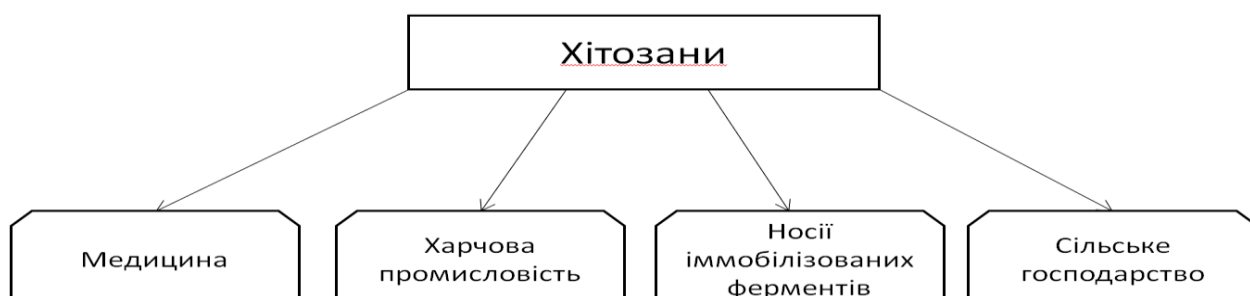


Рис.1.1 Напрями застосування хітозану

НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата								
Розроб.		Танана			РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД				Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.		Буценко									6	
Консультант									Кафедра БТМ ⁷			
Н. Контр.												
Затверд.		Пирог Т.П.										

За дослідженнями авторів М. S. Hossain and A. Iqbal охарактеризований хітозан одержаний з панцирів креветок, має наступні властивості: володіє молекулярною масою у середньому 105000 дальтон, в'язкість у розчинах 2%-ої оцтової кислоти 13.20 Да/г, водозв'язувальна здатність 427 %, розчинність у 50% розчині гідроксиду натрія 97,2%, ступінь деацетилювання 79,2 % [19].

Автори досліджували властивості хітозану одержаного з *Schistocerca gregaria* (виду саранчі), результати показали, що хітозан володів наступними властивостями: молекулярна маса 800000 дальтон, внутрішня в'язкість 10,1 Да/г водозв'язувальна здатність 538% , ступінь деацетилювання 74 % [20].

Гартман О.Р. та Воробьева В.М досліджували фізико-хімічні властивості хітозану одержаного з рачка гамаруса (*Gammarus roeselii*). За результатами дослідження було встановлено, що хітозан володіє наступними властивостями: молекулярна маса 1380000 дальтон, ступінь деацетилювання 75 %, в'язкість у розчинах 2% оцтової кислоти 17,9 дЛ/г [21].

Е. В. Козирева, А. Ю. Абрамов, А. Б. Шиповская досліджували динаміку зміни в'язкості розчинів хітозану різної концентрації у розчинах оцтової кислоти з плином часу зберігання. Для дослідження використовували 3 типи хітозанів: ХТЗ-200, ХТЗ-87, ХТЗ-275. Для всіх 3 типів використовували різні розчини оцтової кислоти та різні концентраційні наважки: ХТЗ-275 розчиняли до концентрації 2 г/л у 4 % оцтовій кислоті, ХТЗ-200 у концентрації 2 г/л у 70 % оцтовій кислоті, ХТЗ-87 концентрації 2 г/л у 2 % оцтовій кислоті.

Встановлено, що зі збільшенням періоду зберігання рівноцінно для всіх розчинів хітозану зменшувалась в'язкість: до 50 днів зберігання значення зменшувалося від 1 до 0,4, після досягнення терміну зберігання у 100 днів в'язкість падала до 0,3-0,2. При подальшому зберіганні в'язкість знижувалася дуже повільно до значення 0,1 і у подальшому не змінювалася [22].

1.1.2 Джерела отримання хітозанів

Хітозан одержують деацетилюванням хітину, який в свою чергу одержують екстракцією з панцирів ракоподібних, молюсків та грибів. Відповідно хітозан одержаний з різних джерел хітинів буде відрізнятися за своїми властивостями.

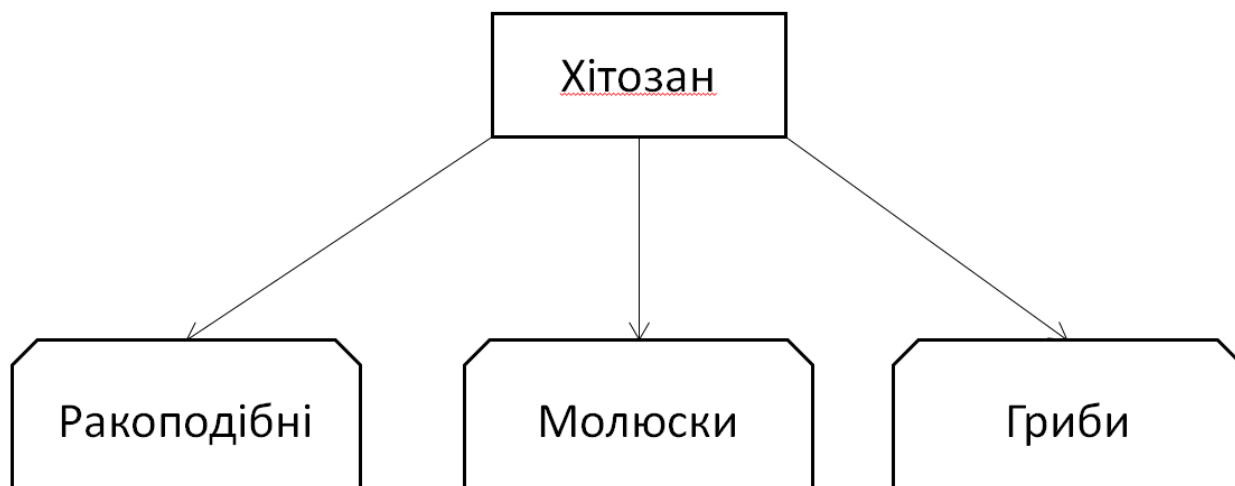


Рис.1.2. Джерела отримання хітозанів

Хітозан з ракоподібних

Авторами M.D.Teli, Javed Sheikh описано метод одержання хітозану з мушель креветок. Метод ґрунтується на екстракції хітозану з подрібнених мушель креветок та подальшій деацетилизації до ступеня 75,1-75,5 % [23].

Ming-TsungYen зі співавторами описували метод одержання хітозану за допомогою екстрагування хітину з сирих подрібнених крабових панцирів та подальшим його деацетилюванням. Одержаний таким чином хітозан має молекулярну масу близько $1 \cdot 10^6$ дальтон [24].

Хітозан з молюсків

Tolaimate, A., Desbrières, J. та колеги описували метод одержання хітозану з хітину кальмару одержаного в свою чергу з твердих частин тіла кальмара (*Loligo vulgaris*). Після екстракції хітозану проводили деацетилізацію. Ступінь деацетилізації становив 70-76 % [25].

Хітозан з грибів

Sams, Carl зі співавторами описували застосування сирих екстрактів хітозану одержаних з клітинної стінки *P. expansum*, *P. solitum* та *Botrytis cinerea*. Хітозан у цих екстрактах мав різну молекулярну масу в залежності від виду мікроорганізму, з якого був одержаний [26].

Метод одержання хітозану екстракцією з плодового тіла гриба *Ganoderma lucidum* описано Natali Mesa Ospina та колегами. Суть методу полягає у екстракції хітозану зі зруйнованого ультразвуком міцелію плодового тіла гриба розчином гідроксиду натрія та подальшим видалення ацетильних груп. За результатами одержання хітозан становив наступну концентрацію відносно концентрації біомаси 82,23 мг/г [27].

1.1.3 Основні напрямки застосування хітозану

Shinsuke Ifuku з колегами досліджували можливість застосування хітозану у якості матеріалу для мікрофібр, за допомогою обробки кислотами для механічної фібриляції волокна, такий метод найбільш ефективний для утворення нановолокна хітозану як з сирого екстракту так із порошкоподібної форми [28].

Досягнуто декількох модифікацій поверхні хітинової НФ (нанофібри), включаючи такі етапи як ацетилювання, деацетилювання, фталолірування, нафталоліування, малейлювання, хлорування, окислення, опосередковане TEMPO, та полімеризацію трансплантатів. Одержані таким чином нанофібрильні плівки з хітозану володіли специфічними механічними властивостями завдяки розширеним кристалічним структурам. Використовуючи ці характеристики, були виготовлені оптично прозорі хітинові композити з НФ та акриловими смолами. Завдяки підсиленому ефекту хітинових НФ, вони можуть значно збільшити міцність на розрив акрилових смол і зменшити термічне розширення, не втрачаючи при цьому прозорості чи гнучкості [28].

John Antoniou зі співавторами дослідили метод покращення механічних властивостей полікарбонатних плівок включенням у їх структуру наночастинок хітозану. Для дослідження взаємодії та сумісності між наночастинками полісахариду в мікроплівці були використані вимірювання інфрачервоної

спектроскопії перетворення Фур'є (FTIR) та рентгенівська дифракція (XRD). Мікроструктуру аналізували за допомогою атомно-силової мікроскопії. За результатами дослідження було встановлено, що включення наночастинок хітозану покращувало механічні, фізико-хімічні та бар'єрні властивості. Міцність на розрив була збільшена на 35,73 Мпа порівняно з контролем, подовження (подовжня деформація) зменшувалась на 7,21%. Водопроникність зменшувалась відповідно на 22,7%. [29].

Vinod Saharan з колегами досліджував протигрибкові властивості синтезованого ними комплексу хітозану з міддю у формі наночастинок. Антимікробну та стимулювальну активність синтезованого комплексу у формі наночастинок оцінювали на томатах виду *Solanum lycopersicum* Mill. Дослідження підкреслило стабільність та пористість наночастинок Cu-хітозану. Наночастинки показали істотний стимулювальний ефект на проростання насіння томатів, довжину розсади, свіжу та суху масу на рівні 0,08, 0,1,10 та 0,12%. При концентрації 0,12% ці наночастинки викликали пригнічення росту міцелії 70,5 та 73,5% та інгібували проростання спор у *A. solani* та *F. Oxysporum* [30].

У експериментах на горщиках концентрація наночастинок Cu-хітозану виявилась найбільш ефективною у відсотковій ефективності боротьби з хворобою у рослин томатів зі значеннями 87,7% у раннього фітофторозу та 61,1% у в'яненні фузаріюму. Загальні результати підтверджують значне сприяння росту, а також протигрибкові можливості наночастинок купрум-хітозанового комплексу [30].

Seyed Fakhreddin Hosseini зі співавторами досліджував властивості новоствореної нанокомпозитної плівки на основі риб'ячого жиру та наночастинок хітозану. Композитна плівка була одержана за допомогою іонного гелеутворення комплексу хітозану із залишками жирних кислот, що входять до риб'ячого жиру. Плівка володіла антимікробною активністю щодо чотирьох патогенних збудників, а саме: *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* та *E. coli*. Зони затримки росту (*in vitro*) при дослідженні антимікробних властивостей комплексу становили: *S. aureus*- 26 мм, *L. monocytogenes*-26 мм, *S. enteritidis*-30 мм та *E. coli*-33 м [31].

Moacir Fernandes та колеги досліджували антиоксидантну активність хітозану одержаного в лабораторних умовах та його вплив на утворення кристалів оксалату кальцію. Дослідження антиоксидантної активності відносно стандартної антиоксидантної активності вітаміну С показали, що розчини хітозану різних концентрацій мають різну антиоксидантну активність. Найменш ефективними були розчини хітозану з концентраціями 0,1 та 0,25 мг/мл, антиоксидантна активність порівняно зі стандартною активністю аскорбінової кислоти складала 38 та 70%, найбільш ефективна концентрація – більше 0,5 мг/мл. Активність при цьому зростає до 90-95 % [32].

Підвищення ефективності утворення кристалів оксалату кальцію, яке спостерігалось при додаванні хітозану у концентраціях : 25, 50 та 100 мкг/мл підвищувало ефективність в основному третьої стадії кристалізації – агрегації. Що збільшувало агрегацію частинок кристалів у середньому на 15000 % порівняно з контролем. Суттєвої різниці підвищення агрегації відносно концентрацій хітозану у 25, 50 та 100 мкг/мл не спостерігалось [32].

Nicoletta Rescignano зі співаторами аналізували перспективний підхід до отримання дрібних, сферичних та рівномірних біорозкладаних полімерних наночастинок із використанням трьох різних природних емульсійних стабілізаторів: наночастинок альгінату, целюлози, та хітозану і результати були обговорені з точки зору параметрів процесу. Хітозан та альгінати раніше розглядалися як поверхневі модифікатори для створення наночастинок PLGA протилежно заряджених, в той час як бактеріальні целюлозні нанокристали використовувались для стабілізації незворотної стабілізації нанокристалів емульсійної нанокристалічної кислоти. Найбільш ефективним стабілізатором з поміж трьох виявився хітозан (його наночастинок) [33].

Federico Lopez-Moya та дослідники вивчали здатність хітозану зменшувати доступність джерел вуглецю і азоту для споживання грибами родів *Fusarium* та *Candida*. з метою виявлення фунгіцидної активності. Було встановлено, що при додаванні до поживного середовища хітозану у кількості 2,5 мкг/мл зменшувалася швидкість споживання глюкози у 2 рази. Також при низьких

концентраціях субстрату (С карбону 0.8 г/л) та джерела азоту (N азоту 1- 0.03 г/л), що містило експериментальне поживне середовище додавання хітозану у кількості 2,5 мкг/мл викликало часткову мембранну пермеабілізацію та 25% зменшення ефективності споживання азоту.

Для *Fusarium proliferatum* зниження концентрації вмісту С і N до 100 разів підвищувала чутливість до хітозану у 16 разів. Аналогічні результати були виявлені і для *Candida*. Додавання хітозану до поживного середовища у кількості у 100 мкг/мл було смертельним для 8 з 10 тестованих грибків [34].

Miao Qiu та співавтори оцінювали протигрибкову активність та вплив високомолекулярних хітозанів (Н-хітозан), низькомолекулярних хітозанів (L-хітозан) та карбоксиметил-хітозану (С-хітозан) на пожовті зелені спаржі. В результаті L-хітозан та Н-хітозан ефективно пригнічували радіальне зростання *Fusarium concentricum*, відокремленого від зеленої спаржі після посіву в дозі 4 мг / мл, що виявилось більш ефективним при інгібуванні проростання спор і подовження зародкових труб в порівнянні з С-хітозаном. Помітно, проростання спор було повністю інгібовано L-хітозаном та Н-хітозаном у дозі 0,05 мг / мл. Спаржа з покриттям не виявляла жодних очевидних ознак фітотоксичності та зберігала гарну якість протягом 28 днів зберігання в холоді, відповідно до втрати ваги та загальних аспектів якості. Результати представлених даних свідчать про те, що хітозан може діяти як консервант для зеленої спаржі після збирання врожаю завдяки його протигрибковій активності та здатності стимулювати деякі захисні реакції під час зберігання [35].

Francesca Sansone зі співавторами опублікувала роботу, яка стосувалася дослідження властивостей комплексу інкапсульованого полярного екстракту *Raeonia roki* (PPR) та хітозану (С) як полімерної матриці з антиоксидантною та протигрибковою активністю. Вплив агента на процес покриття та інкапсуляцію, стабільність зберігання, а також технологічні та функціональні властивості мікрокапсульованої ПНР оцінювали у відношенні необробленої ППР. Було також вивчено поєднання між хітозаном та ППР під час протигрибкової активності. Вибрана концентрація хітозану 0,5% мас. / Об. Так всі випробувані

співвідношення С / PPR (1: 1; 2: 1; 3: 1) призвели до задовільної ефективності процесу в терміні виходу (від 69,8% до 73,2%), капсулювання ефективність (від 80,1% до 84,9%) і розмір частинок (від 5,15 до 9,28 мкм). Композиція, отримана, починаючи зі співвідношення С / PPR 1: 1 (С-PPR / 1) показала найвищий вміст поліфенолу (АРС 6,63%) по відношенню до інших рецептур. Через кореляцію між вмістом поліфенолу та функціональністю PPR, для послідовних досліджень було обрано С-PPR/1. Порошок С-PPR /1 дав стабільну обробку і також показав високу швидкість розчинення води по відношенню до необробленого ПНР. Цікаво, що комбінація хітозану та екстракту ППР змогла посилити протигрибкову активність порівняно з екстрактом сировини, що свідчить про потенційну синергію в дії або підвищенні біодоступності антимікробних молекул. Сформований порошок можна використовувати з великим потенціалом в продуктах харчування, косметичі або харчових продуктах [36].

Yuan Lu зі співавторами досліджували бактерицидні властивості низькомолекулярних олігосахаридів хітозану. Вторинні амінофункціоналізовані олігосахариди хітозану різної молекулярної маси (тобто 2500, 5000, 10 000) синтезували прищепленням 2-метил азиридину з первинних амінів на олігосахариди хітозану з подальшою реакцією з газом оксиду азоту (NO) в основних умовах на вихід донорів N-діазенідіолату NO. Загальний запас NO, максимальний потік NO та період напіврозпаду отриманих олігосахаридів, що вивільняють NO, були контрольовані мольним співвідношенням 2-метил-азиридину до первинних амінів (наприклад, 1: 1, 2: 1) та функціональною групою оточуючих N-діазенідіодіолати (наприклад, ланцюги поліетиленгліколю (PEG) відповідно. Водорозчинність олігосахаридів хітозану дозволила проникнути через матрицю позаклітинних полісахаридів біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* та асоціюватися з вбудованими бактеріями.

Показано, що ефективність цих олігосахаридів хітозану при знищенні біоплівки залежить як від молекулярної маси, так і від іонних характеристик. Низькомолекулярні та катіонні олігосахариди хітозану демонстрували швидку асоціацію з бактеріями на всій біоплівці, що призводило знищення біоплівки. [37].

1.2 Збудники хвороб пшениці поширені в Україні

1.2.1 Характеристика основних збудників бактеріальних хвороб пшениці

Пшениця належить до найбільш цінних і високоврожайних зернових культур. Вона за посівними площами і використанням посідає перше місце серед зернових культур у світі. Зерно пшениці багате на білки (14-18%) і клейковину (25-28%), тому широко використовується в хлібопекарській і кондитерській промисловостях, а також для виробництва крупи, макаронів, вермішелі та ін-ших продуктів. Із пшениці також отримують крохмаль, спирт, клейковину, а пшеничні висівки є висококонцентрованим кормом для всіх видів сільськогосподарських тварин. У деяких районах України пшеницю озиму використовують на зелений корм. Бактеріальні хвороби становлять небезпеку при вирощуванні пшениці, а в Україні поширено багато небезпечних збудників таких хвороб з якими необхідно активно боротися щоб уникнути можливих епіфітотій у майбутньому [49].

У таблиці 1.1. представлено список розповсюджених у світі бактеріальних хвороб пшениці разом зі збудниками, які їх викликають.

Таблиця 1.1.

Поширенні бактеріальні хвороби пшениці та їх збудники

ХВОРОБА	ЗБУДНИК	СИМПТОМИ
Чорний бактеріоз	<i>Xanthomonas translucens</i>	Темно-зелені плями у листя на початку та почорніння колосків
Бактеріальний опік	<i>Pseudomonas syringae</i>	Водонасичувані плями-штрихи на квіткових лусочках та листях нижнього ярусу
Жовтий слизовий бактеріоз	<i>Rathayibacter toxicus</i>	Засихання та відмирання листя після утворення жовтуватого слизу
Біла плямистість	<i>Bacillus megaterium</i>	Жовті/білі некрози на стадії виходу колоса та почорніння лусочок пшениці
Бурий бактеріоз	<i>Pseudomonas ramonicum</i>	Ураження всіх органів, в основному йде гниль стебла із бурими плямами

Бактеріальна мозаїка	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Рівномірно розташовані на листовій пластинці жовті ураження з рівними краями
Рожевий бактеріоз	<i>Erwinia rhapontici</i>	Пом'якшення ендосперму та повне почервоніння поверхні зерна

Paul A. Langlois зі співавторами проводили філогенетичний аналіз та досліджували властивості збудника чорного бактеріозу пшениці – *Xanthomonas translucens*. Бактеріоз викликаний даним збудником проявляється у враженні усіх органів рослин пшениці у вегетативній фазі. Захворювання рідко розвивається на рослинах у фазі сходів. На початку інфекційного процесу у фазі кушіння на листі з'являються водянисті світло-зелені плями, які з часом збільшуються в розмірах, стають темно-жовтими, коричневими, іноді з чорною облямівкою. Зрідка на них з'являються прозорі смуги, які згодом набувають жовтого або бурого забарвлення. На дорослих рослинах плями частіше з'являються на нижньому і верхньому листі. У фазі дозрівання уражені тканини стають жовтими. Іноді під вузлами утворюються чорні або коричневі подовжні смуги, які можуть поширюватися на всю довжину стебла. Найчастіше захворювання розвивається на колосках. *Xanthomonas translucens* це грам негативні паличкоподібні бактерії, розміром 0.5-1,3 мкм., облігатні аероби, проявляють позитивну каталазну та негативну оксидазну активності, оптимальна температура розвитку 30 °C, витримують низькі температури до -4 °C. Переважні місця існування – це ендofіт рослин та ґрунт [38,49].

Akira Kawaguchi зі співавторами досліджувала епідеміологію, поширення та властивості ізолятів *Pseudomonas syringae*. Даний мікроорганізм є збудником двох захворювань пшениці: базальної гнилі колоску та бактеріальних опіків (некрозів) листків пшениці [39].

Фітопатоген представляє собою грам-негативну паличкоподібну бактерію розмірами 1,5-1,8 мкм з наявністю 1 джгутика, синтезує полісахарид леван,

виділяє сидерофор піовердин та фітотоксин сирингоміцин. У зараженої даним фітопатогеном пшениці можуть спостерігатися два фітопатологічні стани:

1) базальна гниль колоска, що характеризується утворенням на листі прозорих, водянистих, маслянистих, коричневих, білуватих або жовтих витягнутих плям. З часом вони подовжуються, підсихають, буріють, а по краях плям з'являється коричнева, коричнево-бура або червоно-бура облямівка. Іноді зустрічаються темні штрихи, які при злитті забарвлюють нижню частину стебла в темний колір. При загниванні вузла кущіння на нижній частині стебла і листі з'являються некротичні бурі плями, тканина яких розм'якшується, що призводить до в'янення окремого листа або усєї рослини. У фазу наливання зерна на різних частинах рослин утворюються бурі, коричневі, бежеві або чорні витягнуті плями і штрихи. Зрідка на лусочках з'являються плями, що переходять на остюку. Частота ураження тримається на рівні 15-16 % від загальної кількості рослин.

2) бактеріальний опік листків пшениці, що проявляє такі симптоми як сіро-зелені некрози і побіління листя, колоскових лусочок, обгорткового листа і стебла. Плями утворюються на верхній і нижній квіткових лусочках.

Патогенез *P. syringae* часто проявляється у вигляді водонасичених плям-штрихів. По краю або в середині листової пластинки утворюються буро-коричневі довгасті плями без облямівки. Колір плям і наявність облямівки залежать від виду сорту рослин. Окрім листя бактерії можуть вражати і інші частини рослини. Більше вражається листя нижніх і середніх ярусів. При сильному розвитку хвороби може гинути окреме листя, в основному нижнє, але рослина в цілому гине рідко. З ураженого зерна патогенні бактерії переміщуються по проростку і можуть виживати на здоровому листі [39,49].

Ще одним розповсюдженою хворобою є жовтий слизовий бактеріоз який вражає рослину за допомогою личинок пшеничної нематоди *Anguina tritici*. У ґрунті вона здатна зберігати життєздатність 5-7 років, а в сухому зерні більше 20 років.

Збудником захворювання є *Rathayibacter toxicus*, який є об'єктом зовнішнього карантину для країн Східної Європи, його здатність до ураження

рослин, зокрема пшениці описано у роботі авторів Timothy D. Murray, Brenda K. Schroeder [40]. Було описано, що захворювання пшениці на жовтий слизовий бактеріоз, поширюється на посівах пшениці у вигляді вогнищ. Через декілька днів після інфікування на проростках по краю листа і між жилками з'являється подовжнє біле або жовтувате знебварвлення. Спочатку уражені тканини стають блискучими, потім на них з'являється слиз, а потім вони жовтіють. Сильно уражене листя засихає і відмирає. На наступних стадіях розвитку пшениці на початку інфекційного процесу на листі і листових піхвах з'являються білі, рідше жовтуваті вузькі подовжні смужки, складчастість, скручування і ослизнуло листя, стебел і колосу. Колос разом з обгортковим листом жовтіє, викривляється, утворюючи безформну потворну масу, яка покривається в'язкою. *Rathayibacter tritici* є паличкоподібною грам-позитивною бактерією. В основному виділяється з ґрунту [40,49].

Bacillus megaterium pv. *cerealis* фітопатоген, що викликає білу плямистість пшениці. Дослідженням фітопатогену займалися автори Montaser Fawzy Abdel-Monaim та колеги. За морфолого-культуральними ознаками *Bacillus megaterium* являє собою грам-позитивну паличку, розмірами 1-1,4 мкм, що утворює спори. Основне місце існування: ґрунт, рідше ендofіт рослин. Захворювання «Білої плямистості пшениці» проявляється на стадії виходу колосу в трубку у вигляді невеликих жовтих або білих некрозів, які швидко збільшуються і перетворюються на білі або світло-коричневі плями і смуги неправильної форми на листі, обгортковому листі і стеблах, рідше спостерігається почорніння лусочок. Розвиток захворювання посилюється при підвищеній температурі і інтенсивному освітленні. Молоді рослини пшениці, що швидко розвиваються, стійкі до патогена. Подібні симптоми захворювання викликає *P. syringae* pv. *syringae*. Обидві бактерії призводять до появи на пшениці великих білих плям, але симптоми їх прояву мають і деякі особливості. Так, при ураженні *P. syringae* виникають водонасичені плями-штрихи, а при ураженні *B. megaterium* pv. *cerealis* - дуже великі плями, що займають велику частину листа. Збудник небезпечний

також для ячменю і вівса. В деяких випадках *B. megaterium* був виявлений на здоровому листі пшениці, що свідчить про можливість епіфітотії [41,49].

Бурий бактеріоз пшениці викликається збудником *Pseudomonas ramonicum*. Захворювання активніше поширюється в теплу погоду під час формування і відростання сходів ранньою весною. Внизу на стеблі з'являються жовті плями з бурюю облямівкою, які з часом збільшуються в розмірах і покривають усе стебло. Згодом тканини стебла руйнуються і темніють. Перші два-три листи втрачають тургор, і на них з'являються коричневі промаслені плями і смужки. Листя набуло ясно-зеленого кольору, потім жовтіють і засихають. У уражених рослин колос недорозвинений, зерна бурі і щуплі, іноді з темним зародком. При проростанні поверхня таких зерен буріє і загниває, а зародок гине. А. Р. Glinushkin зі співавторами описували властивості певних представників фітопатогенів, включаючи *Pseudomonas*. Було описано, що *P. ramonicum* досить схожа по ознакам на *P. syringae*, представляє собою грам-негативну паличкоподібну бактерію розмірами 1,5-1,8 мкм з наявними джгутиками, синтезує полісахарид леван [42,49].

Щодо ізоляту *Pectobacterium carotovorum*. Цей фітопатоген є грам-негативною паличкоподібною бактерією родини Enterobacteriaceae, здебільшого вражає злакові, зокрема пшеницю. *Pectobacterium carotovorum* є збудником стеблевої гнилі. Захворювання найчастіше проявляється ранньої весни, а іноді бактеріоз проявляється у вигляді загнивання вузла кущіння. Спочатку його тканина темніє і стає світло-коричневого або бурого кольору. У нижній частині стебла на рівні ґрунту утворюються коричневі, чорні, бурі або жовтуваті з бурюю облямівкою невеликі подовжні плями – ділянки гнилої тканини. Часто на стеблі з'являються жовті плями з бурюю облямівкою, по яких поширюються ясно-бурі смуги. В результаті один-два перших листа в нижній частині жовтіють, буріють, втрачають форму і в'януть. Спочатку загниває паренхіма листа, що потім проводять пучки, що призводить до легкого відриву надземної частини рослини. Уражені рослини відстають в зростанні, на них розвивається укорочений колос, який іноді стає бурим. У колосі утворюються щуплі зерна, а при сильному

розвитку хвороби зерно взагалі не формується. Розвитку бактеріозу сприяють затяжна осінь, часта відлига взимку з температурою повітря вище +5 °С. В холодні зими з температурою нижче нуля симптоми [43,49].

Збудник *Pseudomonas cichorii*. Вражає в основному злакові культури, такі як пшениця та ячмінь. За морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями *Pseudomonas cichorii* це грам-негативні ґрунтові бактерії, патогенні для рослин розміром 2-3 мкм, мають широкий асортимент господарів *P. cichorii* вперше був виділений на ендівії (*Cichorium endivia*), від чого він і отримав свою назву, продукує 6-амінопеніциланову кислоту. Eder Marques зі співаторами досліджували властивості патогенезу *Pseudomonas cichorii* окремо та у асоціації інших бактерій. Щодо різних рослин. Зокрема було описано патогенез захворювання спричинене *Pseudomonas cichorii* під назвою стебловий меланоз. Патогенний стан уражених рослин пшениці характеризуються знебарвленням порожнім колосом, почорнінням стержня колосу, квітконіжки і стебла нижче вузлів. Перші симптоми захворювання з'являються як на ранніх стадіях зростання, так і в період молочної стиглості. Невеликі світло-коричневі некрози стебла розвиваються нижче двох вузлів. Впродовж двох тижнів уражена тканина темніє, некрози зливаються і поширюються на стержень колосу, квітконіжки з подальшим переходом на лусочки. У фазі молочно-воскової стиглості некрози збільшуються і темніють. Стержень колосу і стебло стають темно-коричневими. Колос знебарвлюється, а зерна зморщуються [44,49].

Rudolf Eichenlaub та колеги описували властивості фітопатогенних штамів *Clavibacter michiganensis*, що спричиняють бактеріальну мозаїку пшениці. Описано, що фітопатоген відноситься до актиноміцетів, та є єдиним представником свого роду, грам-позитивна паличкоподібна бактерія, не утворює спори, місця існування переважно ґрунт, строгий аероб. Захворювання, що викликає цей патоген проявляються тільки у пшениці в природних умовах. На листі з'являються невеликі жовті плями з нерівними краями, густо і рівномірно розташовані на листовій пластинці, які іноді зливаються в смуги [45].

Ураження плямистого бактеріозу пшениці викликається збудником *Pseudomonas fluorescens*. Здебільшого патогенними для пшениці виявилися штами, ізольовані з кореневої шийки, зів'ялого листа у фазі сходів, зерна і остів з коричневими плямами. Ураження пшениці *P. fluorescens* пов'язане з несприятливими кліматичними умовами, ґрунтовими чинниками і застосуванням агротехнічних засобів, що знижують стійкість рослин і підвищують сприйнятливість до умовно патогенних бактерій. Ming-Ming Yang зі співавторами досліджували можливість біоконтролю ураження кореневої системи пшениці *Pseudomonas fluorescens*, оскільки окрім класичних для роду *Pseudomonas* ознак, таких як синтез пептолітичних ферментів. Даний вид характеризується здатністю до синтезу наявності джгутиків, облігатна аеробність, оптимальна температура росту 29-30⁰С даний фітопатоген синтезує хроматофори: флороглюцин, флороглюцинкарбонову кислоту. Завдяки таким особливостям його досить легко ідентифікувати у рослини [46,49].

Деякі представники роду *Erwinia* є патогенами для певних видів рослин. Наприклад *Erwinia rhapontici* викликає рожевий бактеріоз зерна пшениці, який проявляється у поступовому змінюванні кольору зерна пшениці на рожевий та подальшого його гнитті. Однак дане захворювання досить рідкісне. Частота на перевищує 15-20 %. Ting-Fang Hsieh досліджували властивості, поширення та можливість патогенезу спричиненого *Erwinia rhapontici* у квасолі, гороху та пшениці. Було встановлено, що вірогідність ураження гороху, пшениці та квасолі становила у середньому 19 %, при подальшому патогенезі при вирощуванні у пшениці спостерігається найбільша зона уражень на корені та основному стеблі: 56-60 % та 60-80 % відповідно. *Erwinia rhapontici* – це рід бактерій родини *Enterobacteriaceae*; грам-негативні паличкоподібні бактерії, 1-3 мікрон завдовжки і 0,5-1 мікрон в діаметрі. Рухомі, мають численні джгутики, за типом живлення гетеротрофи, факультативні анаероби [47,49].

Pantoea agglomerans – збудник бактеріальної плямистості пшениці.

Відомо, що *P. agglomerans* може брати участь в інфекційному процесі на пшениці, викликаючи при цьому плямистість листа і лусочок колосу. На

обгортковому листі, листі і стеблах дорослих рослин перед початком цвітіння розвиваються хлорозні плями, згодом навколо них з'являється бура облямівка. На лусочках утворюються бурі плями-штрихи. У природних умовах вражає жито і сою. Tomohiko Matsuzawa зі співавторами досліджували геном, та описували властивості фітопатогенного штаму *Pantoea agglomerans* IG1. За результатами опису збудник відноситься до грам-негативних бактерій родини *Erwiniaceae* розміром 2-2,5 мкм. Не утворює спори. виділяється з рослинних поверхонь, насіння та плодів [48,49].

1.2.2 Методи контролю збудників бактеріальних хвороб

Задля забезпечення ефективного захисту рослин від збудників хвороб необхідно регулярно протягом періоду вегетації обробляти посів розчинами інгібіторів розвитку фітопатогенів. Простіше кажучи антифунгальними та антибактеріальними речовинами. Можуть бути використані розчини елісаторів, зокрема хітозан являється потенційним елісатором і може активно використовуватись у боротьбі із вищезазначеними збудниками. Наприклад, Marcia Gonza 'lez-Teuber зі співавторами пропонують зменшувати захворюваність рослин, ключовими хворобами яких є фітопатогенні грибки завдяки обробці розчинами хітинази та глюканази. Механізм дії таких розчинів полягає у збільшенні проникності клітинної стінки грибів дією ферментів, що зменшує життєздатність грибків та майже повністю скорочує їх кількість на рослині, що в свою чергу на порядок зменшує кількість уражених рослин [50].

Щоб посилити захисні реакції рослин, необхідно створити умови, оптимальні для їх зростання (особливо пов'язані з їх перезимуванням) і несприятливі для життєдіяльності збудників бактеріозів. Зокрема, проводити передпосівні заходи, обробку рослин в період вегетації, дотримуватися умов зберігання урожаю. Оскільки фітопатогенні бактерії передаються через посівний матеріал, треба завчасно перевіряти насіння на наявність збудників захворювання і для посіву використати тільки здорове повноцінне зерно. Рекомендується також висівати стійкі до бактеріозів сорти пшениці, що районують. Насіння пшениці, заражені більш ніж на 20%, відбраковуються і не допускаються до посіву.

Уражений бактеріозом посівний матеріал треба знезаражувати. Для цього застосовують «Вітавакс», що знижує поширеність чорного бактеріозу пшениці на 17-21%, розвиток захворювання на 10,2-12,1%, а поширеність і розвиток базального бактеріозу в два рази в порівнянні з необробленим [50].

Зазвичай фітопатогени поділяють на 2 групи: бактеріальні та грибові, до останніх відносять гриби та дріжджі. *Ashwani Tapwal* зі співавторами пропонує метод контролю та зменшення активності фітопатогенних грибків родів *Alternaria solani*, *Curvularia*, *Rhizoctonia* та *Fusarium* обробкою розчином екстракту рослин *Cannabis sativa*, *Parthenium hysterophorus*, *Urtica dioeca*, *Polystichum squarrosus* з концентрацією екстракту необхідно для найбільш ефективного інгібування 20% [51].

Задля забезпечення ефективного захисту рослин від збудників хвороб необхідно регулярно протягом періоду вегетації обробляти посів розчинами інгібіторів розвитку фітопатогенів. Простіше кажучи антифунгальними та антибактеріальними речовинами. Можуть бути використані розчини еліситорів, зокрема хітозан являється потенційним еліситором і може активно використовуватись у боротьбі із вищезазначеними збудниками. Наприклад, *Marcia Gonza 'lez-Teuber* зі співавторами пропонують зменшувати захворюваність рослин, ключовими хворобами яких є фітопатогенні грибки завдяки обробці розчинами ферментів хітинази та глюканази. Механізм дії таких речовин полягає у збільшенні проникності клітинної стінки грибів дією ферментів, що зменшує життєздатність грибків та майже повністю скорочує їх кількість на рослині, що в свою чергу на порядок зменшує кількість уражених рослин [51].

Jun Yuan, *Waseem Raza* та співавтори досліджували антифунгальну активність штаму *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 та можливість застосування його у якості продуцента антифунгальної композиції. Дослідження показали, що фунгіцидна активність (величина інгібування) росту фітопатогенних грибків на прикладі *F. oxysporum* сягає максимального значення у 33 % при твердофазовому сумісному культивуванні на 60-65 годину культивування. Причиною такої активності є синтез штамом *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6

більше як 36 різних інгібіторних речовин, які легко дифундують і пригнічують ріст грибків. За результатами дослідження можна зробити висновок, що використання культуральної рідини даного штаму бацили в якості фунгіциду може ефективно пригнічувати фітопатогенні стани рослин пов'язані з грибами [52].

Використання мікроорганізмів у біологічних цілях стало ефективною альтернативою для боротьби з збудниками рослин. Існує багато прикладів рецептур із застосуванням бактеріальних або грибкових штамів із застосуванням біоконтролю. Серед них представники роду *Bacillus* - добре відомі виробники антибіотиків. Однак про підвищену потужність виробництва антибіотиків, отриману шляхом прямого мутагенезу диких штамів, рідко повідомлялося у відкритій літературі. Це дослідження стосується мутації штаму *Bacillus subtilis* A47, антагоніста рослинного збудника, щоб отримати поліпшений штам із посиленою здатністю синтезувати метаболіти з антибіотичною активністю. Мутантний штам M40 був отриманий з використанням мутагенного агента акридин оранжевого. Мутантний штам виявляв більш високу антагоністичну активність, ніж дикий тип A47 проти рослинного збудника *Botrytis cinerea* (сіра цвіль), *Ralstonia solanacearum* (бактеріальне в'янення) та *Erwinia carotovora* var. *carotovora* (бактеріальна м'яка гниль). Кінцевою метою було виділення метаболіту антибіотика, що продукується штамом M40, та визначення його хімічних та антибіотичних властивостей. Результати виявили наявність позаклітинного, термостабільного та метаноліторозчинного метаболіту, який поглинав світло при 212 нм. Ці характеристики схожі з описаними для циклічних ліпопептидів антибіотиків, таких як і турини. За результатами дослідження на антимікробну активність виділеного антибіотику на чашках Петрі з використанням тест-культур було встановлено, що зони затримки росту спричинені дією даного антибіотика становили 38-39 мм. [53].

Найбільш простим і не самим ефективним способом захисту рослин і контролю кількості фітопатогенів було внесення органічних добрив – це збільшує концентрацію необхідних поживних речовин для рослин та підвищує їхню

природню стійкість. Згодом більшість органічних добрив замінили на неорганічні солі, що містять необхідні рослинам макро- та мікроелементи.

1.3 Еліситарна активність хітозанів

1.3.1 Напрями застосування хітозанів в рослинництві

Abdelbasset El Hadrami зі співавторами досліджували властивості хітозану різних типів та аналізували сфери застосування його у рослинництві. Було показано, що молекули хітозану проявляють токсичність та гальмують ріст та розвиток грибів. Також активні проти деяких вірусів, бактерій і вищих еукаріотів. Фрагменти молекули хітозану стимулюють певні процеси у рослинах, що призводять до різних захисних реакцій рослин-господарів у відповідь на мікробні інфекції, включаючи накопичення фітоалексинів, патогенрелігіннованих (PR) білків та інгібіторів протеїнази, синтез лігніну та утворення калози. На основі цих та інших властивостей, які допомагають зміцнити захисні властивості, зростає інтерес до їх використання в сільськогосподарських системах для зменшення негативного впливу хвороб на врожайність та якість сільськогосподарських культур [54].

Renato Grilloa зі співавторами присвятив свою роботу дослідженню комплексу: хітозан-трифосфату (хітозан модифікований трьома залишками ортофосфорної кислоти у кожній молекулі мономеру глюкози), з метою застосування його у комплексному препараті включаючи комплекс гербіцид-паракват. Дослідження стосувалося аналізу впливу хітозанового комплексу на паракват та зменшення його токсичності. Досліджували вплив на цитотоксичність, руйнування ДНК та загальну токсичність. Для дослідження токсичності використовували клітини СНО (клітини тканин яєчника китайського хом'яка). За результатами було встановлено, що комплекс хітозан-трифосфату та параквату включно, зменшує токсичність гербіциду параквату на 30 % (виживання клітин) порівняно з контролем. Ефективність руйнування ДНК впливом параквату при застосуванні комплексу зменшується на 40-50% порівняно з контролем [55].

Anderson Espirito з колегами досліджували можливість підвищення ефективності дії гіберилінової кислоти. Підвищували ефективність гіберилінової кислоти сорбцією на наноносії, що складаються з альгінату / хітозану (ALG / CS) та хітозану / триполіфосфату (CS / TPP). Наночастинки були представлені середнім розміром 450 ± 10 нм, середня концентрація наноносіїв становила $1,92 \times 10^{11}$ час/мл, ефективність інкапсуляції гіберилінової кислоти 90-95 %.

Наночастинки-носії були стабільні протягом 60 діб, і дві системи (носій-гіберилінова кислота) відрізнялися за механізмом вивільнення, при цьому вивільнення залежить від таких факторів, як pH і температура. Аналізи біоактивності на *Phaseolus vulgaris* показали, що наночастинки ALG / CS-GA3 були найбільш ефективними з представлених у збільшенні площі листя та рівня хлорофілу та каротиноїдів. Площа листка при обробці комплексом ALG / CS-GA3 збільшувалася на 50-60 %. Рівень хлорофілу та каротиноїдів відповідно збільшувався на 55 % порівняно з контролем. Розроблені системи показали хороший потенціал, забезпечуючи більшу стабільність та ефективність цього рослинного гормону в сільському господарстві [56].

Homero González з колегами досліджували вплив ПВА-Хітозан гідрогелю у формі наночастинок на ріст прищеплених кавунів. Прищеплення – це технологія вирощування, яка дозволяє рослині бути ефективнішим у використанні води та поживних речовин, тоді як інженерія нанорозмірних матеріалів дає можливість використовувати значно менші кількості витратних матеріалів порівняно зі звичайними системами, але мають подібні або переважні ефекти. Виходячи з цього, оцінювали вплив гідрогелю хітозану-полівінілового спирту з поглиненими наночастинами міді (Cs-PVA-nCu) на морфологію листя та ріст рослин при застосуванні до прищеплених сортів кавуна «Ювілейні». Були оцінені індекс стома (SI), довжина стоми (SL) та ширина (SW). Також було зафіксовано первинну довжину стебла та кореня, діаметр стебла, конкретну площу листя та свіжу та суху вагу. Результати дослідження демонструють, що прищеплення індукує зміни до мікроморфології листків, що сприятливо впливає на ріст рослин, прищеплені рослини демонструють кращий вегетативний ріст, незважаючи на їхні

низькі значення SI. Застосування Cs-PVA-nCu на прищеплених виявило збільшення ширини стоми, первинної довжини стебла та довжини кореня на 7%, 8% та 14% відповідно [57].

Marijan Bajić та колеги проводили аналіз властивостей плівок хітозану оброблених рослинними екстрактами одержаними з дуба, хмелю та бурих водоростей. Були оцінені та взаємно порівняні щодо структурних, фізико-хімічних та антибактеріальних властивостей. Переробка хітозану та видобутих сировинних речовин призвела до розробки змішаних плівок із різноманітними фізико-хімічними властивостями. Починаючи від плівки, що містить екстракт дуба, і закінчуючи плівкою, що містить екстракт водоростей, змішані плівки показали тенденції до зростання вмісту води (21,5% - 28,3%), загальної розчинної речовини (23,8% - 28,9%) та подовження при розриві (14,0% - 31,0%), а також тенденції до зменшення міцності на розрив (12,7 МПа - 5,5 МПа), модуля Юнга (230,8 МПа - 19,4 МПа) та загального фенольного вмісту (9,1 мгГАЕ gfilm – 1 - 1,0 мгГАЕ gfilm – 1). Плівки завантажені екстрактами дуба та хмелю, мали покращені оптичні властивості, що відображалось у здатності повністю блокувати пропускання світла на довжинах хвиль нижче 30330nm. Крім того, в тих же плівках виявлено появу зон гальмування, що передбачає антибактеріальну активність проти *Bacillus subtilis* [58].

Для узагальнення тематики наведено *Таблицю 1.2*

Таблиця 1.2.

Узагальнена таблиця застосування хітозанів

Напрямок застосування	Опис напрямку	Препарати для застосування	Література
Стимулювання росту рослин.	Інтенсифікація засвоєння фітогормонів кислоти, що стимулює ріст при її додаванні. Гідрогелі хітозану з наночастинками металів стимулюють збільшення маси рослин.	Препарат «BioNore» фірми TAGROW	[57,58]

Захист від абіотичних факторів.	Плівки на основі хітозану, або хітину з рослинними екстрактами захищають поверхню рослин від інтенсивного сонячного випромінювання та зараження патогенами	Препарат «ВіоНоре» фірми TAGROW	[59]
Підвищення стійкості до нематод.	Хітозан зменшує проникну здатність нематод до органів рослини та утруднює їх ріст та розмноження усередині рослини.	-	[71]
Зниження токсичності гербіцидів	Змішування гербіцидів з розчинами хітозану зменшує їх токсичність.	-	[56]
Захист від збудників хвороб. - бактеріальних збудників - грибкових збудників - вірусів	Хітозан обмежує проникність збудників до рослини, обмежує доступ необхідних речовин для їх розвитку, інтенсифікує захисні процеси рослини. Хітозан порушує механізми реплікації чужорідної ДНК, РНК.	Препарат «ВіоНоре» фірми TAGROW	[55]

1.3.2 Вплив хітозанів на фізіологічно-біохімічні процеси в рослинах

Abdelbasset El Hadrami та колеги досліджували механізм дії хітозану на рослини. В основному дослідження було спрямовано на з'ясування причин антивірусної та антибактеріальної активності хітозану [59].

Було встановлено, що хітозан перешкоджає реплікації чужорідних нуклеїнових кислот, що призводить до зупинки множення та поширення паразитарних мікроорганізмів у клітинах рослини. Це може бути пов'язано з тим, що при проникненні в тканини рослин хітозан щільно зв'язує нуклеїнові кислоти та провокує різноманітні пошкодження і гальмування росту. Наприклад, селективне інгібування може інактивувати синтез мРНК. Механізм активності, проти грибів та бактерій на сьогодні точно не встановлений. Є припущення, що в

основні інгібувальної дії лежить обмеження доступності вільних мікроелементів для патогенів самим хітозаном, що інгібує їх ріст. Також формування фізичних бар'єрів у вигляді плівок через які патогени не можуть розповсюджуватися на здорові тканини рослин [59].

Palmeira-de-Oliveira зі співавторами досліджувала механізм антигрибкової активності хітозану, на основі тест-організмів: дріжджів *C. albicans* *C. glabrata* *C. tropicalis*. Дослідження проводили при обробці клітин гідрогелем, що містив хітозан з подальшою витримкою клітин у певних умовах та аналізом, використовуючи мікробіологічні та фізичні методи аналізу цілісності та життєздатності клітин. За результатами було встановлено, що після обробки більше 85 % клітин загинуло через пошкодження мембрани, решта (< 15%) без пошкодження мембрани, що свідчить про спрямовану дію хітозану на цитоплазматичну мембрану дріжджів [60].

Mounia Arkoun зі співавторами досліджувала антибактеріальну властивість хітозану та механізм його дії на бактерії *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* *Serovar Typhimurium*, *Staphylococci saureus*. Хітозан використовували у вигляді наноплівки. Сприйнятливість до штаму бактерії оцінювали з точки зору бактеріального типу, гідрофобності клітинної поверхні та патогенності. Результати дослідження показали, що антибактеріальна дія наноплівки хітозану залежить від протонації аміногруп у складі клітинної стінки бактерій, незалежно від їх типу. Результати також вказують на те, що бактеріальна чутливість не залежала від того Грам+ бактерія чи Грам-. Порядок зменшення ступеня чутливості був наступним: *E.coli* > *L.innocua* > *S.aureus* > *S. Typhimurium* [61].

Вплив різних концентрацій хітозану при обробці культури пшениці досліджував Ruixin Liab зі співавторами. У даному дослідженні використовували хітозан у формі наночастинок, а досліджували вплив на проростання та ріст розсади пшениці (*Triticum aestivum* L.). Для обробки використовували різні концентарції хітозану у вигляді наночастинок (10-100 мкг/мл).

Було показано, що хітозан у формі наночастинок стимулював проростання пшениці при концентрації 50 мкг/мл. Крім того було встановлено, що

застосування хітозану стимулювало експресію гена, пов'язаного з синтезом ауксинів пшениці, прискорював біосинтез та транспортування індол-3-оцтової кислоти та знижував активність IAA-оксидази, що призводило до збільшення концентрації індол-оцтової кислоти в пагонах та коренях пшениці. Отримані результати свідчать про те, що наночастинки хітозану мають найбільший вплив на проростання насіння та ріст розсади пшениці при концентрації 50 мкг/мл [79].

Mosaddiqur Rahman зі співавторами досліджували вплив хітозану на збільшення врожайності полуниці, що проявлялася у збільшенні маси плодів відносно рослин, які не обробляли розчином хітозану. Плоди оброблені хітозаном, мали значно більшу масу (у 2,5 рази порівняно з контролем). При аналізі плодів на вміст типових речовин, таких як каротиноїди, антоціани, флавоноїди та ін. було встановлено, що їх вміст у плодах рослин, які були оброблені хітозаном був вищим порівняно з необробленими рослинами (контролем). Загальна антиоксидантна активність у рослинах, оброблених хітозаном, також була значно вищою (в 2 рази), ніж у контрольних рослин. Подальше дослідження щодо механізмів, пов'язаних із посиленням росту, урожаю викликаного хітозаном у полуниці, необхідне для використання розробки у промислових масштабах [80].

Xiaoqian Zhang, Kecheng з колегами досліджували вплив олігомерів хітозану (гідролізованого полімерного хітозану молекули якого містять від 2 до 12 залишків глюкози) з назвами GlcN 6, GlcN 7 на метаболізм у клітинах пшениці. Ними було описано ефект, суть якого виявлялася у покращенні ростових показників пшениці, таких як швидкість росту та кількість хворих форм рослин. Обробка розчином який містить хітозанові фрагменти GlcN 6, GlcN 7 посилювали експресію генів, що відповідали за синтез нітрат-редуктази та транс-амінази та підвищували їх активність відповідно на 53 та 47 % відповідно до контрольних рослин. Це свою чергу збільшувало концентрацію вільного амонію в клітинах (який утворювався з нітрату). Підвищення концентрації амонію впливало на збільшення концентрації ключових амінокислот таких як аспарат, глутамат. Таким чином збільшувалася швидкість росту та зменшувався відсоток хворих рослин у обробленій серії пшениці [81].

1.3.3 Застосування хітозанів для захисту рослин від збудників мікроміцетних хвороб

Е. R. Kenawy зі співавторами модифікували хітозан за допомогою хімічної модифікації ефірами ароматичних сполук та досліджували антиімкробні властивості одержаного модифікованого ароматичними ефірами хітозану. В результаті модифікації різними ефірами ароматичних сполук були одержані різні модифікації хітозану. Всі модифіковані хітозани досліджували на фунгіцидну активність. Для перевірки були обрані наступні тест-культури *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus* та *Aspergillus niger*. Антимікробна активність модифікованого хітозану демонструє інгібуючу дію. Діаметри зон затримки росту становили 11–26 мм відповідно до різних тест-культур.

Як правило, потенціал інгібування модифікованого хітозану змінювався залежно від одержаного модифікованого хітозану та тест-культури на якій випробовувалася фунгіцидна активність [62].

М. Sathiyabama, G. Akila and R. Einstein Charles досліджували фунгіцидну дію хітозану, по відношенню до патогенних грибків, які уражають томати, зокрема *Alternaria solani* та *Fusarium oxysporum* фітопатогенного грибка, що спричиняє псування та гниття томатів у процесі росту. Антифунгальну активність досліджували за допомогою методу дифузії в агар, що полягає у додаванні у вирізані лунки на засіяному середовищі, розчину хітозану. Були протестовані розчини хітозану з концентраціями: 3-6 мг/мл. Час експозиції 10 діб при 28 °С.

Найбільші радіальні зони затримки росту в розрізі становили 30мм із використанням концентрації хітозану у 5 мг/мл.

Другий тип дослідження був орієнтований на глибинне культивування фітопатогенів на контрольному рідкому середовищі і на середовищі з додаванням еквівалентної кількості розчину хітозану тієї ж концентрації. В результаті виміру концентрації сухої біомаси відповідно контролю та експериментального зразку було встановлено, що концентрація біомаси фітопатогена, : *P. Arachidis* становила 2 мг/мл, у контроль відповідно 7 мг/мл, щог свідчить про зменшення концентрації біомаси у 3,5 рази [63].

Автори A.Kheiri, S.A.Moosawi Jorf досліджували активність хітозану, щодо *Fusarium graminearum* – фітопатогенного грибка пшениці (викликає фузаріоз). Хітозан використовували у формі наночастинок розміром від 300 до 500 нм. Експеримент проводився у польових умовах з молодими паростками пшениці, які оброблювали експериментальною суспензією яка містила наночастинок хітозану та контрольний розчин, що не містив хітозану. Після обробки термін експозиції тривав 28 днів. У результаті досліджень було показано, що рівень прогресу фузаріозу нижчий у 2,5 рази в оборобленій частині паростків пшениці відносно контрольної [64].

Е.В. Порова разом із N.S. Domninab досліджували вплив модифікованого ваніліном хітозану на фітопатогенний грибок *C. sativus* який викликає темно-коричневу плямисту хворобу пшениці. Динаміка цієї хвороби збільшує концентрацію перекису водню, через інгібування синтезу пероксидази в клітинах пшениці. Серію досліджень по впливу модифікованого хітозану на збудника цієї хвороби проводили упродовж 3-4 днів (час експозиції). Досліджено, що при обробці пшениці ваніліном збільшується резистентність до коричнево-плямистої хвороби пшениці на 24-40%. Встановлено, що після обробки зараженої патогеном *C. sativus* пшениці, хітозаном та хітозано-ваніліновою сумішшю та витримки часу експозиції у 4 дні відсоток хворих рослин становив: 20% для чистого хітозану та 9% для ваніліново-хітозанової суміші. Відповідно ефективність пригнічення патогену комплексом ванілін-хітозан вища у 2 рази [65].

У роботі A. Kheiri, S.A. Moosawi було описано активність хітозану проти збудника фузаріозу пшениці *Fusarium graminearum*.

Хвороба фізаріозу (FHB), – одне з найбільш поширених захворювань пшениці у вологих та теплих регіонах. Це захворювання значно знижує врожайність через псування насіння. Метою даної роботи була оцінка можливості контролю FHB за допомогою хітозану (CS) та наночастинок хітозану (CS / NP). In vitro застосування різних концентрацій CS та CS/NP показало значне пригнічення як радіального міцеліального росту, так і кількості колоній, що утворюються проти *F.graminearum*. Застосування концентрації CS та CS / NP в кількості 1000 та

5000 ppm викликало максимальне пригнічення радіального міцеліального зростання порівняно з контрольним. Мікроскопічне дослідження обробленого *F. graminearum* за допомогою CS та CS / NP показало дегідратацію та деформацію в міцеліальному шарі, і деякі гіфи були зруйновані. Максимальна кількість відсоткових скорочень колоній спостерігалася в концентрації 5000 ppm як CS, так і CS / NP. Для перевірки впливу CS та CS / NP на проростання спор, для інкубації на 24 години використовували чотири концентрації. 24-годинна інкубація спор *F. graminearum* з 5000 ppm розчином CS значно зменшила кількість проростаючих спор. У парникових випробуваннях відсоток кількості захворювання був низьким, коли застосовували CS та CS / NP перед щепленням грибів на рослинах та концентрацією 1000 ppm. Світлова мікроскопія показала, що міцелій проникає в клітини через стому і переноситься в інші клітини через клітинну стінку або плазмодесматом. Зростання міцелію спричинило конідії в клітинах, але CS і CS / NP запобігли його розповсюдженню. Результати показали, що CS та CS / NP можуть стати корисним біологічним пестицидом для боротьби з FHB [66].

Vanessa G. L. зі співавторами досліджувала комбінований вплив активності хітозану з більш ніж 70% деацетилювання та води на ріст та вироблення мікотоксину у фітопатогенів *F. proliferatum* та *F. verticillioides*, що викликають фузаріози рослин, зокрема кукурудзи та пшениці.

Результати показали, що низькомолекулярний хітозан з більш ніж 70% ступенем деацетилювання при найменшій застосованій дозі (0,5 мг/г) зміг знизити кількість утворених дезоксиніваленолу та фумонізину (мікотоксинів) в інфікованих зернах кукурудзи та пшениці. Темпи росту *F. graminearum* також знижувалися при найнижчій застосованій дозі хітозану (0,5 мг/г), тоді як темпи росту *F. verticillioides* та *F. proliferatum* знижувались у 2 рази при найвищій застосованій дозі хітозану (2 мг/г) [50].

L. R. Gunupuru, J., S. Patel зі співавторами досліджували вплив біопрепарату на основі комбінації хітозану та екстракту коричневої макроводорості *Ascophyllum nodosum* на протікання патогенезу інфікованих фузаріозом паростків пшениці та дорослих рослин. За результатами дослідження було встановлено, що

площа сегментів зараження на листі пшениці патогеном *F.graminearum* зменшувалася при обробці комплексом хітозану та екстракту водорості (співвідношення екстракт 15 мл + хітозан 100 мкл) у 5 разів ($0,003 \text{ см}^3$) у порівнянні з контролем ($0,0015 \text{ см}^3$), та порівняно з обробкою окремо хітозаном та екстрактом водорості, площа зараження була зменшена 30 % та 35 % відповідно. Кількість конідій утворених грибом зменшувалася при обробці комбінованим біопрепаратом на 84% [51].

А. Kheiri з колегами проводив дослідження, основна мета якого полягала у підготовці препарату на основі хітозану (ХЗ) та наночастинок хітозану (НЧ) для оцінки їх протигрибкової та окислювальної активності. ХЗ / НЧ готували на основі іонного гелеутворення з аніонами триполіфосфату (TPP) за допомогою центрифугування та зміни рН та випробування протигрибкової активності хітозану та його наночастинок на тест-культурі *Fusarium graminearum* in vitro. З результатами дослідження було виявлено, що максимальний відсоток зменшення приросту біомаси гриба становив 68,18% при обробці хітозаном та 77,5 % при обробці наночастинками хітозану [52].

Benhamou N. проводив дослідження, спрямовані на вивчення ефективності застосування комбінації хітозану та мікопаразиту *Verticillium lecanii* щодо пригнічення основного патогену, що викликає хворобу зеленої плісняви у цитрусових – *Penicillium digitatum*. У ході дослідження було показано, що обробка суспензією, що містить *V. lecanii* та окремо розчином хітозану зменшує кількість міцеліальних клітин гриба у цитрусових заражених *Penicillium digitatum* у середньому на 90 % за час експозиції упродовж 7 днів порівняно з контролем. У порівнянні між собою ефективнішою виявилась дія хітозану (на 10-15 %) ніж дія зумовлена обробкою суспензією з *Verticillium lecanii* [70].

В.А. Циганкова та співавтори розглядали властивість хітозану підвищувати стійкість рослин, зокрема пшениці, картоплі та огірків до більшості фітопатогенів. Механізм індукції стійкості сильно пов'язаний з генетичним апаратом клітин рослини, зокрема з РНК. Як фітопатогени були взяті представники нематод: *Meloidogyne incognita*, що уражує широке коло важливих

для сільського господарства культур, та *Ditylenchus destructor* що пошкоджує бульби картоплі. Дослідження проводили використовуючи суміш хітозану з культуральною рідиною *Streptomyces avermitilis* УКІ Ас-2179 та хімічні препарати аналогічної сфери застосування для порівняння ефективності. Встановлено, що в порівнянні з хімічними препаратами тестова суміш дає на 10 % вищу врожайність та на 15 % ефективніше посилює захисні механізми рослин відповідно щодо хімічних препаратів. Ступінь ефективності дії визначали методом гібридизації контрольної мРНК та специфічної до неї si/miРНК, що синтезується у клітинах картоплі, пшениці та огірків внаслідок порушення обміну речовин завдяки наявності у рослинах великої кількості фітопатогенів *M. Incognita*, *Diethylenchus destructa*. Результати, щодо антагонізму на агаризованих середовищах: діаметри зон затримки росту становили від 30 до 35 мм. Рівень гомології miРНК, та м РНК після обробкою культуральною рідиною *Streptomyces avermitilis* УКІ Ас-2179 знижувався на 6-10 % [71].

1.3.4 Застосування хітозанів для захисту рослин від збудників бактеріальних хвороб

Rao-Chi Chien зі співавторами досліджували дію хітозану грибного та тваринного походження на фітопатогени. Встановлено найефективнішу концентрацію хітозану для інгібування фітопатогенних бактерій у 0,5 г/л. Найбільші зони затримки росту становили 16-28 мм. Як виявилось, хітозан грибного походження ефективніше пригнічує фітопатогени на 5-8 % ніж хітозан тваринного походження [72].

Amira M. Embaby з колегами описує метод одержання амінолігосахаридів із захисними властивостями. Він полягає у культивуванні *Aspergillus sp. Flavi* EGY1 DSM 101520 на середовищі з хітозаном, в результаті виділення у культуральну рідину специфічної хітинази, що розщеплює хітозан до олігомерів. Оптимальні температура та тривалість культивування: 25 °C та 72-96 годин, концентрація хітозану найбільш оптимальна для утворення олігомерів – 0,68 %. При ферментації було одержано максимальну концентрацію олігомерів у розмірі 5,34 г/л [73].

Jin Sung Won зі співавторами досліджував ефект від обробки рослин томату «Черрі» комплексом хітозану та екстракту насіння грейпфрукта. Даний комплекс був розроблений для попередження інвазії сальмонелли через томати до травного тракту людини і розвитку патогенного стану спричиненого сальмонелою, тобто ефективність комплексу вивчали у розрізі пригнічення сальмонелли у томатах під час збіріння. Для обробки томатів використовували наступні концентрації комплексу у розчині : 0.5%, 0.7%, 1.0%, та 1.2% . Томати обробляли суспензією з сальмонелою з концентрацією клітин $1,6 \log \text{ КУО/мл}$. У результаті дослідження було встановлено, що концентарція сальмонелли при обробці комплексом хітозану та екстрактом з насіння грейпфрукту зменшувалася до 40 % порівняно з контролем. Була оцінена ефективність дії хітозанового комплексу в залежності від концентрацій і найвищих показників активність досягала при концентрації комплексу в 1,2 %, у порівнянні з 0,5 % 1,2 % розчин був на 15 % ефективніший, а концентрації 0,7 та 1,0 % мали ефективність на 5-7 % меншу за 1,2 % розчин [74].

Yu-Ying Fu зі співавторами досліджували ефективність антимікробної дії ліпосом, що містять суміш хітозану та «поліміксину В» на біоплівку патогену *Acinetobacter baumannii*. Ефективність дії нового комплексу порівнювали з дією ультразвуку, обробкою «поліміксином В» з хітозаном та поліміксином без хітозану. У результаті було встановлено, що найвищою ефективністю щодо видалення біоплівки володіє ліпосомний комплекс хітозану і поліміксину (маса біоплівки зменшується на 40 % порівняно з контролем, відносно звичайної обробки поліміксином новий комплекс ефективніший на 30 %, тобто сам по собі поліміксин не діє на біоплівку. Для збільшення ефективності дії поліміксину та хітозаново-поліміксино-ліпосомного комплексу додавали обробку ультразвуком, відповідно маса біоплівки зменшувалася на 75 та 80 % відповідно [75].

Abeer N.Shehata та колеги досліджували антифунгальну дію олігосахаридів утворених з хітозану та хітинази синтезованої *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988. Хітиназу синтезовану продуцентом ізолювали, очищали, визначали активність та оброблювали нею тест-культури таких мікроорганізмів: *B. subtilis*,

Staphylococcus aureus, *Lactobacillus*, *cereus*, *E. coli*, *F.solani* . Олігосахариди хітозану препарували готуючи розчин з концентрацією 40 мкг/ мл та оброблювали ті ж тест-культури. Час експозиції становив 24 години. Результати дослідження показали, що олігосахариди проявляли пригнічуючу здатність, щодо всіх тест-культур окрім *E.coli* : зони затримки росту по діаметральному розміру становили від 19 до 22 мм. Хітиназа проявляє активність тільки щодо, *F.solani* – зона затримки росту становила 24 мм у діаметрі [76].

Laidson P. Gomes, Cristina T. Andrade зі співавторами досліджували інгібувальну здатність хітозану, щодо бактерій на прикладі *E.coli*. В основному дослідження стосувалося визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) хітозану різних модифікацій: CS-MMW, CS-MMW30, CS-LMW, CS-LMW30. За результатами було оцінене числове значення МІК. Вимір МІК проводили при 2-х значеннях рН 5 та 7. Мінімальних значень МІК досягала при рН 5. Найменше значення МІК мала модифікація хітозану CS-LMW30 у 0,2 мг/мл, а максимальну мав зразок CS-MMW – 0,4 мг/мл [77].

Авторами Коломієць Ю.В. та Григорюк П .В було описано дію біоперпарату на основі культуральної рідини яка містить метаболіти *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас2179 зокрема хітозан та авермектини на збудники хвороб рослин ряду томатів. Для імітації природніх умов антагонізму, щодо фітопатогенів використовували метод агарових блоків: *Xanthomonas vesicatori*, *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. Tomato. Зони затримки росту при обробці штамів фітопатогенних бактерій сягали 50-60 мм у діаметрі [78].

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ ПРОДУКТУ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

У даному курсовому проєкті пропонується використання біомаси спорових бактерій *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 разом із хітозанами у складі препарату для захисту зернових культур з фунгіцидною та антимікробною активністю.

2.1 Потреба у цільовому продукті

Забезпечення стійких урожаїв сільськогосподарських культур неможливе без обробки рослин, яка сприяє підвищенню якості посівного матеріалу, створенню умов для поліпшення зростання і розвитку рослин, а також передбачає знезараження насіння.

Для оздоровлення та активізації ростових процесів у них в основному використовуються такі прийоми: обробка фунгіцидами; обробка насіння плівкоутворюючими препаратами з використанням рідких комплексних препаратів; протравлення насіння препаратами з використанням натрієвої солі (NaNO_3) і т. д. Ці прийоми погіршують родючість ґрунту та якість наземної і підземної води, отруюють їжу і викликають зростання захворюваності, тобто вони не є екологічно чистими способами [79].

Не випадково в останній час звертається значна увага на нові методи ведення сільського господарства, які передбачають широке впровадження біологічних препаратів при вирощуванні культурних рослин і часткову відмову від хімічних засобів у землеробстві [80]. Приклади таких препаратів наведені в таблиці 2.1.

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ				Літ.		Арк.	Акрушів
Розроб.	Танана											
Перевір.	Буценко										37	
Консультант									38 Кафедра БТМ			
Н. Контр.												
Затверд.	Пирог Т.П.											

Хімічні препарати широко використовують зараз незважаючи, що вони не є екологічно доцільними, а навпаки погіршують стан довкілля. Зробивши висновок можна сказати, що застосування мінеральних добрив може стати екологічно небезпечним, а високі витрати на них роблять виробництво рослинницької продукції неконкурентоспроможним. Саме ці два фактори в умовах ринкових відносин стають вирішальними і визначають актуальність проблеми. Тому в даний час через високу ціну і негативний вплив мінеральних препаратів як на навколишнє середовище, так і на саму продукцію все більшої актуальності набувають екологічно чисті препарати - мікробіологічні, які дозволяють зменшити собівартість продукції при одночасному збільшенні урожайності з умовою збереження родючості ґрунту і навколишнього середовища [80].

Таблиця 2.1

Препарати для обробки зернових культур

Препарат	Діючий агент	Кількість препарату для обробки зернових для засіву 1 га поля, л*	Вартість за 1 л препарату, грн
Мікробні препарати			
Різоагрін	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	0,5	375
Флавобактерин	<i>Flavobacterium</i> sp.	0,7	300
Бактофит Біофунгіцид	<i>Bacillus subtilis</i>	2	140
НИВА 2 Б	<i>P. aureofaciens</i>	0,5	140
Хімічні препарати			
Азоксин	Азоксибин	0,8	834
Колосаль	Тебуконазол	0,5	504

Примітка: * - для засіву 1 га поля використовується близько 320 кг насінин зернових культур;

Пшениця належить до найбільш цінних і високоврожайних зернових культур. Вона за посівними площами і використанням посідає перше місце серед зернових культур у світі. Зерно пшениці багате на білки (14-18%) і клейковину

(25-28%), тому широко використовується в хлібопекарській і кондитерській промисловостях, а також для виробництва крупи, макаронів, вермішелі та ін-ших продуктів. Із пшениці також отримують крохмаль, спирт, клейковину, а пшеничні висівки є висококонцентрованим кормом для всіх видів сільськогосподарських тварин. У деяких районах України пшеницю озиму використовують на зелений корм. Бактеріальні хвороби становлять небезпеку при вирощуванні пшениці, а в Україні поширено багато небезпечних збудників таких хвороб з якими необхідно активно боротися щоб уникнути можливих епіфітотій у майбутньому [81].

У таблиці 1.1. представлено список розповсюджених у світі бактеріальних хвороб пшениці разом зі збудниками, які їх викликають.

Серед усіх культур для яких він може використовуватися я обрав саме зернові культури (ячмінь, пшениця, овес), тому що в них найбільша потреба і при розрахунку потужностей виробництва саме на ці культури припадає найбільша площі полів і відповідно найбільше препаратів для обробки.

Вся посівна площа сільськогосподарських культур в Україні під урожай у 2020 році складала 24,4 млн га. Зерновими культурами було засіяно 14,3 млн га (53% до всіх посівних площ). З них: ярі зернові та зернобобові культури (з кукурудзою) - 7,17 млн га, озимі на зерно – 7,15 млн га. Для розрахунку потреби в препараті я розглядаю Київську область, на яку припадають посівні площі розміром 999 тис. га станом на 2020 рік. З них на зернові культури припадає 260 тис. га [82, 83].

Більшість фермерів вже почало переходити на мікробні препарати для захисту рослин, але досі є частина які використовують хімічні, тому прийmemo що хімічні препарати для захисту рослин і мікробні (на основі мікроорганізмів) порівну поділенні та використовуються. Приймемо, що з 260 тис. га мікробними препаратами обробляється половина (50%), тобто – 130 тис. га. Тоді якщо всі препарати які я порівнюю на основі мікроорганізмів використовують в однакових кількостях прийmemo, що доля нашого препарату складатиме 10 % (існують ще препарати окрім представлених в таблиці). Згідно цього нашим препаратом обробляється 13 тис. га полів.

В препараті Бактофіт який ми розглядаємо як приклад приблизно 10-11 г/л біомаси *Bacillus subtilis* [84]. Так як кількість Бактофіту для обробки пшениці на площі 1 га поля потрібно 2 л, то в цьому об'ємі знаходиться 22 г біомаси. Наш препарат розрахований до використання у сухій формі задля збільшення терміну зберігання, тобто препарат буде складатися з біомаси, хітозану та допоміжних речовин (консервант, емульгатор). Розподіл зернових та витрату препарату показано в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Витрати нашого препарату для обробки зернових на прикладі Київської області [83]

Сільськогосподарська культура	Площі посівів, тис. га	Кількість сухого препарату для обробки зернових на 1 га поля, г	Необхідний об'єм препарату для річної обробки, кг
Пшениця	7,8	22	171,6
Ячмінь	3,9		85,8
Овес	1,3		28,6
Разом	286 кг		

Отже, препаратом будемо обробляти вегетуючі рослини один раз та загальна кількість препарату, необхідна для обробки зернових культур на прикладі Київської області становить 286 кг біомаси *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 для приготування потрібної кількості препарату.

2.2 Розрахунок потужності виробництва

Кількість культуральної рідини, необхідної для отримання 286 кг біомаси становить:

$$11 \text{ г/л біомаси } Bacillus amyloliquefaciens \text{ ВКПМ В-11008} - 1 \text{ л}$$

$$286000 \text{ г} - X \text{ л}$$

$$X = 26000 \text{ л культуральної рідини}$$

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Даний препарат на основі висушеної біомаси мікроорганізмів може зберігатися при низькій температурі (3-5°C) до 1-1,5 року. Тому 286 кг біомаси ми

маємо отримати за 110 днів. Враховуючи цикл роботи ферментера ($T_{\text{цф}}$), який становить 30 год (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 24 год) [85], необхідну потужність підприємства ($G = 286$ кг) та кількість трудоднів ($T_d = 110$), то кількість продукту на добу, л/добу:

$$G_{\text{пд}} = \frac{G}{T_g} = \frac{26000}{110} = 237$$

Кількість продукту за цикл ($V_{\text{крп}}$) становитиме:

$$V_{\text{крп}} = V_d \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 237 \cdot 30 / 24 = 296 \text{ л/цикл}$$

Кількість ферментацій (циклів) на 110 днів:

$$N_{\text{цк}} = \frac{G}{V_{\text{крп}}} = \frac{26000}{296} = 88$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат при виділенні $E_{\text{св}}$ (що складають при виділенні біомаси з культуральної рідини 6% + сушіння – 3% + ситовий аналіз 1% + фасування – 2%):

$$V_{\text{кр}} = K_1 \cdot V_{\text{крп}} \cdot \text{СР}_{\text{гп}} / (1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \cdot 296 \cdot 0,92 / (1 - 0,13) = 344 \text{ л},$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій, $\text{СР}_{\text{гп}}$ – масова частка сухих речовин в готовому продукті.

Геометричний об'єм ферментера для отримання 344 л культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{крп}} / K_{\text{зап}} = 344 / 0,6 = 573 \text{ л},$$

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

Підбираємо найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{\text{ф}} = 600$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{кр}} / V_{\text{ф}} = 344 / 600 = 0,57, \text{ що не перевищує задане значення.}$$

2.3 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{\text{крп}} = 344$ л культуральної рідини.

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

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{крц}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 344 / (1 - 0,1) = 382 \text{ л},$$

де $E_{\text{ф}}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 382 \text{ л}$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\text{ф.1}} = 382 / 0,60 = 636,7 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 600 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 382 / 600 = 0,64.$$

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

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

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 382 / (1 + 0,1) = 350 \text{ л},$$

де $X_{\text{ф}}$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 382 - 347,3 = 34,7 \text{ л}.$$

Для одержання 34,7 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 34,7 / (1 - 0,1) = 38,56 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 38,56 / 0,6 = 64,27 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 60 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 38,56 / 60 = 0,64.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 38,56 / (1 + 0,1) = 35,06 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 38,56 - 35,06 = 3,5 \text{ л.}$$

Для одержання 3,5 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті крапливиносy через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{па}}) = 3,5 / (1 - 0,1) = 3,89 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 3,89 / 0,6 = 6,48 \text{ л.}$ Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 6 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сін}} = 3,89 / 6 = 0,65.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 3,89 / (1 + 0,1) = 3,54 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 3,89 - 3,54 = 0,35 \text{ л.}$$

Для одержання 0,35 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм2}} / V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}} = 350 / 750 \times 0,2 \approx 3 \text{ шт.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 3 качалочні колби.

Отже, для одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 600 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи.

Отже, провівши розрахунки, встановлено, що для біосинтезу біомаси *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 приймаємо до встановлення один інокулятор об'ємом 6 л, один інокулятор об'ємом 60 л та виробничий ферментер об'ємом 600 л.

РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

3.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування

Вже наприкінці 19 століття корисний ефект від застосування бульбочкових бактерій при вирощуванні бобових культур був добре відомий і дослідників хвилювало питання, чи можна знайти схожі системи у захисту рослин, що складають переважну більшість культурних рослин, з іншими симбіотичними мікроорганізмами. Перші роботи по захисту не бобових рослин бактеріями родів *Bacillus* та *Azotobacter* були розпочаті наприкінці 19 століття [86].

Одним з найбільш ефективних засобів захисту рослин від хвороб є передпосівна обробка рослин, що дає змогу знешкодити збудників хвороб, які передаються через насіннєвий матеріал, захистити насіння і проростки від пліснявіння в ґрунтових умовах, знизити ураження сходів кореневими гнилями; послабити негативний вплив пошкоджень та травмування на якість посівного матеріалу; стимулювати ріст і розвиток рослин.

Використання мікроорганізмів у біологічних цілях стало ефективною альтернативою для боротьби з збудниками рослин. Протягом останніх двох десятиліть використання бактерій для росту рослин для сталого сільського господарства значно зросла в різних частинах світу. До тих відносяться такі, які є вільними від життя, ті, які утворюють специфічні симбіотичні відносини з рослинами (наприклад, *Rhizobia* spp. і *Frankia* spp.), Тому використання *Bacillus* для боротьби з патогенами рослин вважається більш безпечною та стійкою стратегією безпечної та прибуткової сільськогосподарської продуктивності. Засоби біоконтролю на основі *Bacillus* відіграють фундаментальну роль у галузі біопестицидів. Багато з них довели свою ефективність проти широкого кола рослинних патогенів.

НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ

					РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Танана			Кафедра БТМ		
Перевір.		Буценко					
Консультант							
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					
					Літ.	Арк.	Акрушів
						45	45

Вони характеризуються як промотори росту рослин, індуктори системної резистентності та використовуються для виробництва широкого спектру антимікробних сполук (ліпопептидів, антибіотиків та ферментів) та конкурентів факторів росту (простору та поживних речовин) з іншими патогенними мікроорганізмами шляхом колонізації.

Bacillus виробляють різноманітні сполуки, які можна використовувати для боротьби з широким колом шкідників рослин. Стабільний ріст і розвиток біологічного агента в польових умовах все ще залишається проблемою через несприятливі екологічні умови. Препарати на основі бактерій при використанні з іншими синтетичними хімічними пестицидами можуть бути шкідливими для живих бактерій. Важливим є також препарат, який може збільшити термін придатності бактеріального продукту під час зберігання, транспортування, а також під час польового застосування.

Різноманітність штамів *Bacillus* забезпечує захист рослин різними способами. Індукована системою стійкість та стимулювання росту рослин відіграють основну роль у біологічному захисті рослин. Для ефективної боротьби з шкідниками рослин та хворобами розроблено велику кількість штамів *Bacillus*.

В якості основи нашого препарату було обрано бактерії *Bacillus amyloliquefaciens* за рахунок широкого спектру високої антагоністичної активності до різних фітопатогенних мікроміцетів і бактерій; висока продуктивність культур і технологічність у виробничих умовах; високий рівень активності синтезованих ферментів.

Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей одержання біопрепарату для обробки зернових культур з використанням різних продуцентів наведено у *табл 3.1*. Ці дані засвідчують, що для всіх штамів використовують стадійний спосіб біосинтезу, тому що препарат і є біомаса бактерій.

Найбільший показник біомаси у штаму *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 – 11 г/л [87] та *B. amyloliquefaciens* ИМВ В-7100 – 10 г/л [88]. Найнижча біомаса утворюється при культивуванні *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д, яка дорівнює 4 г/л [89].

При порівнянні даних продуцентів тривалість культивування варіюється від 24 до 48 годин. Дана характеристика є дуже важливою для виробничого процесу, бо дозволяє заощадити ресурси. Можна сказати, що найбільш менша тривалість у продуценту *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008, яка становить 24 годин.

Таблиця 3.1

Особливості одержання біопрепарату для обробки зернових культур на основі *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008, *B. amyloliquefaciens* ИМВ В-7100, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація Біомаси, г/л	Особливості біосинтезу	Використана література, рік
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ВКПМ В-11008	Пшеничні висівки – 40; Кукурудзяний екстракт – 0,5; KH ₂ PO ₄ – 0,5; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 1,85; CaCO ₃ – 1	24	11	Культивування при температурі 28 °С; рН= 7 – 7,2.	RU 2478290C2. Биопрепарат для стимуляции роста и защиты растений от болезней, повышения урожайности и почвенного плодородия / Зульфира Ю.С., Наталия Г.З. – Оpubл. 04.10.2013.
<i>B. amyloliquefaciens</i> ИМВ В-7100	Глюкоза – 20; KH ₂ PO ₄ – 9,6; (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 4,75; Цитрат натрія – 1,29	24	10	Культивування при температурі 37 °С; рН= 6,5-7.	И.В. Драгатов, Н.О. Леонова, С.В. Лапа, Л.В. Авдеева Экзометаболиты штамма <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ИМВ В-7100, определяющие его фитостимулирующую активность. Физиология растений и генетика. 2014, 46 (6): 516-524.

<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> БІМ В-439Д	Меляса – 30; K_2HPO_4 – 7; KH_2PO_4 – 3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; Цитрат натрія – 0,5; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0	48	7,5	Культивування при температурі 28-30 °C; pH= 7 – 7,2.	Л. В. Авдеева, И. В. Драговоз, Ю. В. Корж, Н. О. Леонова, Г. А. Иутинская, А. В. Бережная, В. Н. Купцов, М. Н. Мандрик, Э. И. Коломиец Антагонистическая активность штаммов <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> ИМВ В- 7404 и БІМ В-439Д по отношению к фитопатогенным бактериям и микромицетам. <i>Мікроб.</i> <i>журнал.</i> 2014, 76 (6): 27-33.
---	---	----	-----	---	--

Проте така порівняльна характеристика технологічного процесу є недостатньою, тому на наступному етапі вибору біологічного агента порівнювали вартість поживних середовищ, використовуваних усіма продуцентами (табл. 3.2).

Середовище для культивування *B. amyloliquefaciens* ИМВ В-7100 коштує 2 грн за літр, а для *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 найбільш дешевим є середовище за 1,07 грн за літр. Дані, наведені у табл. 3.2, засвідчують, що середовище для культивування *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 є найбільш дешевим.

Таблиця 3.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008, *B. amyloliquefaciens* ИМВ В-7100, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн./кг	Вартість компонента (грн.) на 1 л середовища	Джерело інформації *
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> БИМ В-439Д	Меляса бурякова, 30	20	0,6	[2]
	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 1,0	12	0,02	[2]
	K ₂ HPO ₄ , 7	86,4	0,6	[2]
	KH ₂ PO ₄ , 3	74	0,25	[2]
	Цитрат натрія, 0,5	105	0,06	[2]
	MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,1	65	0,02	[2]
Вартість 1 л середовища – 1,55 грн				
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ВКПМ В-11008	Пшеничні висівки – 40	8	0,32	[2]
	Кукурудзяний екстракт – 0,5	107,10	0,5	[1]
	KH ₂ PO ₄ – 0,5	74	0,03	[2]
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 1,85	65	0,033	[2]
	CaCO ₃ – 1	18,9	0,2	[2]

	Вартість 1 л середовища – 1,07 грн			
В. <i>amyloliquefaciens</i> ИМВ В-7100	Глюкоза – 20	36	0,72	[2]
	KH ₂ PO ₄ – 9,6;	74	0,72	[2]
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ – 4,75;	89	0,42	[2]
	Цитрат натрія – 1,29	105	0,13	[2]
	Вартість 1 л середовища – 2 грн			

Примітка. * – Ціни наведено станом на вересень 2020 р. 1. www.ccbaits.com.ua, 2. www.prom.ua

Час культивування є найменшим у *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 та *B. amyloliquefaciens* ИМВ В-7100 і складає 24 годин, в той же час він має найбільш дешевше (табл. 3.2) поживне середовище для культивування, ціна якого складає 1,07 грн за 1 л. Тривалість культивування *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д – 48 години, при найбільшій вартості поживного середовища 2 грн за 1 л.

Зробивши порівняння мікроорганізмів можна стверджувати, що доцільним буде обрати *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 через те, що його культивування здійснюється на дешевому поживному середовищі (1,07 грн за 1 л), в порівнянні з *B. amyloliquefaciens* ИМВ В-7100 та час культивування (24 год) є меншим ніж у *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д.

Також перевагою обраного продуцента є те, що він має достатньо велику фунгіцидну активність.

Тому проаналізувавши показники можна зробити висновок, що найкращим продуцентом є *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008.

Розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування становить 24 год, концентрація біомаси 11 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреба для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50% вуглецю, отже вміст вуглецю в 11 г біомаси становить $11 \times 0,5 = 5,5$ г. Ця кількість вуглецю міститься у $(5,5 \times 100) / 40 = 13,75$ г вуглеводів. У перерахунку на пшеничні висівки з вмістом вуглеводів 50 %, отримаємо 27,5 г/л.

Враховуючи, що 40% втрат субстрату йде на «холосте окиснювання», для одержання 11 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(27,5 \times 0,4) + 27,5 = 38,5$ г/л пшеничних висівків.

Провівши розрахунок вмісту джерела вуглецю, який використовується для синтезу біомаси можна зробити висновок, що практично у складі поживного середовища міститься більша кількість джерела вуглецю, ніж розрахована. Це пояснюється тим, що атоми вуглецю, які входять до складу джерела вуглецю у середовищі (глюкоза), витрачаються на інші потреби, наприклад, синтез молекул АТФ, які є необхідними клітині.

Розрахунок джерела азоту, якими виступають такі компоненти в середовищі як кукурудзяний екстракт проводити є недоцільним, так як цей штам здатний до фіксації азоту [9].

Обґрунтування складу препарату для захисту рослин

Основними діючими компонентами нашого препарату для вегетативної обробки зернових культур будуть: біомаса *Bacillus amyloliquefaciens* ВКІМ В-11008 та хітозан (сухий екстракт). Допоміжними речовинами згідно патенту на схожу модель [101] будуть хітин, янтарна кислота, глютамінова кислота, гетероауксин та емульгатор.

Співвідношення компонентів, г: Хітозан – 2 ; Хітин – 1; янтарна кислота – 0,5; глютамінова кислота – 1,0; гетероауксин – 0,1, емульгатор 3 %.

Хітозани та хітин стимулюють певні процеси у рослинах, що призводять до різних захисних реакцій рослин-господарів у відповідь на мікробні інфекції, включаючи накопичення фітоалексинів, патогенрелігіннованих білків та інгібіторів протеїнази, синтез лігніну та утворення калози, руйнують біоплівки.

Янтарна кислота використовується в садівництві в першу чергу як сильний біостимулятор, який сприяє зростанню і розвитку рослин і покращує їх стійкість до різних несприятливих впливів навколишнього середовища (хворобам, спеки, холоду, надмірної вологості, посухи).

Глутамінова кислота для рослин є одним з основних метаболітів в процесах формування тканини у рослин і синтезу хлорофілу. Амінокислоти збільшують

концентрацію хлорофілу в рослині, що негайно підвищує здатність до фотосинтезу.

Індолілоцтова кислота чи гетероауксин - речовина групи ауксинів, фітогормони, стимулятор росту рослин. Хімічна речовина високої фізіологічної активності, що утворюється в рослинах і впливає на ростові процеси, один з найбільш широко поширених ауксинів. Утворюється в зеленій масі в процесі фотосинтезу. На світлі дія ІОК пригнічується іншими продуктами фотосинтезу.

Так співвідношення 1 л культуральної рідини до 1 л компонентів складає 1:1. За один цикл ми отримуємо 344 л культуральної рідини з яких 3,6 кг біомаси. Кількість допоміжних компонентів на такий об'єм будемо розраховувати на 344 л. Тобто на один цикл до 3,6 кг біомаси ми додамо:

Хітозан – $2 \cdot 344 = 688$ г;

Хітин – $1 \cdot 344 = 344$ г;

Янтарна кислота – $0,5 \cdot 344 = 172$ г;

Глутамінова кислота – $1,0 \cdot 344 = 344$ г;

Гетероауксин – $0,1 \cdot 344 = 34,4$ г;

Емульгатор 3 % $3,6 \cdot 3 / 100 = 108$ мл.

Додавання компонентів до біомаси буде проводитись перед етапом сушіння для більш повного змішування та зручності.

3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

Спосіб культивування *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 обираємо виходячи з фізіолого-біохімічних ознак продуцента:

- по відношенню до кисню *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 – аероб;
- оптимальне значення рН для росту і біосинтезу становить 7-7,2;
- продуцент – мезофіл, оптимальна температура росту 28 °С [9];

Такі умови є оптимальними для росту і розвитку більшості мезофільних мікроорганізмів. Це потребує необхідності забезпечення асептичних умов під час біосинтезу. Культивування можна проводити поверхневим або глибинним методом. Глибинний метод культивування використовують на рідких

середовищах, в яких мікроорганізми розвиваються по всій товщі. Так як мікроорганізми можуть утилізувати тільки розчинний в воді кисень, розчинність кисню у воді невелика, то для забезпечення росту аеробів їх необхідно постійно збагачувати киснем. Перевага глибинного культивування заключається у тому, що цей спосіб не потребує великих площ і громіздкого обладнання, об'єм ферментаторів можна збільшити за рахунок збільшення висоти. Перевагою являється також простота обслуговування, можливість автоматизації.

Отже, для виробничого біосинтезу бактеріального препарату бактеріями *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 використовують глибинний метод культивування періодичним способом.

Вибір ферментера. Тип ферментерів (біореакторів) для кожного біотехнологічного процесу вибирають з урахуванням специфіки продуцента, властивостей середовища та економічних міркувань.

Важливим є забезпечення належного рівня теплообміну в ферментері, оскільки життєдіяльність і метаболічна активність об'єктів залежить значною мірою від коливань температури. Тому потрібно встановити теплову сорочку, яка дозволить підтримувати температурний режим при культивуванні. Це відбувається за рахунок подачі у сорочку нагрітої води.

Перемішування широко застосовують в хімічній промисловості для одержання однорідних рідких сумішей взаємно розчинних компонентів, прискорення процесу розчинення твердої фази в рідкому, збільшення швидкості хімічних реакцій, інтенсифікації процесів теплообміну.

Мішалка у нашому випадку використовується для збільшення площі розділу фаз і тим самим збільшення аерації та для рівномірного розподілу біомаси бактерій, і рівномірного підтримання температури. Доцільно обрати ферментер з механічним перемішуванням рідини барботажного типу. Так як нам потрібно перемішувати бактеріальні клітини, які характеризуються низькою чутливістю до зрізових зусиль, тому можливе використання мішалок будь-якого типу.

Найефективнішими будуть лопатеві мішалки, що застосовують для перемішування рідин з невеликою в'язкістю (до 0,01 Па·с). Лопатеві мішалки

відрізняються простотою конструкції і низькою вартістю виготовлення. Найбільш прості за конструкцією мішалки з плоскими лопатями із смугової або кутової сталі, встановлені перпендикулярно або похило до напрямку їх руху. Частота обертання таких мішалок коливається від 18 до 200 об/хв.

Висновок: Отже, тому що зважаючи на переваги глибинного культивування заключається (не потребує великих площ і громіздкого обладнання, простота обслуговування, можливість автоматизації, а головне, зручність видалення непошкодженого цільного продукту із культуральної рідини) ми обираємо саме **глибинне культивування**. Так як нам потрібно отримати саме біомасу бактерій тому, нашому продуценту необхідно досягти стаціонарної фази, у зв'язку з тим, що йому потрібно насинтезувати необхідні ферменти і речовини, за допомогою яких біомаса даного продуценту використовується як біопрепарат. Це зумовлює використання **періодичного культивування**. Періодичне культивування дає можливість досягнути максимальної концентрації біомаси.

Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря

Оскільки, *Bacillus amyloliquefaciens* ВКІМ В-11008 є аеробом, то однією із важливих умов, при культивуванні, є підготовка стерильного аераційного повітря.

В лабораторних боксах, де працюють з посівною культурою та інокулятом, для стерилізації повітря використовують ультрафіолетові лампи, які знезаражують приміщення та поверхні від вегетативних клітин.

Забір атмосферного повітря здійснюється на висоті двох метрів над рівнем даху будівлі. Оскільки висота виробничої будівлі становить 8 м, обирається з розрахунку найвищого обладнання, в нашому випадку ферментер на 600 л (3 м висота) (4 м – висота стін, 0,5 м – фундамент, 1,5 м – дах), атмосферне повітря відбирається на висоті 8 м, для того щоб в повітрі містилося як найменша кількість часточок (пил, мікроорганізми).

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують спочатку за допомогою фільтрів грубої очистки, де звільняється від великих часточок. У фільтрах грубого очищення матеріалом для фільтрації виступають сітки з металу або тканини з синтетичних волокон

(наприклад – акрилу). Ступінь очищення становить: 75 – 80%. Виконують їх у панельній формі з фільтруючими прокладками, гофрованими листами та іншими матеріалами. Такі фільтри мають структуру яку можна контролювати, вони хімічно інертні, легко очищаються, володіють високою міцністю, дешеві та прості при виготовленні та обслуговуванні. Ми вибираємо фільтр фірми «Фармстрой», в якості фільтрувального матеріалу виступає хімволокно або скловолокно, ступінь очищення в такому фільтрі становить 80%. Ці фільтри є ефективнішими ніж ті, в якості фільтрувального матеріалу яких виступає плетена металева проволочка.

Після грубих фільтрів повітря під дією компресора стискається, задля того, щоб повітря яке буде використовуватися у ферментері мало достатньо енергії, щоб пройти весь шар поживного середовища і тим самим забезпечити культуру розчиненим киснем. Після стиснення температура повітря становить 150-250 С. Знищується значна кількість контамінуючої мікрофлори. Для видалення вологи, що утворилася при компресуванні, повітря піддають швидкому охолодженню до 20-30 °С у теплообмінному апараті. За допомогою краплевловлювача видаляється зайва волога. Після цього повітря подається на ресивер, щоб урівноважити його швидкість і звільнити від пульсацій у потоці.

У фільтрах тонкого очищення, які використовуються далі зазвичай застосовується склотканина. За своєю конструкцією ці фільтри поділяють на кишенькові, складчасті, електростатичні, зі змінними пластинами.

У складчастих фільтрах як правило використовують гофровану фільтруючу тканину зі скловолокна. Кишенькові фільтри зазвичай складаються з рамки, зовнішніх прокладок у вигляді сітки і так званих кишень з фільтруючого матеріалу.

Ступінь очищення повітря на такому фільтрі становить 95%. Тому ми їх вибираємо як головні фільтри. Головні фільтри заповнюють набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. Фільтр тонкої очистки замовляти будемо у фірми «General filter», у якості фільтрувального матеріалу виступатиме мікроскловолокно, ступінь очищення в фільтрі тонкої очистки – 95%.

Для отримання повітря із ступенем очищення 99,995% використовують фільтри індивідуальної очистки, які встановлюються безпосередньо перед ферментером. У якості фільтрувального матеріалу використовуються фторопластові фільтри, а також фільтри із боросилікату. Такі фільтри здатні затримувати частинки розміром 1-0,01мкм. Для індивідуальної очистки замовимо фільтр Microfluor II, який відносить до фільтрів абсолютного очищення (H14), як фільтрувальний матеріал використовуються фторопластові мембрани, які витримують температуру до 145 С, завдяки чому ступінь очищення становитиме 99,995%.

Визначення кількості та підготовка титрувальних агентів

Використання титрувальних агентів зумовлено їх необхідністю при приготуванні композицій поживного середовища ($MgSO_4$, KH_2PO_4), щоб не відбувалося випадання солей в осад.

Приготування 6%-го розчину HCl

Для приготування 1 л 6% розчину HCl, необхідно 172 мл 35%-ї HCl і 0,83 л питної води. Потрібно розрахувати необхідну кількість 35%-ї HCl і питної води, щоб приготувати 1 л 6%-го розчину HCl.

Щоб отримати розведення потрібно взяти 6 масових частин 35%-ї HCl і додати 29 масових частин питної води.

1 об'ємна частина в 1 л буде дорівнювати 28,6 мл, тобто потрібно відміряти 171,6 мл 35%-ї HCl (беремо 172 мл для легшого відмірювання) і 829,4 мл питної води (беремо 830 мл для легшого відмірювання).

Розчин роблять під витяжною шафою, відміряють за допомогою скляного мірного стакана та обов'язково саме до питної води додають 35%-ну HCl, а не навпаки (для уникнення сильної екзотермічної реакції).

Для доведення рН від 7 до рН 4-4,5 прийнято вважати, що потрібно додати 2 мл хлоридної кислоти на 1 л середовища.

Приготування та стерилізація 9 %-го розчину NH_4OH

Для того, щоб приготувати 1 л 9%-го розчину аміачної води, треба відміряти 360 мл 25% аміачної води і 640 мл питної води.

Потрібно розрахувати необхідну кількість 25% аміачної води і питної води, щоб приготувати 1 л 9%-го розчину аміачної води.

Щоб отримати розведення потрібно взяти 9 об'ємних частин 25% аміачної води і додати 16 об'ємних частин питної води.

1 об'ємна частина в 1 л буде дорівнювати 40 мл, тобто потрібно відміряти 360 мл 25% аміачної води і 640 мл питної води. Розчин роблять за допомогою скляного мірного стакана. Колбу закривають скляною пробкою.

3.3 Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Цільовим продуктом виробництва, що проектується є біомаса *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008, яка складає основу біопрепарату, що застосовується для захисту зернових культур.

На першому етапі виділення нам потрібно відокремити, власне, біомасу від культуральної рідини, обравши один з методів, що застосовуються в біотехнології.

Наступною стадією є висушування отриманої біомаси, для збільшення терміну зберігання клітин.

Після висушування біомаси йде процес додавання хітозанів та просіювання утвореної суміші до частинок певного розміру.

Останнім етапом є фасування, пакування та маркування. Сучасні технології дозволяють здійснювати це автоматизовано та використовуючи всього лише один апарат.

Отже, підводячи підсумок сказаного вище, можна стверджувати, що технологія отримання (виділення) біомаси *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 буде складатися з наступних стадій:

- 1) відокремлення біомаси від культуральної рідини, після біосинтезу;
- 2) сушіння;
- 3) змішування з хітозанами;
- 4) просіювання;
- 5) фасування, пакування та маркування цільового продукту.

Обґрунтування способу відокремлення біомаси

Основними компонентами культуральної рідини після закінчення біосинтезу є залишки поживного середовища та біомаса продуцента. Для відокремлення останньої від культуральної рідини в біотехнології застосовуються наступні методи: центрифугування, сепарування, фільтрація, седиментація, флотація. Вибір способу та обладнання залежить від особливостей продуцента, властивостей культуральної рідини, масштабу виробництва.

Сепарування – це процес розділення змішаних об'ємів сумішей різної густини, емульсій, суспензій твердих частинок або краплинок в газі. Даний спосіб використовується у процесі одержання хлібопекарських і кормових дріжджів, ферментів, антибіотиків, а також багатьох інших продуктів хіміко-фармацевтичної, медичної і харчової промисловості.

Сепарування має такі переваги перед фільтруванням та іншими методами:

- немає потреби в застосуванні фільтрувальних елементів, що дає змогу непотрібну для подальшої переробки фракцію використовувати як кормову добавку;
- матеріал обробляється з найменшими витратами активної речовини;
- процес легше піддається автоматизації, агрегати займають менше місця, легше мити устаткування [90].

Істотним недоліком сепараторів є швидке забруднення мундштуків і міжтарільчатого простору механічними включеннями й клітинами дріжджів, тому застосування даного методу розділення для проектного виробництва буде недоцільним.

Фільтрація – це процес проходження розчину чи суспензії через пористу перегородку (мембрану) за різницею тиску з обох боків мембрани, при чому розмір профільтрованих частинок обмежується діаметром пор.

Основна характеристика процесу швидкість фільтрації (кількість фільтрату, що отримується з одиниці фільтруючої поверхні в одиницю часу).

Фільтрування процес менш енергоємний, проте одночасно і менш ефективний, порівняно з сепарацією.

Недоліком способу є налипання клітин на фільтрі, шар яких знижує швидкість потоку рідини в процесі фільтрування. При фільтрації деяких культуральних рідин, зокрема культуральної рідини, що містить актиноміцети, гриби чи дріжджі, питомий опір драглистого осаду, що утворюється, дуже великий. Навіть тонкий шар осаду, який залишається після зрізання ножом, призводить до різкого зниження швидкості фільтрації [91].

Седиментація – процес осідання часток під дією сили тяжіння. Седиментаційна стійкість тісно пов'язана із процесом осідання частинок, зумовлена лише їх розміром. Седиментацію використовують для відділення конгломератів типу «кефірних зерен» у деяких процесах молочнокислого чи змішаного бродіння, а також під час біологічної обробки відходів активним мулом [91].

Недоліком даного способу є час проведення даної технологічної операції.

Флотація – це спосіб розділення сумішей твердих дрібних частинок, що належать різним речовинам, а також виділення крапель дисперсної фази з емульсій, заснований на їх різній змочуваності і здатності накопичуватися на поверхні розділу фаз. Даний метод використовують у виробництві білка деяких одноклітинних мікрорганізмів, також у пивоварінні [91].

Перевагами методу є його економічність, висока продуктивність і можливість використання в безперервних процесах.

Флотація не гарантує повного відділення біомаси від культуральної рідини, тому застосування даного методу є економічно невиправданим, так як, власне, біомаса є цільовим продуктом і нам потрібен найбільший можливий відсоток її відділення [92].

Центрифугування – примусове осадження часток за рахунок збільшення швидкості відцентрових сил. У мікробіологічній промисловості центрифуги широко використовують для розділення суспензій на рідину й тверді фази, що містять мікроорганізми, ферменти, амінокислоти й інші продукти біосинтезу кристалічної або аморфної структур. У технологіях мікробного синтезу використовують різні типи центрифуг: осаджувальні, шнекові, безперервної дії,

тощо. Центрифугування дає змогу виділяти з культуральних рідин біомасу бактерій, дріжджів, міцеліальних грибів.

Висновок: проаналізувавши всі способи відокремлення біомаси від культуральної рідини доцільним буде обрати спосіб центрифугування.

Перевагами центрифугування є:

- 1) швидкість розділення в центрифугах є значно вищою, ніж при застосуванні інших способів розділення;
- 2) при центрифугуванні відсоток відділеної біомаси від культуральної рідини є найбільшим.

Вибір центрифуги. Вибір обладнання для центрифугування здійснюється на основі особливостей клітин продуцента та технологічного процесу.

Так як виробництво працює циклічно, то технологічно вірним буде рішення обрати центрифугу періодичної дії.

Відповідно до методів розділення центрифуги підрозділяють на: відстійні, фільтруючі, комбіновані центрифуги.

Фільтрувальні центрифуги використовують при розділенні тонко дисперсних суспензій із розміром частинок 20-200 мкм і об'ємною концентрацією твердої фази 5-40 %. Їх застосовують у випадках якщо осад погано фільтрується.

Осаджувальні або відстійні центрифуги використовують при поділі грубодисперсних суспензій, якщо частинки 0,2-5 мкм і об'ємною концентрацією твердої фази 5-50 %. Досягається високий ступінь зневоднювання осаду. Фільтрувальні об'єднують два типи відділення, це фільтрування і осадження.

Найкращим вибором для відділення біомаси, зважаючи на розмір клітин ($1,8 \times 0,5$ - $0,9$ мкм) в нашому випадку є осаджувальна центрифуга.

Отже, враховуючи об'ємну концентрації культуральної рідини, потрібний ступінь відділення ми вибираємо осаджувальну центрифугу Rousselet Robatel DRC70 (рис 3.1). Робочий об'єм центрифуги складає 80 л, що підійде нам для центрифугування 344 л культуральної рідини.



Рис. 3.1 Осаджувальна центрифуга Rousselet Robatel DRC70

Обґрунтування способу сушіння

Сушарки, що застосовуються в мікробіологічній промисловості, можна характеризувати за способом подачі продукту і теплоносія в сушильні камери, а також по гідродинамічним умовами їх роботи. Найбільше застосування знайшли сушарки: вальцьові, стрічкові, барабанні, розпилювальні, пневматичні, сублімаційні [93].

Вальцьові сушарки (рис. 3.2) часто використовуються для сушки кормових дріжджів з вмістом сухих речовин до 20-25%. Процес сушіння проводиться при суворому контролі температурного режиму, щоб уникнути денатурації білків. На вальцьових сушарках межа температури теплоносія становить 70-80 °С. У барабан, який закритий з торців кришками, подається пар. У торців барабанів зверху встановлюються клини, що утворюють між барабанами ванну, в яку безперервно надходить концентрат біомаси. При обертанні барабана клітинна біомаса змочує їх поверхню тонким шаром, який висушується до вологості 8-10%. Суха біомаса знімається з поверхні барабана ножами і обсипається в поздовжні шнеки, звідки подається на фасовку [93].

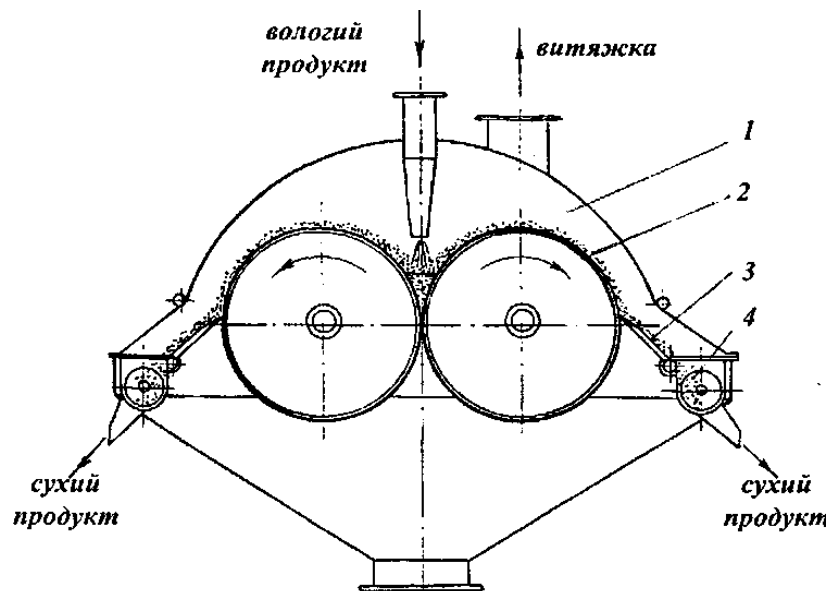


Рис 3.2 Вальцева сушарка

Стрічкова сушарка (рис. 3.3) – пастоподібна біомаса попередньо змішується з наповнювачем, а потім формується у вигляді брикетів, які подаються на транспортер стрічкової сушарки. Після сушіння матеріал розмелюють на молоткової дробарці. Застосування стрічкових сушарок доцільно і тому випадку, коли вологий матеріал заздалегідь відформований і сушіння можливе лише в такому вигляді [14]. Основним недоліком сушарок стрічкового типу є відносна громіздкість і невисока продуктивність, віднесена до одиниці об'єму апарату.

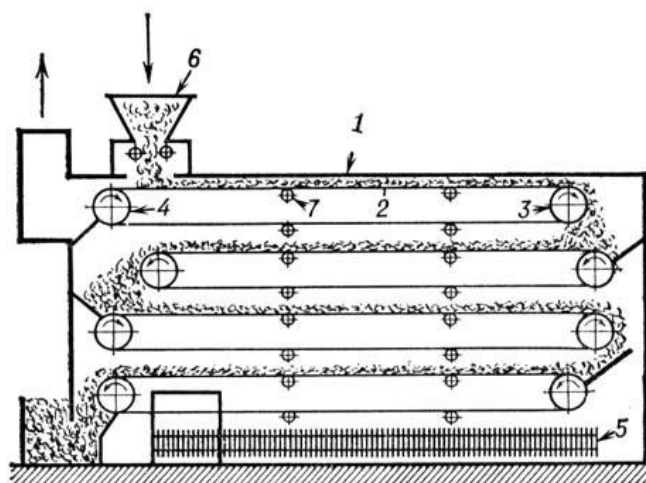


Рис 3.3 Стрічкова сушарка

Пневматична сушарка (рис. 3.4) є найбільш простою сушаркою, яка заснована на конвективному теплопереносі. Повітря гріють за допомогою калориферу подається разом з матеріалом в сушильну шафу. Сухі частки

препарату відділяються від повітря в циклоні, а відпрацьоване повітря поступає на додаткове очищення у фільтрі.

Недоліками даного типу сушарок є те, що вона використовує повітря яке нагріте до високих температур, що може негативно впливати на кінцеві властивості продукту.

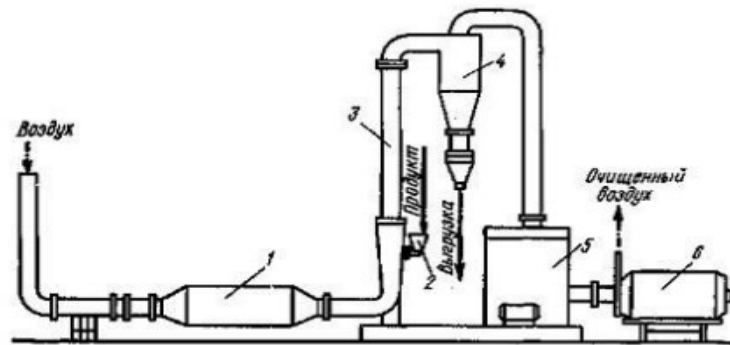


Рис 3.4 Схема пневматичної сушарки: 1 - калорифер; 2 - живильник; 3 - сушильна труба; 4 - циклон-віддільник; 5 - фільтр; 6 - вентилятор

Барабанні сушарки (рис. 3.5), що застосовуються для безперервного сушіння сипучих матеріалів, представляють собою обертовий циліндричний барабан, що встановлюється з невеликим ($2-7^\circ$) нахилом до горизонту. Барабан повільно обертається, що сприяє подовжньому переміщенню і поперечному перемішуванню сипучих матеріалів, що заповнює внутрішній обсяг барабана зазвичай на 10-30%. Лопаті на внутрішній поверхні барабана і елементи насадки в усьому його обсязі збільшують час падіння частинок матеріалу і покращують умови обтікання кожної частинки потоком сушильного агента.

Барабанні сушарки надійні в роботі, забезпечують глибоке висушування сипучих матеріалів при їх прямоточному або протиточному русі з топковим газами (або з гарячим повітрям). Слід зазначити, що вони є досить великими за розмірами.

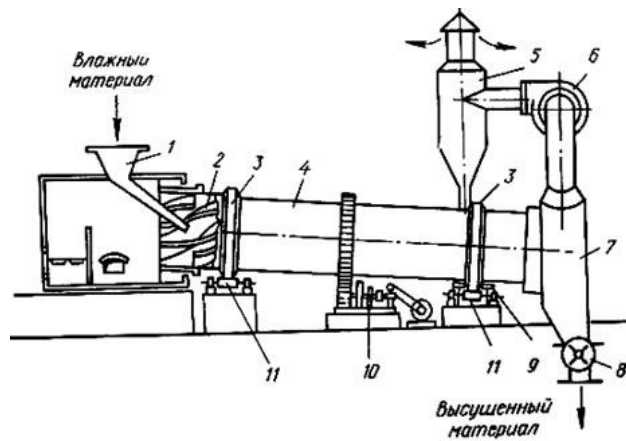


Рис 3.5 Барабана сушарка

Розпилювальні сушарки (рис. 3.6), призначені для висушування рідких матеріалів (розчинів, суспензій, рідких паст) до стану сипучого дрібнодисперсного порошку, являють собою вертикальні камери зазвичай круглої форми. Вихідний вологий матеріал розпилюється механічними, пневматичними або дисковими розпилювачами у верхній частині камери, і дрібні краплі (зазвичай середнім розміром 20-40 мм) падають вниз, контактуючи своєю поверхнею з сушильним агентом, що подається прямо-або протитоком по відношенню до низхідного руху крапель матеріалу. Висушений до стану сухого порошку продукт знаходиться на нижньому, конічному дніщі апарату і безперервно вивантажується з апарату через центральний патрубок.

Розпилювальні сушарки відносно стійкі в роботі (при відсутності засмічення механічних або пневматичних форсунок) і дозволяють отримувати висушувані матеріали у вигляді однорідного порошку. Недоліки таких сушарок – в підвищених витратах сушильного агента і енергії, як на нагрівання сушильного агента, так і на розпорошення вихідного рідкого продукту. Габарити розпилювальних сушарок досягають десяти і більше метрів.

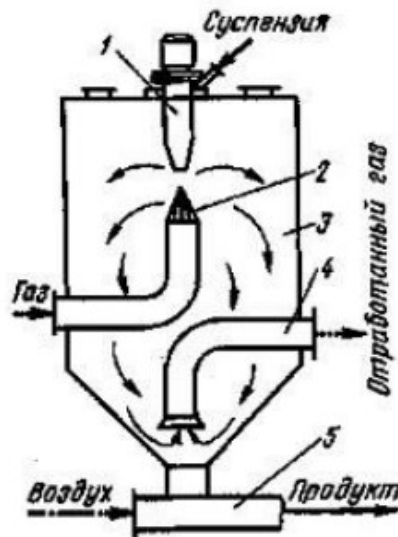


Рис 3.6 **Схема сушарки розпилювального типу:** 1 – розпилювальний механізм; 2 – розподільник газу; 3 – сушильна камера; 4 - газовідвод; 5 – труба пневмотранспорту

Вакуум-сушильна шафа (рис. 3.7) працює в періодичному режимі і являє собою шафу циліндричної або прямокутної форми та закривається герметично. Як і сублімаційні сушарки, вони призначені для сушіння нетерmostійких матеріалів, але процес відбувається за кімнатної або підвищеної температури.

Сушіння матеріалу у вакуум-сушильній шафі триває декілька годин, після закінчення процесу матеріал охолоджують і вивантажують із сушарки, потім процес сушіння знову повторюють.

Сушіння відбувається періодично, тобто у шафу на полиці закладють вологий матеріал, створюють вакуум, починають обігрівання шафи паром через порожнини в плитах або електричним струмом. Процес закінчують, коли матеріал матиме певну залишкову вологість. Ці апарати призначені для сушіння порівняно невеликих кількостей вологого матеріалу.



Рис 3.7 Вакуум сушильна шафа

Перевагою даної сушарки є те, що за допомогою цього виду сушіння висушені продукти зберігаються протягом двох років.

Недоліками є:

- 1) низька продуктивність;
- 2) необхідність застосування ручної праці;
- 3) витрата часу на завантаження й вивантаження матеріалу, наслідок – тривалість процесу.

Вакуумна сушка швидше, м'якше і більш ефективна з точки зору витрат електроенергії, ніж теплова сушка.

Висновок: проаналізувавши сушарки з різними способами сушіння найдоцільнішим способом є використання стрічкової сушарки, тому що об'єм вологого препарату є невеликим (приблизно 7,5 кг), тому оптимальним буде використання стрічкової сушарки, також тому що не потрібно подрібнювати продукт після сушіння, як у випадку вакуум-сушильних шаф. Обираємо лабораторну одношарову стрічкову сушарку DW (рис. 3.8).



Рис 3.8 Лабораторна одношарова стрічкова сушарка DW

Сушарка складається з сушильного агрегату, агрегат нагрівається гарячим повітрям, частина вихлопних газів відводиться витяжним вентилятором, а відводиться вихлопної газ регулюється перетворювачем частоти. Гаряче повітря проходить від низу до верху або зверху вниз через вкриту стрічку, щоб забезпечити тепло і якість. Процес проходження, відведення вологи з матеріалу. Сітчастий ремінь рухається повільно, швидкість руху можна вільно регулювати залежно від температури матеріалу, а висушений продукт безперервно потрапляє в приймач.

3.4 Обґрунтування вибору стадій отримання товарної форми

Після сушки препарату у стрічковій сушарці треба подрібнити та просіяти просіяти майбутній препарат для подальшої реалізації.

Оберемо лабораторний барабанний млин ТМ 300 (рис. 3.9) – процес подрібнення може проводитися як в сухому, так і в мокрому вигляді. За допомогою відповідних модулів барабанна млин ТМ 300 XL може використовуватися або як кульова, або як стрижнева. Для ефективного подрібнення потрібна достатня кількість куль або стрижнів. Зазвичай досягається тонкість менше 20 мкм. Робочий об'єм до 20 л.



Рис. 3.9 Лабораторний барабанний млин ТМ 300

Обираємо просіваюльну машину RETSCH AS 450 basic (рис. 3.10) має такі переваги: короткий час просіювання, точність аналізу і зручність в роботі, а також відповідність вимогам стандарту ISO 9001, простота експлуатації, ергономічний дизайн, не потребує технічного обслуговування. Максимальна кількість продукту для просіювання: 15 кг. Діапазон вимірювань: 25 мкм-125 мм [94].



Рис. 3.10 Просіваюльна машина RETSCH AS 450 basic

Після сушіння, подрібнення та просіювання необхідно упакувати сухий порошок біомаси у поліетиленові пакети. Фасовка порошків здійснюється за допомогою спеціальних фасувальних апаратів.

Так як маса порошку невелика (приблизно 7.5 кг) доцільно здійснювати фасування у поліетиленові пакети по 0,2 кг. Обираємо фасувальний автомат «FZL100» (рис. 3.11) [95].

Високопродуктивна фасувальна машина FZL100 – автоматичний фасувально-пакувальний апарат з високою точністю зважування для сипучих продуктів. Автомат формує пакети в поліетиленові пакети і запаковує в них гранульовані або порошкоподібні продукти.

Використовується для фасування чаю, харчових продуктів, насіння, фруктів, гранул, хімічних та фармацевтичних препаратів, різноманітних маленьких твердих неклеючих матеріалів, тощо. Діапазон зважування 1-100 грам.



Рис. 3.11 Фасувальна машина FZL100

Останній етап – пакування у коробки – найдоцільніше здійснювати вручну, оскільки враховуючи невелику кількість порошку (приблизно 7,5 кг), кількість пакетів з порошком є досить невеликою.

РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Апаратурна схема (дод. 1) виконана на 1 листку формату А1 та відповідає процесам, зображеним на технологічній схемі із зазначенням точок контролю процесу.

Таблиця 4.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та технологічного процесу отримання біомаси *B. amyloliquefaciens* ВКІМ В-11008

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Пристрій для забору повітря DUNDAR CM 21.2, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень, продуктивність 2500 м ³ /год, робоча температура від -30 до +80 °С. Виробник: «Dundar», Туреччина.
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр ФВП–39–48–G4. Фільтруючий матеріал – поліестер. Продуктивність 1500-2500 м ³ /год. Виробник: «ЕлВент», Росія.
К-3	Компресор	1	Поршневий компресор Abac B 4900. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа, продуктивність 514 л/хв. Виробник: «ABAC», Італія.
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря WHE 2020 Максимальний робочий тиск 2,5 МПа (25 бар), охолоджувальна здатність 7 кВт/год. Виробник: «Гідропневмосистеми», Україна.
Р-5	Ресивер	1	Ресивер Р 330.500.01 Об'єм 330 л, робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «ТД Пнеumo-комплект», Україна.
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Повіронагрівач водяний VBC (Systemair). Максимальний робочий тиск 1,6 МПа (16 бар), робоча температура 150 °С. Виробник: «Systemair», Швеція.
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Карманий фільтр тонкої очистки класу F9. Фільтруючий матеріал мельблоун. Максимальна робоча температура: 60-70 °С. Ступінь очищення становить 90- 99 %.

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Танана				РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Буценко						71	
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

Ф-8 Ф-9 Ф-10	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Фільтр повітряний <i>Microfluor II</i> . Фільтруючий матеріал – фторопласт, температура до 145 °С, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,95 %.
I-11	Інокулятор	1	Інокулятор «BIOSTAT® Cplus» об'ємом 6 л, матеріал корпусу – сталь AISI 304. Інокулятор оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 20-1500 об/хв). Виробник: «ООО Сартогосм», Росія.
P-12	Реактор-змішувач об'ємом 10 л для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 л, оснащений перемішувальним пристроєм та сорочкою, сталь – AISI 304. Виробник: «Schulz Technology».
Д-13 Д-15 Д-18 Д-21	Дозатор об'ємно-ваговий	4	Фасувальний об'ємно-ваговий дозатор. Матеріал: нержавіюча сталь. Виробник: ТОВ «ПродПромПак», Україна.
P-14	Реактор-змішувач об'ємом 30 л для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 30 л перемішувальним пристроєм (0-450 об/хв). Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,3х0,76 Виробник: «Екафарм».(Україна)
I-16	Інокулятор	1	Інокулятор «BIOSTAT® D-DCU» об'ємом 60 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (20- 700 об/хв), сталь AISI 316L. Виробник: «ООО Сартогосм», Росія.
P-17	Реактор-змішувач об'ємом 50 л для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 50 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм, сталь – AISI 304. Виробник: «Schulz Technology».
H-19 H-22 H-25	Насос відцентровий	3	Герметичний відцентровий насос з магнітною муфтою DM 10 з поліпропілену або фторопласта. Продуктивність 17 л/хв, температурні параметри середовища, що перекачується від +3 до +95 °С. Виробник: «DEBEM», Італія.
P-7	Реактор-змішувач об'ємом 500 л для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 500 л перемішувальним пристроєм (10-450 об/хв) з рубашкою. Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,8х1,8 Виробник: «Екафарм», Україна

ФР-23	Ферментер	1	Ферментер «Биотехно» об'ємом 600 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (20-700 об/хв), сталь AISI 316L. Виробник: «BioTechno Group», Росія
Р-24	Збірник для культуральної рідини	1	Збірник для об'ємом 500 л перемішувальним пристроєм (10-450 об/хв) з рубашкою. Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,8х1,8 Виробник: «Екафарм», Україна
Ц-26	Центрифуга	1	Осаджувальна центрифуга Rousselet Robatel DRC70. Робочий об'єм: 80 л. Мішалка: 0-1850 об/хв. Виробник: Rousselet Robatel (Франція)
Р-27	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 15 л перемішувальним пристроєм (0-450 об/хв). Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Виробник: «Екафарм».(Україна)
С-28	Сушарка	1	Лабораторна одношарова стрічкова сушарка DW. Максимальна температура 120 °С. Виробник: Чжэцзян Цяньцзян Вэйган Сушильное оборудование Лтд (Китай)
Д-29	Дробарка	1	Лабораторний барабанный млин ТМ 300. Ступінь подрібнення: 25 мкм – 20 мм. Робочий об'єм – 20 л. Виробник: «Retsch» (Німеччина)
П-30	Просіювач	1	Просіювальна машина AS 450 basic. Ступінь просіювання: 25 мкм – 125 мм. Максимальний об'єм – 15 кг. Виробник: «Retsch» (Німеччина)
ФПМ-31	Фасувально-пакувальна машина	1	Фасувально-пакувальна вертикальна машина FZL-100. Діапазон зважувань: 1-100 г. Об'єм накопичувального бункера – 8 кг. Виробник «КОЗАК» (Україна)

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу включає допоміжні роботи (підготовка титрувальних агентів та підготовка і стерилізація поживних середовищ), технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, біосинтез культури продуценту з метою отримання його біомаси, відділення біомаси, одержання напівфабрикату, сушіння препарату, подрібнення, його пакування та маркування).

Креслення технологічної схеми (дод. 2) зроблене на аркуші формату А2, де зображені допоміжні роботи та технологічний процес.

Технологічну схему біосинтезу культуральної рідини *Bacillus atyloliquefaciens* ВКПМ в-11008 наведено у графічній частині курсової роботи.

ДР 1. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 1.1. Приготування 6%-го розчину HCl

Для приготування 1 л 6% розчину HCl, необхідно 172 мл 35%-ї HCl і 830 мл питної води.

Під витяжною шафою у колбу об'ємом 2 л наливають 830 мл питної води. Потім за допомогою мірного циліндра при постійному перемішуванні додають 172 мл 35 % розчину HCl. Колбу закривають скляною пробкою. Стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C 40 хв.

ДР 1.2. Приготування та стерилізація 9 %-го розчину NH₄OH

Для того, щоб приготувати 1 л 9%-го розчину аміачної води, треба відміряти 360 мл 25% аміачної води і 640 мл питної води.

У колбу місткістю 2 л наливають 640 мл питної води, далі за допомогою мірного циліндру відміряють і додають 360 мл 25% розчину NH₄OH та перемішують. Колбу закривають скляною пробкою. Стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C 40 хв.

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.	Танана								
Перевір.	Буценко						71		
Консультант.						74			
Н. Контр.						Кафедра БТМ			
Затверд.	Пирог Т.П.								

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрозабірник (ПЗ-1) на висоті, як правило двох метрів над рівнем даху будівлі (4 м – висота стін, 0,5 м – фундамент, 1,5 м – дах), тобто 8 м, де концентрація пилових часток і мікроорганізмів є мінімальною.

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення повітря

Попередню очистку повітря здійснюють у фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очищення 80%. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил, механічні частки діаметром 5–10 мкм затримуються, знижується кількість контамінантів. Очищене повітря надходить у компресор (К-3).

ДР 2.3. Компресування повітря

Стиснення повітря відбувається за допомогою компресора (К-3), при цьому створюється тиск величиною 0,4 МПа, температура повітря підвищується від 120 до 250°C. Знищується значна кількість контамінуючої мікрофлори.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи

Для видалення вологи, що утворилася при компресуванні, повітря піддають швидкому охолодженню до 20 °C у теплообмінному апараті охолоджувачі (Т-4), далі видалену вологу подають на ресивер (Р-5), у якому відбувається видалення зайвої вологи до $W = 60-65 \%$.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Для забезпечення надійної роботи фільтрів та запобігання утворення конденсату пари, на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, охолоджене повітря з ресивера (Р-5) у теплообміннику (Т-6) нагрівають до температури 30-40°C, при цьому допускається часткове підмішування гарячого повітря після компресора.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-7), в якому фільтрувальним матеріалом є скловолокно. Охолоджене повітря, проходячи крізь фільтр, очищається від пилу та мікроорганізмів. Ступінь очищення становить $E = 95 \%$.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр (Ф-8, Ф-9, Ф-10), в якому фільтруючим матеріалом є фторопласт. Ступінь очищення становить $E = 99,995 \%$.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 350 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 350 мл середовища наведено в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 350 мл середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 350 мл, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Пшеничні висівки	40	14	А	200
Кукурудзяний екстракт	0,5	0,18		
MgSO ₄	1,85	0,65	Б	50
CaCO ₃	1	0,35	В	50
KH ₂ PO ₄	0,5	0,18	Г	50

ДР 3.1.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 14 г пшеничних висівок переносять у колбу об'ємом 500 мл вносять 200 мл питної води та ставлять на водяну баню на 60 хв при температурі 70°C. Потім вносять наважку кукурудзяного екстракту 0,18 г. Перемішуємо до повного розчинення. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °C упродовж 30 хв.

ДР 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,65 г MgSO₄, поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають 50 мл питної води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C 40 хв.

ДР 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,35 г CaCO_3 , поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають 50 мл питної води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 3.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують 0,18 г K_2HPO_4 , поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають 50 мл питної води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 3.2 Приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 3,54 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 3,54 л поживного середовища наведено в табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3,54 л середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 3,54 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Пшеничні висівки	40	142	А	1
Кукурудзяний екстракт	0,5	1,8		
Вода		860		
MgSO_4	1,85	6,55	Б	1,81
KH_2PO_4	0,5	1,8		
Вода		1,8		
CaCO_3	1	1,24	В	0,54
Вода		0,54		
Конденсат		0,2		0,2
Разом:		3,54		3,54

ДР 3.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 142 г пшеничних висівок переносять у колбу об'ємом 2 л вносять 860 мл питної води та ставлять на водяну баню на 60 хв при температурі 70°С. Потім вносять наважку кукурудзяного екстракту 1,8 г.

Перемішуємо до повного розчинення. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 6,55 г MgSO_4 , 1,8 г K_2HPO_4 , поміщають у колбу об'ємом 3 л, додають 1,8 л питної води перемішують потім подають в попередньо простерилізований інокулятор (І-11), доводять рН 6%-им розчином HCl об'ємом 4 мл (від ДР 1.1) до 4-4,5, подають пару в сорочку та через нижній спуск і стерилізують при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 3.2.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 1,24 г CaCO_3 , поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 0,54 л питної води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 3.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в інокуляторі об'ємом 60 л

Для вирощування інокуляту на даному етапі необхідно приготувати 35,06 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 35,06 л поживного середовища наведено в *табл. 5.3*.

Таблиця 5.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 35,06 л середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 35,06 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Пшеничні висівки	40	1403	А	7,42
Кукурудзяний екстракт	0,5	17,6		
Вода		6		
MgSO_4	1,85	65	Б	23,18
KH_2PO_4	0,5	17,6		
Вода		23,1		
CaCO_3	1	35,2	В	1,06
Вода		1030		
Конденсат		3,4		
Разом:		35,06		35,06

ДР 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-13) вносять 1403 г пшеничних висівок у реактор об'ємом 10 л (Р-12) також через об'ємно-ваговий дозатор (Д-13) додають 6 л питної води, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 70 °С до повного розчинення і залишають для заварювання на 60 хвилин. Потім вносять наважку кукурудзяного екстракту через мірний циліндр 17,6 мл. Подають пару в реактор і стерилізують при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 65 г MgSO_4 , 17,6 г K_2HPO_4 . У змішувач з мішалкою (Р-14) об'ємом 30 л, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-15) додають 23,1 л питної води. Включають мішалку і вносять солі при постійному перемішуванні. Після розчинення солей, розчин самоплином із збірника подають в попередньо простерилізований інокулятор (І-16), доводять рН 6%-им розчином HCl об'ємом 47 мл (від ДР 1.1) до 4-4,5, подають пару в сорочку та через нижній спуск і стерилізують при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 3.3.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 35,2 г CaCO_3 , поміщають у колбу об'ємом 2 л, додають 1,06 л питної води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 3.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 600 л для виробничого біосинтезу

Вміст компонентів для приготування 347,3 л поживного середовища наведено в табл. 5.4.

Таблиця 5.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 347,3 л середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компонента на 347,3 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Пшеничні висівки	40	13900	А	39,07
Кукурудзяний екстракт	0,5	173,7		
Вода		25		
MgSO ₄	1,85	643	Б	272,3
KH ₂ PO ₄	0,5	173,7		
Вода		271,5		
CaCO ₃	1	348	В	1,35
Вода		1000		
Конденсат		34,6		34,6
Разом:		347,3		347,3

ДР 3.4.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-18) вносять 13,9 кг пшеничних висівок у реактор об'ємом 50 л (Р-17) також через об'ємно-ваговий дозатор (Д-18) додають 25 л питної води, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 70 °С до повного розчинення і залишають для заварювання на 60 хвилин. Потім вносять через об'ємно-ваговий дозатор (Д-18) 173,7 г кукурудзяного екстракту. Подають пару в реактор і стерилізують при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-21) вносять 643 г MgSO₄, 173,7 г K₂HPO₄. У змішувач з мішалкою (Р-20) об'ємом 500 л, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-21) додають 271,5 л питної води. Включають мішалку і вносять солі при постійному перемішуванні. Після чого, за допомогою насоса (Н-22) розчин зі збірника подають у попередньо простерилізований ферментер (ФР-23), доводять рН 6%-им розчином НСІ об'ємом 543 мл (від ДР 1.1) до 4-4,5, подають пару в сорочку та через нижній спуск і стерилізують при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 3.4.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 348 г CaCO_3 , поміщають у колбу об'ємом 2 л, додають 1 л питної води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C 40 хв.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008

Колекційну культуру *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 зберігають в пробірках із скошеним середовищем МПА в холодильнику з пересівом через 2 – 3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

ТП 4.2 Одержання робочої культури *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008

Колекційну культуру *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008, що зберігалася в пробірках з середовищем МПА, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із середовищем МПА і вирощують при температурі 28 °C 18 годин.

ТП 4.3. Вирощування робочої культури *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 на агаризованому середовищі

Ізольовані колонії пересівають мікробіологічною петлею в пробірки зі скошеним м'ясо-пептонним агаром та інкубують протягом 18 год.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

У колбу об'ємом 1 л з композицією Б (від ДР 3.1.2) в асептичних умовах вносять в асептичних умовах вносять композицію В (від ДР 3.1.3), композицію Г (від ДР 3.1.4) та композицію А (від ДР 3.1.1), перемішують і розливають стерильним мірним циліндром (200 мл) по 150 мл у три качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008, вирощеною на МПА, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, піпеткою вносять одержану суспензію у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 здійснюють в колбах на качалці (200 – 220 об/хв) впродовж 24 год при температурі 28 °C. По закінченню

процесу культивування, орієнтовна концентрація біомаси має становити приблизно 5,5 г/л так як ми культивуємо до експоненційної фази росту. Після вирощування інокуляту здійснюють мікробіологічний контроль в кожній колбі.

Перевіряють посівний матеріал на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6 л

Попередньо простерилізований посівний апарат (I-11) містить 1,81 л простерилізованого розчину солей композиції Б (від ДР 3.2.2), рН якого становить 4-4,5. В асептичних умовах подають композицію А об'ємом 1 л (від ДР 3.2.1). Для культивування культури рН середовища має становити 7, отже, в апарат асептично подають 9% розчин NH_4OH (від ДР 1.2) (рівень рН контролюється на рН-метрі). Потім через засівну колбу додають 0,54 л композиції В (від ДР 3.2.3). В лабораторному боксі посівний матеріал (від ТП 5.4) зливають в одну стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

Перед внесенням посівного матеріалу, відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю. Посівний матеріал (від ТП 4.4) подають в асептичних умовах через одну стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

Вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку (для підтримання температури 28°C), та культивують впродовж 12 год. Кожні 6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. По закінченню процесу, орієнтовна концентрація біомаси має становити 5,5 г/л, оскільки культивування проводимо тільки до експоненційної фази росту.

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л

Попередньо простерилізований посівний апарат (I-16) містить 23,2 л простерилізованого розчину солей композиції Б (від ДР 3.3.2), рН якого становить 4-4,5. В асептичних умовах подають самоплином зі збірника композицію А об'ємом 7,42 л (від ДР 3.3.1). Для культивування культури рН середовища має становити 7, отже, в апарат асептично подають 9% розчин NH_4OH (від ДР 1.2) (рівень рН контролюється на рН-метрі). Потім через засівну колбу додають 1 л композиції В (від ДР 3.3.3).

Перед внесенням посівного матеріалу, відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю. Посівний матеріал (від ТП 4.5) подають самопливом з інокулятора (І-11).

Вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку (для підтримання температури 28°C), та культивують впродовж 12 год. Кожні 6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. По закінченню процесу, орієнтовна концентрація біомаси має становити 5,5 г/л, оскільки культивування проводимо тільки до експоненційної фази росту.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування

У ферментер об'ємом 600 л (ФР-23) з 272,3 л простерилізованого розчину композиції Б (від ДР 3.4.2), рН якого становить 4-4,5, в асептичних умовах зі збірника подають за допомогою відцентрового насосу (Н-19) 39 л розчину композиції А (від ДР 3.4.1). Для культивування культури рН середовища має становити 7, отже, в ферментер асептично подають 9% розчин NH_4OH (від ДР 1.2) (рівень рН контролюється на рН-метрі). Потім через засівну колбу додають 1 л композиції В (від ДР 3.4.3) і з інокулятора (І-16) через трубу перетискування посівний матеріал (від ТП 4.6).

Вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку та культивують при температурі 28 °C та культивують впродовж 24 год. Кожні 12 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю, визначення рівня біомаси та титр бактерій. В кінці процесу культивування, орієнтовна концентрація біомаси має сягати 11 г/л, а титр орієнтовно 2×10^9 КУО/мл.

ТП 6. Відділення біомаси

ТП 6.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина з ферментеру (ФР-23) подається в збірник культуральної рідини об'ємом 500 л (Р-24).

Зі збірника (Р-24) відцентровим насосом (Н-25) культуральна рідина подається у фільтрувальну центрифугу (Ц-26), де здійснюється центрифугування при 1500 об/хв, тривалістю 40 хв.

Сконцентровану біомасу вивантажують і вручну вносять у реактор-змішувач (Р-29) об'ємом 10 л, центрифугат подають на стадію знешкодження рідких відходів (ЗВ 11.2).

ТП 7. Одержання напівфабрикату

ТП 7.1. Змішування біомаси із хітозаном

У реактор (Р-27) переносять вологу біомасу приблизно масою 3,6 кг (від ТП 6.1). Додають наважку 688 г хітозану, 344 г хітину, 172 г янтарної кислоти, 344 г глютамінової кислоти, 34,4 г гетероауксину, емульгатору (3 %) 108 мл. Доливають 5 л води питної. Вмикають перемішуючий пристрій реактора на відмітку 50 об/хв і перемішують протягом 10 хв.

ТП 8. Сушіння препарату

Сушіння напівфабрикату здійснюють у стрічковій сушарці (С-28). Для цього отриманий після гомогенізатора продукт завантажують у бункер сушарки.

ТП 8.1. Сушіння на стрічковій сушарці

У бункер переливаємо отриманий розчин препарату (від ТП 7.1) та вмикаємо сушку.

Сушіння здійснюють протягом пари хвилин при температурі, яка дорівнює 100 °С до вологості 5-6 %.

ТП 9. Подрібнення та просіювання

ТП 9.1. Подрібнення

Подрібнення препарату здійснюється на барабанній дробарці (Д-29).

Висушений препарат (від ТП 8.1) завантажують безпосередньо в зафіксований у вертикальному положенні барабан дробарки, після чого він закривається кришкою. Подрібнення здійснюють до заданого діаметру часток 20 мм протягом 30 хв.

ТП 9.2. Просіювання

Висушену масу препарату (від ТП 9.1) завантажується у просіювальну машину (ПМ-30), де проходить через ряд сит з діаметром отворів 20 мм.

Просіювання здійснюється протягом 30 хв.

Фракції розміром менше 20 мм йдуть на подальше пакування.

ПМВ 10. Фасування та пакування

ПМВ 10.1. Фасування висушеної біомаси

Фасування біомаси здійснюють на фасувальному автоматі (ФМ-31) у поліетиленові пакети по 0,1 кг.

Подрібнений і просіяний порошок біомаси (від ТП 9.1) подається у накопичувальний бункер вагового фасувального автомату, звідки за допомогою вагового дозатора фасується по 0,1 кг (за розрахунками вистачить на 4,5 га поля) у поліетиленові пакети, які формуються на пристрої для формування 3-х шовної упаковки, далі пакети запаюються за допомогою вузла запаювання поздовжнього і поперечних швів упаковки та маркуються.

ПМВ 10.2. Пакування у коробки

Пакування поліетиленових пакетів з порошком біомаси (від ПМВ 10.1) у картонні коробки здійснюється вручну. Коробки відвантажуються на склад.

ЗВ 11. Знешкодження відходів

Стічні води біотехнологічних виробництв можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху стічні води спрямовують на очисні споруди. Відпрацьоване аераційне повітря знешкоджують.

ЗВ 11.1. Знешкодження газоподібних відходів

Повітря, що видаляється з ферментера, містить велику кількість мікроорганізмів. Повітря має високу вологість. Для відділення вологи використовують тканинні сітки з нержавіючого матеріалу або термостійкого пластику. На них сепарується близько 99% вологи.

Для очищення і стерилізації повітря, що виходить з ферментера, використовують фільтруючі елементи з мікрОВОЛОКОН боросилікатного скла. Фільтр з такого матеріалу має високу стерилізуючу здатність (до 99,99 %) і добре

вловлює частинки розміром більше 0,6 мкм. Очищене повітря викидається через трубу розсіювання.

ЗВ 11.2. Знешкодження рідких відходів

Схема очищення стічних вод включає наступні етапи:

1) Механічне очищення. Здійснюється відстоюванням або фільтрацією. В результаті механічного очищення кількість мінеральних забруднень знижується на 60-70%, а БСК - на 30%. Крім того, проведення даного етапу очищення дуже важливо для встановлення рівномірного руху стоків (їх усереднення), що дозволяє уникнути значних коливань об'єму стічних вод на наступному біологічному етапі [39].

2) Біологічне очищення – за допомогою біофільтрів. Принцип дії біофільтра полягає в наступному: водорозподільний пристрій забезпечує рівномірне зрошення стічною водою поверхні завантаження біофільтра, дренажний пристрій служить для видалення очищеної стічної води. Знизу подається постійний потік повітря для аерації.

При контакті стічної води з біоплівкою відбувається сорбція органічних забруднень поверхнею біоплівки. Під час паузи між зрошеннями сорбовані забруднення окиснюються, і відновлюється сорбційна активність біоплівки. У біофільтрі відбувається безперервний приріст і відмирання біоплівки. Відмерла плівка виноситься проточною водою і осідає у вторинних відстійниках.

РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

В процесі культивування періодично відбирають проби з культуральною рідиною для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси (яка і є цільовим продуктом) і колоній утворюючих одиниць, а також вмісту джерела вуглецю (пшеничні висівки).

Всі показники росту культури заносять у лабораторний журнал.

Відбір проби

Кожні 12 години здійснюється відбір проб культуральної рідини. Через пробовідбірник відбирається три проби по 100 мл культуральної рідини.

Пробу перевіряють на наявність сторонньої мікрофлори, КУО, та концентрацію біомаси.

Мікробіологічний контроль

Для визначення чистоти культури використовують одночасно два способи: мікроскопіювання та висів на поживні середовища.

Мікроскопіюванням проби культуральної рідини проводять для визначення чистоти препарату. Його здійснюють методом «роздавлена крапля», який дозволяє визначити розміри, форму, розмноження, рухомість та морфологічну однорідність клітин. Для приготування препарату «роздавлена крапля» на середину чистого та знежиреного предметного скла наносять невелику краплю суспензії клітин стерильною петлею. За допомогою стерильної петлі на предметному склі роблять мазок, збільшуючи діаметр суспензії клітин. Потім проводять фіксацію висушеного мазка в полум'ї спиртівки. За допомогою генціановий фіолетовий препарат фарбують, зливають фарбу, мазок на 2 хв заливають розчином Люголя до почорніння, розчин зливають та прополіскують 96%-им етиловим спиртом. Зливають спирт поки мазок не знебарвиться, промивають водою та підсушують. За допомогою імерсійного об'єктива (x90) вивчають виготовлений фіксований пофарбований препарат бактерій [96].

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ									
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА				Літ.	Арк.	Акрушів			
Розроб.	Танана										87	87		
Перевір.	Буценко								Кафедра БТМ					
Консультант														
Н. Контр.														
Затверд.	Пирог Т.П.													

Прямі паличкоподібні клітини з закругленими кінцями розміром $1,8 \times 0,5$ мкм, розташовані поодинокі, попарно, рідше в ланцюжках; рухливі за допомогою джгутиків. При зростанні на МПА при температурі 28°C на 17-18 год інкубації утворюють еліпсоїдної форми ендоспори, розташовані в клітці субтермінально. Мають грампозитивний морфотип. *B. amyloliquefaciens* дає характерний ріст на триптон-соевому агарі (рис. 6.1) з формуванням сильно складчастих колоній з куполообразним центром і порізаним краєм, в'язкої консистенції тілесного кольору. [9].

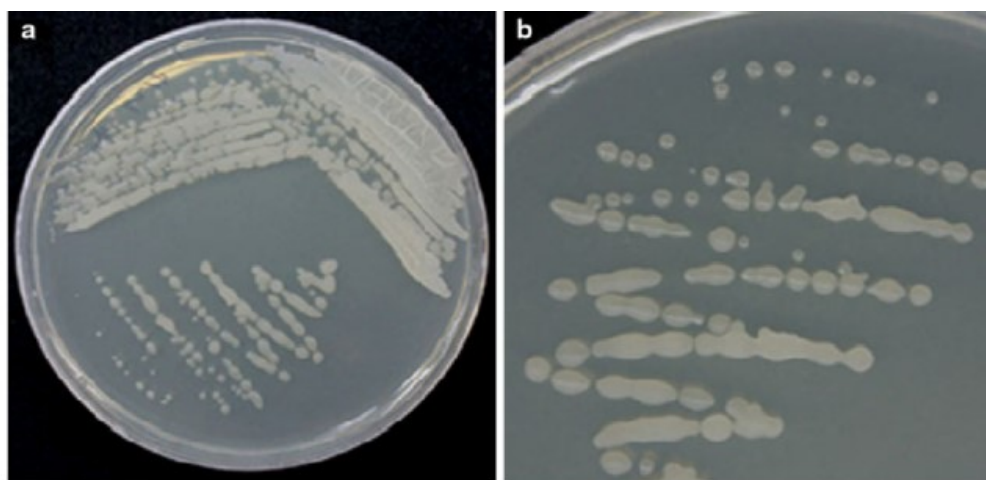


Рис. 6.1. Колонії бактерій *B. amyloliquefaciens* на ТСА

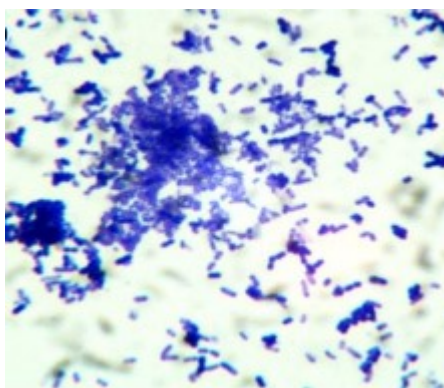


Рис. 6.2. Клітини *B. amyloliquefaciens* (синього кольору) у мікроскопі (x90)

Чистоту культур мікроорганізмів обов'язково перевіряють висівом на поживні середовища. При перевірці чистоти маточної культури та культуральної рідини під час основної ферментації, у пробах повинні виявлятися лише колонії

біологічного агента – *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008, в іншому випадку продукція вважається зіпсованою.

Для виявлення сторонньої мікрофлори культуральну рідину розсівають на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій (культивують за температури 37 °С, протягом 24 годин) і з сусло-агаром (СА) для виявлення дріжджів та грибів (культивують за 30 °С, протягом 48-72 годин). Після закінчення терміну інкубації проводять перегляд чашок на наявність контамінуючої мікрофлори.

Концентрація біомаси.

Цільовим продуктом є біомаса *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008. Концентрацію біомаси визначають ваговим методом. Для цього спочатку осаджують крейду, яка знаходиться в культуральній рідині за допомогою соляної кислоти, потім відділяємо осаджену крейду і центрифугуємо культуральну рідину. Для цього відбирають 25 мл культуральної рідини, центрифугують при 5000 об/хв протягом 15 хв, осад клітин після центрифугування двічі промивають від залишків поживного середовища дистильованою водою. Відмитий осад суспендують у дистильованій воді, переносять у попередньо зважені бюкси і висушують до постійної маси. Далі перераховують на вміст у г/л [97].

Кількість життєздатних клітин (КУО/мл).

Визначається за методом Коха (послідовних десятикратних розведень клітинної суспензії на чашки Петрі з МПА). Кількість життєздатних клітин визначають за кількістю колоній, які виросли на чашках.

Суть методу полягає у висіві певного об'єму досліджуваної суспензії на агаризоване середовище (у чашки Петрі) з наступним підрахунком кількості колоній, що виросли. Цей метод дає змогу здійснювати облік тільки життєздатних клітин. Однак визначення за методом Коха є довготривалим: потребує інкубування штаму бактерії протягом 2 – 3 діб.

Для аналізу в асептичних умовах відбирають 1 мл клітинної суспензії і поміщають у 9 мл стерильної водопровідної води або фізіологічного розчину,

потім послідовно новою піпеткою переносять по 1 мл у ряд пробірок з 9 мл стерильної водопровідної води.

Ступінь розведення визначається передбачуваною кількістю клітин у зразку. Кількість розведень тим більша, чим більше мікроорганізмів міститься у вихідному зразку.

З одержаних (попередньо ретельно перемішаних) розведень здійснюють висів на поверхню агаризованого середовища у чашки Петрі. Висів здійснюють зазвичай по 0,05–0,1 мл, починаючи з найбільшого розведення. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні агаризованого середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Для кожного розведення використовують нову стерильну піпетку і новий стерильний шпатель. Чашки Петрі поміщають у термостат, і через 3–5 діб здійснюють підрахунок колоній. Точність методу залежить від кількості підрахованих колоній: кращим розведенням вважають таке, за умови висіву з якого на агаризованому середовищі виростає від 50 до 150 колоній.

Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецю в середовищі культивування є пшеничні висівки котрі на 50 % складаються з вуглеводів, через це складно виділити конкретний вуглевод із суміші, тому так як всі вуглеводи розкладаються на моноцукри ми будемо визначати концентрацію глюкози.

Її концентрацію визначають за допомогою датчика. Він являє собою кисневий електрод, який вкритий плівкою з іммобілізованою глюкозооксидазою.

Підготовка проби полягає в центрифугуванні культуральної рідини при 5000 об/хв на протязі 15 хв, щоб відділити біомасу від поживного середовища. Об'єм досліджуваної проби 50 мкл.

Принцип методу полягає в тому, що глюкозооксидаза каталізує перенесення двох водневих атомів з першого вуглецевого атома глюкози на кисень, розчинений в рідкому реагенті. При цьому в ході реакції утворюється в еквімолярних кількостях перекис водню. Тобто концентрація перекису водню, що утворився, точно дорівнює концентрації глюкози в культуральній рідині (рис.6.3).

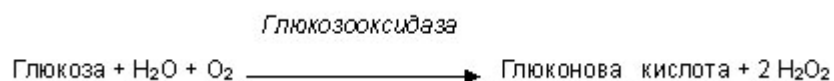


Рис 6.3 Реакція перетворення глюкози

Кількість перекису водню, що утворився визначається амперометричним методом, тобто електричний сигнал, утворений в результаті реакції, перетворюється в постійну напругу і вимірюється аналого-цифровим перетворювачем [98].

Контроль отриманого продукту

Визначення кількості життєздатних клітин висівом на щільні поживні середовища (чашковий метод Коха)

Метод широко застосовують для визначення чисельності життєздатних клітин у різних природних субстратах і в лабораторних культурах. У його основі лежить принцип Коха, відповідно до якого кожна колонія є потомством однієї клітини. Це дозволяє, обрахувавши кількість колоній, що вирости після посіву на щільне поживне середовище певного об'єму досліджуваної суспензії, судити про вихідний вміст у ній клітин мікроорганізмів. Результати кількісного обліку мікроорганізмів, проведеного методом Коха, часто виражають не в числі клітин, а в умовних одиницях – так званих колонієутворювальних одиницях (КУО). Визначення проводиться у три етапи: приготування розведень, посів на щільне середовище в чашки Петрі й підрахунок виростлих колоній.

Приготування розведень. Для одержання ізольованих колоній необхідно приготувати ряд послідовних розведень. Розведення готують у стерильній водопровідній воді або 0,9%-вому розчині NaCl. У ході дослідження доцільно використати однаковий коефіцієнт розведення, наприклад 10, що зменшує ймовірність помилки. Для приготування розведень стерильну водопровідну воду розливають по 9 мл у стерильні сухі пробірки. Потім 1 мл досліджуваної суспензії стерильною піпеткою переносять у пробірку з 9 мл стерильної води - це 1-ше розведення. Отримане розведення ретельно перемішують новою стерильною піпеткою, вбираючи в піпетку й випускаючи з

неї отриману суспензію. Цю процедуру виконують 3...5 разів, потім тією же піпеткою відбирають 1 мл отриманої суспензії й переносять в 2-гу пробірку – одержують 2-е розведення. У такий же спосіб готують і наступні розведення. Ступінь розведення залежить від щільності досліджуваної популяції мікроорганізмів; відповідно він тим більше, чим більше щільність популяції. Для аналізу буде використане поживне середовище Сабуро та ступінь розведення 10^{10} .

Посів. Висівати суспензію можна поверхневим або глибинним способом. Поверхню агаризованих середовищ перед посівом рекомендується підсушувати для видалення конденсаційної води. Після того як середовище готове, на його поверхню стерильною піпеткою наносять точно відміряний об'єм (0,05 або 0,1 мл) відповідного розведення й розподіляють його стерильним шпателем по поверхні середовища. Висіви на щільне середовище проводять, як правило, із трьох останніх розведень, причому з кожного роблять 2...4 паралельних висіви. Посіви можна робити однією піпеткою, але при цьому починати треба обов'язково з більшого розведення. Для кожного розведення використовують новий стерильний шпатель. Після посіву чашки Петрі поміщають у термостат кришками вниз. При глибинному посіві точно відміряний об'єм (як правило 0,1, 0,5 або 1,0 мл) вихідної суспензії або розведення вносять у розплавлене й охолоджене до 48...50°C агаризоване середовище, ретельно перемішують і потім негайно виливають у чашку Петрі. Коли середовище застигне, чашки Петрі перевертають догори дном і поміщають у термостат.

Підрахунок колоній. Колонії мікроорганізмів залежно від швидкості росту підраховують через 2...15 доби інкубації. Кращим розведенням варто вважати те, при висіві з якого в чашці Петрі виростає від 30...50 до 100...150 колоній. Якщо кількість вирослих колоній виявилось менше 10, то ці результати для розрахунку кількості клітин у вихідному матеріалі не використовують. Результати паралельних висівів з того самого розведення підсумують і визначають середню кількість колоній. Кількість клітин в 1 мл досліджуваного субстрату обчислюють за формулою:

$$M = a \times 10^n / V,$$

де M – кількість клітин в 1 мл суспензії; a – середня кількість колоній при висіві розведення, з якого зроблений висів; V – об'єм суспензії, узятий для посіву, мл; 10^n – коефіцієнт розведень [99].

Визначення вологості

Визначення вологості препарату після сушіння буде проводитися за допомогою вологоміра радарного типу TRIME-GW (рис. 6.4) [100].



Рис 6.4 Вологомір TRIME-GW

TRIME-GW – пристрій для вимірювання вологості сипучих матеріалів. Суть методу його роботи полягає в тому, що діелектрична проникність будь-якого матеріалу залежить від вмісту в ньому води. Оскільки діелектрична проникність води значно перевищує цей же параметр інших речовин, узагальнена діелектрична проникність вологої речовини в основному є функцією об'ємного вмісту в ньому води. Крім усього іншого, що є важливим, вона не залежить від хімічного складу речовини.

Принцип визначення. Електроди датчика (зонда) поміщаються в масу сипучого матеріалу і створюють в ньому високочастотне електромагнітне поле. Характеристики протікаючого при цьому в ланцюзі датчика електричного процесу змінюються в залежності від величини діелектричної проникності (тобто вологості) матеріалу. Порівняння змінених параметрів з контрольними значеннями дозволяє визначити вологість матеріалу з високою точністю. Вимірювання зазвичай проводяться з усередненням на деякому часовому інтервалі. Оскільки поле проникає в певний обсяг матеріалу (зазвичай 1 ... 2 дм³),

а також і в глибину частинок фракцій матеріалу, результати вимірювань відображають реальну вологість по всьому об'єму, що захоплює датчик. Обробка результатів вимірювань і можливість підключення датчика до будь-якої системи регулювання дозволяють використовувати вологоміри типу TRIME-GW в автоматизованих процесах сушіння для вирішення завдань вимірювання і контролю вологості матеріалів [26].

Карту постадійного контролю виробництва наведено у *табл. 6.1*.

Таблиця 6.1

Карта постадійного контролю біосинтезу біомаси

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ДР 1. Приготування та стерилізація титрувальних агентів				
Кх 1.1 Приготування 6-% розчину HCl	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C = 6%
Кх, Кт 1.2 Приготування і стерилізація 9 %-го розчину NH ₄ OH	Концентрація розчину NH ₄ OH, температура, час, стерильність	Хімічний метод, Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	C = 6%, P=0,05 МПа, t=131 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 2. Підготовка аераційного повітря				
Кт 2.2. Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 2.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,3-0,5 МПа t = 120-250 °C
Кт 2.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Охолоджене повітря, повітря після видалення зайвої вологи, температура	Термометр технічний, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	t = 20 °C, W = 60-65 %
Кт 2.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 30-40 °C

Кт 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі головного очищення	E = 95 %, тиск згідно паспорту
Кт 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,995 %
ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища				
ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках				
Кт, Км 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6 л				
Кт, Км 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2. Приготування та стерилізація	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °C, τ = 40 хв,

композиції Б		контроль		відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,15$ МПа, $t=131$ °С, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л				
Кт, Км 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,05$ МПа, $t=112$ °С, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,15$ МПа, $t=131$ °С, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,15$ МПа, $t=131$ °С, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 600 л				
Кт, Км 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,05$ МПа, $t=112$ °С, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,15$ МПа, $t=131$ °С, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,15$ МПа, $t=131$ °С, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
ТП 4. Підготовка посівного матеріалу				
Кт, Км 4.4 Вирощування	Посівний матеріал, тривалість вирощування,	Термометр технічний, годинник, тахометр,	Після вирощування культури в колбах на качалках	$t = 28^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год,

інокуляту в колбах на качалках	температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	спектрофотометричний метод, мікробіологічний контроль		pH =7,0, n = 200 об/хв, X=5,5 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, pH, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, датчик pH, спектрофотометричний метод, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	$\tau = 12$ год, $t = 28^{\circ}\text{C}$, pH =7,0, X=5,5 г/л, n =20-250 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, pH, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, датчик pH, спектрофотометричний метод, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	$\tau = 12$ год, $t = 28^{\circ}\text{C}$, pH =7,0, X=5,5 г/л, n =20-250 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 5. Виробничий біосинтез				
Кт, Км, Кх 5.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, швидкість перемішування, температура, pH, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, КУО	Термометр технічний, годинник, датчик pH, спектрофотометричний метод, ВВЕРХ, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль та визначення рівня біомаси проводять кожні 12 годин, КУО визначається після закінчення процесу культивування	$t = 28^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, pH =7,0, n =20-600 об/хв, X=11 г/л, $T=2 \times 10^9$, відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 6. Відділення біомаси				
Кт 6.1 Центрифугування культуральної рідини	Частота обертів, тривалість процесу	Тахометр, годинник	Частота обертів перевіряється безпосередньо під час центрифугування	$\tau = 40$ хв, n = 1500 об/хв

ТП 7. Одержання напівфабрикату				
Кт 7.1 Змішування біомаси із хітозаномсередовищем	Частота обертів, привалість процесу	Тахометр, годинник	Частота обертів перевіряється безпосередньо під час процесу	$\tau = 10$ хв, $n = 50$ об/хв
ТП 8. Сушіння препарату				
Кт 8.1 Сушіння у стрічковій сушарці	Температура, тривалість процесу, вологість	Термометр технічний, годинник, вологомір	Під час процесу, вологість перевіряють після процесу	$t = 100$ °C, $\tau = 5$ хв $W = 5-6$ %
ТП 9. Просіювання препарату				
Кт 9.1 Подрібнення	Висушений препарат, час, діаметр часток	Годинник	Діаметр часток задається перед подрібненням	$\tau = 30$ хв $d = 20$ мм
Кт 9.2 Просіювання	Діаметр часточок продукту	Ситовий аналіз, годинник	Після подрібнення	$d = 20$ мм, $\tau = 30$ хв
ПМВ 10. Пакування та маркування готового продукту				
Кт 10.1 Пакування продукту	Кількість препарату, КУО, вологість	Ваги, визначення КУО методом Коха, вологомір	Під час пакування	$m = 0,1$ кг/пакет, 2×10^9 КУО/г, $W = 6-8$ %

ВИСНОВКИ

1. В результаті аналізу літературних джерел, вияснили, що ключовими параметрами біологічної активності хітозану є молекулярна маса і ступінь деацетилювання. Низькомолекулярні форми хітозану можуть проникати в клітини та індукувати репрограмування процесів метаболічного синтезу. Високомолекулярний хітозан утворює плівку на поверхні інфікованих рослинних тканин і запобігає подальшому поширенню патогенів.

2. В ході вибору біологічного агента за допомогою даних з наукових статей, було встановлено, що використання штаму *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 разом із хітозанами у складі комбінованого препарату дозволить нам отримати всесторонній препарат для захисту зернових культур, де *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 проявляє фунгіцидну та рістстимулюючу дію, в той же час як хітозани стимулюють певні процеси у рослинах, що призводять до різних захисних реакцій рослин-господарів у відповідь на мікробні інфекції.

3. Для отримання препарату на основі біомаси було обрано глибинний спосіб культивування *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 при температурі 28 °С, рН 7-7,2 та швидкості перемішування 220 об/хв. Середовище для культивування для виробничого ферментера (600 л) складається з 3 композицій. За один цикл виробництва за даних умов можна отримати 382 л культуральної рідини.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Atkinson, N. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field / Atkinson, N., Urwin, P. // *Journal Of Experimental Botany*. – 2012. – №63(10). – p. 3523–3543
2. Naik P. Abiotic and Biotic Elicitors–Role in Secondary Metabolites Production through In Vitro Culture of Medicinal Plants / Naik P., Al-Khayri J. // *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives* / Naik P., Al-Khayri J., 2016. – (247-277).
3. García-Garrido J. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis / García-Garrido J., Ocampo J. // *Journal of Experimental Botany*. – 2002. – №53(373). – p. 1377–1386.
4. Somssich IE. Pathogen defence in plants: a paradigm of biological complexity / Somssich IE., Hahlbrock K.. // *Trends in Plant Science*. – 1998. – №3. – p. 86–90.
5. Thakur M. Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review / Thakur M., Sohal B.. // *ISRN Biochemistry*. – 2013. – №2013. – p. 1–10.
6. Van Loon L. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins / Van Loon L., Van Strien E.. // *Physiological And Molecular Plant Pathology*. – 1999. – №55(2). – p. 85–97.
7. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways / La Camera S., Gouzerh G., Dhondt S. et.al.]. // *Immunological Reviews*. – 2004. – №198(1). – p. 267–284
8. Vogt T. Phenylpropanoid Biosynthesis / Vogt T.. // *Molecular Plant*. – 2010. – №3(1). – p. 2–20.
9. The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective / Dixon R., Achnine L., Kota P. et. al.]. // *Molecular Plant Pathology*. – 2002. – №3(5). – p. 371–390.
10. Озерецковская О.Л. Хитозан как элиситор индуцированной устойчивости растений / Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И. // *Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение* / Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И.. – Москва: Наука, 2002. – С. 280–360.

11. Соколов Ю.А. Элиситоры и их применение / Соколов Ю.А.. // Весці нацыянальнай акадэміі навук беларусі. серыя хімічных навук. – 2014. – №4. – С. 109–118.
12. A Future Perspective in Crop Protection: Chitosan and its Oligosaccharides / Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B., Bhanu A.. // Advances In Plants & Agriculture Research. – 2014. – №1. – p. 1–8.
13. Brine C. Advances in chitin and chitosan / Brine C., Sandford P., Zikakis J.. – London: Elsevier Applied Science, 1992.
14. White S. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii* / White S., Farina P., Fulton I.. // Appl. Environ. Microbiol.. – 1979. – №38(2). – p. 323–328.
15. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. / Teng W., Khor E., Tan T. et.al.]. // Carbohydrate Research. – 2001. – №332(3). – p. 305–316.
16. Rane K. Production of Chitosan by fungi / Rane K., Hoover D.. // Food Biotechnology. – 1993. – №7(1). – p. 11–33.
17. Knorr D. Potential of acid soluble and water soluble chitosan in biotechnology / Knorr D., Beaumont M., Pandya Y. // Chitin and chitosan / Knorr D., Beaumont M., Pandya Y.. – London, New York: Elsevier Appl. Sci., 1989.
18. Anitha A., Sowmya S., Sudheesh P.T., Kumar S. D., Chennazhi, K. P. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. 2014, 39 (9): 1646.
19. Hossain M.S., Iqbal A. Production and characterization of chitosan from shrimp waste. J. Bangladesh. Agril. 2014, 12 (1): 155-158.
20. Narguess H.M., Emtithal E.S., Taher S., Gamal R.S., Ahmed H.M. Isolation and characterization of chitosan from different local insects in Egypt. International Journal of Biological Macromolecules. 2015, 82 (1): 871-877.
21. Гартман О.Р., Воробьева В.М. Технология и свойства хитозана из рачка гамарус. Алтайский государственный медицинский университет. 2013, 6 (5): 1188-1192.
22. Козырева Е.В., Абрамов А.Ю., Шиповская А.Б. Особенности физико-химических свойств растворов хитозана. Саратовский государственный университет. Институт химии, базовая кафедра полимеров. 2015, 82 (1): 27-28.

23. Teli M., Javed S. Extraction of chitosan from shrimp shells waste and application in antibacterial finishing of bamboo rayon. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2012, 50 (5): 1195-1200.
24. Ming T., Yena J.H., Yangb Jeng-Leun M. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*. 2009, 75 (1): 15-21.
25. Tolaimateabc A., Desbrièresb J.M., Rhaziac A., Alaguic M., Vincendond P.V. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer*. 2000, 41 (7): 2463-2469.
26. Sams C.E., Zivanovic S., Charron C.S., Wu T., Blodgett A.B., Conway W.S. Fungal chitosan extracts are as effective in reducing decay caused by *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, and *Penicillium solitum* as commercial seashell chitosa. *Phytopathology*. 2004, 95 (1): 1145-1148.
27. Natali M.O., Sandra P. O., Diego F.R., Paola A.Z. Isolation of chitosan from *Ganoderma lucidum* mushroom for biomedical applications. *J. Mater. Sci.: Mater Med*. 2015, 26 (135) : 4-8.
28. Shinsuke I. Chitin and Chitosan Nanofibers: Preparation and Chemical Modifications. *Molecules*. 2014, 19 (1): 18367-1838.
29. John A., Fei L., Hamid M., Fang Z.. Characterization of tara gum edible films incorporated with bulk chitosan and chitosan nanoparticles: A comparative study. *Food Hydrocolloids*. 2015, 44 (1): 309-319.
30. Vinod S., Garima S., Meena Y., Manju K., Palc R., Raliyad P.B. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu–chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015, 75 (1): 346-353.
31. Seyed F., Hosseinia M., Rezaeia M., Zandib F. F.. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. *Food Chemistry*. 2016, 194 (1): 1266-1274.
32. Moacir F. Q., Karoline R. T., Diego A. S., Guilherme L. S. Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation. *Marine drugs*. 2015, 1 (13): 141-158.
33. Nicoletta R., Elena F., Ilaria A., Rebeca H., Carmen M., Rossana P., José M.K. Use of alginate, chitosan and cellulose nanocrystals as emulsion stabilizers in the synthesis of

- biodegradable polymeric nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2015, 445 (1): 31-39.
34. Federico L.M., Maria F., Pascual M.P., Jesus E., Eduardo P., Jose M.S. Carbon and nitrogen limitation increase chitosan antifungal activity in *Neurospora crassa* and fungal human pathogens. *Fungal Biology*. 2014, 119 (3): 154-169.
 35. Miao Q., Chu W., Gerui R., Xinle L., Xiangyang W., Jianying H. Effect of chitosan and its derivatives as antifungal and preservative agents on postharvest green asparagus. *Food Chemistry*. 2014, 155 (15): 105-111.
 36. Francesca S., Patrizia P., Teresa M., Amalia P., Maria R., Lauro P., Russo R., Patrizia A. Technological properties and enhancement of antifungal activity of a *Paeonia rockii* extract encapsulated in a chitosan-based matrix. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, 120 (1): 260-267.
 37. Yuan L.D., Slomberg M., Schoenfisch H. Nitric oxide-releasing chitosan oligosaccharides as antibacterial agents. *Biomaterials*. 2014, 35 (5): 1716-1724.
 38. Paul A.L., Jacob S., John P.H., Claude B., Ralf K., Val'erie V., Lindsay R.T., Jochen B., Ned A.T., Jan E.L. Characterization of the *Xanthomonas translucens* Complex Using Draft Genomes, Comparative Genomics, Phylogenetic Analysis, and Diagnostic LAMP Assays. *Bacteriology*. 2017, 107 (5): 519-521.
 39. Akira K., Koji T., Toshiaki T. Molecular epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolated from barley and wheat infected with bacterial black node. *Journal of General Plant Pathology*. 2011, 85 (1): 162–168.
 40. Timothy D.M., Brenda K.S., William L.S., Douglas G.L., Aaron S., Elizabeth E.R., Sergei A.S. *Rathayibacter toxicus*, Other *Rathayi* bacter Species Inducing Bacterial Head Blight of Grasses, and the Potential for Livestock Poisonings. *Phytopatology*. 2017, 107 (7): 804-808.
 41. Montaser F.A., Gabr M.R. *Bacillus megaterium*, a new pathogen on lupine plants in Egypt. *Biology*. 2012, 31 (8): 567-569.
 42. GLINUSHKIN A.P., BELOSHAPKINA O.O., SOLOVYKH A.A., SUDARENKOV G.V. Bacterial Diseases of Wheat in the Southern Ural: Manifestations, Biological

- Characteristics and Monitoring Features. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 2016, 51 (1): 158-162.
43. Robert C., Grzegorz J.G., Jan M., Schoenfisch H. Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *Eur. J. Plant. Pathol.* 2008, 125 (1): 263-275.
44. Eder M., Rafaela C.F., Carlos H.U. Identificação e patogenicidade de *Pseudomonas cichorii* associada ao crestamento bacteriano da gérbera no Distrito Federal. *Horticultura Brasileira*. 2016, 34 (2): 171-174.
45. Rudolf E., Karl-Heinz G. The *Clavibacter michiganensis* Subspecies: Molecular Investigation of Gram-Positive Bacterial Plant Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011, 49 (1): 445-452.
46. Ming-Ming Y., Shan-Shan W., Dmitri V.M., Olga V.M., Diter von W., Linda S. T., Jian-Hua G., David M.W. Biological Control of Wheat Root Diseases by the CLP-Producing Strain *Pseudomonas fluorescens* HC1-07. *Biological Control*. 2014, 104 (3): 248-251.
47. Ting-Fang H., Hung-Chang H., Scott E.R., Schoenfisch H. Spread of seed-borne *Erwinia rhapontici* in bean, pea and wheat. *Eur. J. Plant. Pathol.* 2010, 127 (1): 579-584.
48. Tomohiko M., Kazuki M., Takeshi K., Misato S., Kosuke T., Satoru K., Hiroyuki I., Gen-ichiro S., Kaoru T. Genome Sequence of *Pantoea agglomerans* Strain IG1. *Journal of Bacteriology*. 2012, 194 (5): 1258–1259.
49. Р.І. Гвоздяк, Л.А. Пасічник, Л.М. Яковлева, С.М. Мороз, О.О. Литвинчук, Н.В. Житкевич, С.Ф. Ходос, Л.М. Буценко, Л.А. Данкевич, І.В. Гриник, В.П. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин: монографія. Пати́ка – К.:ТОВ «Інтерсервіс». 2011, 444.
50. Marcia G., Mari J.P., Alexander M., Ales S., Rosa M. Glucanases and Chitinases as Causal Agents in the Protection of *Acacia* Extrafloral Nectar from Infestation by Phytopathogens. *Plant Physiology*. 2010, 155 (1): 1705–1710.
51. Ashwani T., Shipra G., Nandini G., Rajesh K. In Vitro antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2011, 54 (6): 125–129.

- 52.35. Jun Y., Waseem R., Qirong S., Qiwei H. Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78 (16): 5942–5944.
53. Giuliano B., Andrés I., Luigi C. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2002, 5 (1): 1145–1148.
54. Abdelbasset E.H., Lorne R.A., Ismail H., Fouad a. Chitosan in Plant Protection. *Mar. Drugs*. 2010, 8 (4): 968-987.
55. Renato G., Anderson E.S., Caroline S. N., Renata L., Kathleen O., Ralf G., Leonardo F.F. Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraqua herbicide: An environmentally safer alternative for weed control. *Journal of Hazardous Materials*. 2014, 278 (1): 163–171.
56. Anderson E.S., Pereiraab P.M., Silvab J.L., Oliveirab H.C., Oliveirac L.F. Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017, 150 (1): 141-152.
57. Homero G.G., Francisca R.G., Hortensia O.O., Adalberto B.M., Valentín R.T., Marcelino C.F. Use of Chitosan-PVA Hydrogels with Copper Nanoparticles to Improve the Growth of Grafted Watermelon. *Molecules*. 2017, 22 (7): 1-5.
58. Hongyan Y., Weixin D., Jiafa L., Ruilin G., Zucong C. Long-term application of organic manure and mineral fertilizers on aggregation and aggregate-associated carbon in a sandy loam soil. *Soil & Tillage Research*. 2012, (1): 170–177.
59. Abdelbasset H., Lorne R.A., Ismail H., Fouad D. Chitosan in Plant Protection. *Mar. Drugs*. 2010, 1 (8): 968-971.
60. Palmeira D., Ribeiro M.P., Palmeira O.R.. Anti-Candida Activity of a Chitosan Hydrogel: Mechanism of Action and Cytotoxicity Profile. *Gynecol Obstet. Invest*. 2010, 70 (1): 322-327.
61. Mounia A., France D., Marie-Claude H., Abdellah A. Mechanism of Action of Electrospun Chitosan-Based Nanofibers against Meat Spoilage and Pathogenic Bacteria. *Gynecol. Obstet. Invest*. 2017, 22 (4): 1-5.

62. Kenawy E.R., Abdel-Hay F.I., Tamer T.M., Abo-Elghit Ibrahim E.M. Antimicrobial activity of novel modified aminated chitosan with aromatic esters. *Polymer Bulletin*. 2020, 77 (1): 1641-1647.
63. Embabya A.M, Ramy R.M., Ahmed Husseinac,.El-Kamelb A.H, Mareyde H.S. Chitosan-induced defence responses in tomato plants against early blight disease caused by *Alternaria solani*. *Sorauer Archives Of Phytopathology And Plant Protection*. 2014, 47 (16): 1963–1973
64. A.Kheiria, Moosawi S.A., Malihipourb J.A., Saremic H., Nikhahd M. Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles and their effect on *Fusarium* head blight and oxidative activity in wheat. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, 102 (1): 526-538
65. Popova E.V., Domnina N.S., Kovalenko N.M., Sokornova S.V. Effect of chitosan and vanillin-modified chitosan on wheat resistance to spot blotch. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016, 52 (4): 537-540
66. A.Kheiria, Moosawi S.A., Malihipourb J.A., Saremic H., Nikhahd M. Application of chitosan and chitosan nanoparticles for the control of *Fusarium* head blight of wheat (*Fusarium graminearum*) in vitro and greenhouse. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, 93 (2): 1261-1272
67. Vanessa G. L., Cendoya E.L.,Nichea M.J., Sofía N.María, Ramirez L. Preliminary Study on the Use of Chitosan as an Eco-Friendly Alternative to Control *Fusarium* Growth and Mycotoxin Production on Maize and Wheat. *Pathogens*. 2019, 8 (29): 2-5
68. Gunupuru L.R., Patell J.S., Sumarah M.W., Renaud J.B., Mantin E.G. A plant biostimulant made from the marine brown algae *Ascophyllum nodosum* and chitosan reduce *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination in wheat *PlosOne*. 2019, 55 (15): 5-7
69. A.Kheiria, Moosawi S.A., Malihipourb J.A., Saremic H., Nikhahd M. Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles and their effect on *Fusarium* head blight and oxidative activity in wheat. *Int J Biol Macromol*. 2017, 102 (1): 529-530

70. N.Benhamou. Potential of the Mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to Protect Citrus Fruit Against *Penicillium digitatum*, the Causal Agent of Green Mold: A Comparison with the Effect of Chitosan. *Phytopathology*.2014, 102 (1): 529-530
71. Циганкова В.А., Андрусевич Я.В, Білявська Л.О., Козирицька В.Є., Іутинська Г.О., Галкін А.П., Галаган Т.О., Болтовська О.В.. Ріст-стимулюючі, фунгіцидні і нематоцидні властивості нових субстанцій мікробного походження та їх вплив на синтез малих si/miРНК в клітинах рослин. *Мікробіологічний журнал*. 2012, 74 (6): 38-40.
72. R.C. Ming-Tsung, Y. Jeng, L.Mauabc. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Sorauer Archives Of Phytopathology And Plant Protection*.2016, 138 (15): 259-264
73. Embabya A. M., Melikaa R.R., Husseinac A., El-Kamelb A. H., Mareyde H.S. Biosynthesis of chitosan-Oligosaccharides (COS) by non-aflatoxigenic *Aspergillus* sp. strain EGY1 DSM 101520: A robust biotechnological approach. *ProcesBiochemistry*. 2018, 64 (1): 16-30.
74. Jin Sung W., Seung Jo L., Hyeon Hwa P., Kyung Bin S., Using a Chitosan-Based Colloid Incorporating Grapefruit Seed Extractfor Cherry Tomato Safety and Preservation. *Journal of Food Science*. 2017, (0): 4
75. Yu-Ying F., Liang Zhang, Yi Yang, Cheng-Wei L., Ying-Na H., Pan Li, Xian Yu. Synergistic antibacterial effect of ultrasound microbubbles combined with chitosan-modified polymyxin B-loaded liposomes on biofilm-producing *Acinetobacter baumannii*. *Waste and Biomass Valorization*. 2019, 14 (1): 1805–1815.
76. Shehataa A.N., Abd El Aty A.A., Darwishc D.A., Abde Wahabb W.A., Mostafab F.A. Purification, physicochemical and thermodynamic studies of antifungal chitinase with production of bioactive chitosan-oligosaccharide from newly isolated *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 107 (1): 990-999.
77. Gomes L.P., Andrade C.T., Del Aguila E.M., Alexander C., Vânia M. F.. Assessing the Antimicrobial Activity of Chitosan Nanoparticles by Fluorescence-Labeling.

Engineering and Technology International Journal of Biotechnology and Bioengineering. 2018, 12 (4): 112–116.

78. Ю.В. Коломієць, П. Григорюк, Л.М. Буценко, Л.О. Білявська Система дії мікробних препаратів на бактеріальні збудники хвороб рослинотварів. Агроєкологічний журнал. 2016, 3 (5): 84-86.

79. Червінський Л.С., Романенко О.І. Електрофізичні методи передпосівної обробки насіння // Науковий вісник. – 2013. – Т. 184, № 1. – С. 127-144

80. Крончев Н.І., Сергатенко С.М., Валяйкина М.В. Влияние минеральных удобрений и биопрепаратов на урожайность и качество зерна яровой пшеницы // Вестник УГСА. – 2011. – Т. 55, № 2. – С. 23-27

81. Р.І. Гвоздяк, Л.А. Пасічник, Л.М. Яковлева, С.М. Мороз, О.О. Литвинчук, Н.В. Житкевич, С.Ф. Ходос, Л.М. Буценко, Л.А. Данкевич, І.В. Гриник, В.П. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин: монографія. Патики – К.:ТОВ «Інтерсервіс». 2011, 444.

82. Міністерство аграрної політики та продовольства України. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.minagro.gov.ua/>

83. Посівний сезон на 2020 рік. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://latifundist.com/posevnaya-online-2017>

84. Бактофит. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://vpoli.ua/ru/fungicidy/baktofit-biofungitsid/>

85. Пирог Т. П., Карлаш Ю. В., Красінко В. О. Основи проектування біотехнологічних виробництв: метод. Рекомендації до викон. курсового проекту для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навчання. К.: НУХТ, 2015. – 87 с.

86. Чеботарь В.К., Казаков А.Е. Новые микробные препараты и удобрения в земледелии России // Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии. – 2009. – С. 1 – 16.

-
87. RU 2478290C2. Биопрепарат для стимуляции роста и защиты растений от болезней, повышения урожайности и почвенного плодородия / Зульфира Ю.С., Наталия Г.З. – Оpubл. 04.10.2013.
88. И.В. Драговоз, Н.О. Леонова, С.В. Лапа, Л.В. Авдеева Экзометаболиты штамма *Bacillus amyloliquefaciens* ИМВ В-7100, определяющие его фитостимулирующую активность. *Физиология растений и генетика*. 2014, 46 (6): 516-524.
89. Л. В. Авдеева, И. В. Драговоз, Ю. В. Корж, Н. О. Леонова, Г. А. Иутинская, А. В. Бережная, В. Н. Купцов, М. Н. Мандрик, Э. И. Коломиец Антагонистическая активность штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ИМВ В-7404 и БИМ В-439Д по отношению к фитопатогенным бактериям и микромицетам. *Мікроб. журнал*. 2014, 76 (6): 27-33.
90. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія // Підручник. – К.: НУХТ. – 2009. – 336 с.
91. Карлаш Ю. В. Основы проектирования біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю. В. Карлаш – К: НУХТ, 2013. – 143 с.
92. Выделение и очистка продуктов биосинтеза [Електронний ресурс] – режим доступу:
https://studbooks.net/964222/ekologiya/vydelenie_produkto_v_biosinteza#32
93. Сушарки в біотехнологічній промисловості [Електронний ресурс] – режим доступу:<http://ukrsheath.ru/rizne/materiali-dlja-likariv/15634-susharki-v-biotechnologichnoi-promislovosti.html>
94. Аналитические просеивающие машины серии AS 200. [Електронний ресурс] – режим доступу:<https://www.retsch.ru/ru/products/sieving/sieve-shakers/as-200-control/function-features/>
95. Високопродуктивна фасувальна машина FZL100. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/fzl-100>

-
96. *Т.П. Пирог, Ю.М.Пенчук.* Технології мікробного синтезу лікарських засобів: метод. рекомендації до викон. курс. роботи для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навч. – К.: НУХТ, 2014. – 59 с.
97. *Коломиец Э. И., Лобанок А. Г.* Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – М.: Белорусская наука, 2015. – 500 с.
98. Анализатор глюкозы «Энзискан Ультра» [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://www.promix.ru/catalog.htm?catalogID=4769>
99. *Красінько В. О., Волошина І. М.* Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навчання / уклад.: В. О. Красінько, І. М. Волошина. – К.: НУХТ, 2014. – 147 с.
100. TRIME-GW анализатор влажности радарного типа [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://rusautomation.ru/analizatory-vlazhnosti/trime-gw>
101. *RU 2322060C1.* Композиция для защиты овощных культур от грибных и бактериальных болезней / Павлюшин В.А., Тютерев С.Л. – Опубл. 20.04.2008.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ

Тези в збірниках конференцій

1. Танана М.В., Буценко Л.М. Властивості хітозанів як перспективних засобів захисту рослин // Матеріали VIII Міжнародної науково-практичної онлайн конференції студентів, аспірантів та молодих вчених « Біотехнологія: звершення та надії» – Київ, 15 листопада 2019 р. – НУХТ – Київ 2020. – с. 67
2. Танана М.В., Буценко Л.М. Чутливість до антибіотиків ізольованих із агрофітоценозу пшениці штамів *P. syringae* pv. *Atrofaciens* // Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів « Наукові здобутки молоді по вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» – Київ, 2-3 квітня 2020 р. – НУХТ – Київ 2020. – с. 406
3. Танана М.В., Буценко Л.М. Застосування хітозанів у сфері захисту рослин // Матеріали X Міжнародної наукової конференції молодих вчених, студентів магістрантів «Actual environmental problems» – Мінськ, 19-20 листопада 2020 р. – Міжнародний державний екологічний університет ім. А. Д. Сахарова – Мінськ, 2020. – с. 156-157

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ «КИЇВСЬКИЙ
ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА

**VIII Міжнародна науково-практична онлайн
конференція студентів, аспірантів та молодих
вчених
«БІОТЕХНОЛОГІЯ: ЗВЕРШЕННЯ ТА НАДІЇ»**

15 листопада 2019 р.

м. Київ

Вступ. В усьому світі існує проблема падіння врожайності цінних харчових культур рослин через високу захворюваність монокультур на різні типи грибкових, вірусних та бактеріальних хвороб. Зазвичай для боротьби з ними застосовують пестициди. Однак останнім часом розробляються більш ефективні та безпечні засоби такі як бактеріальні та полісахаридні препарати. До останніх відносять засоби на основі полісахаридів одним з яких є хітозани.

Результати та їх обговорення. Хітозани – гетерополісахариди глюканової природи. Мають специфічні властивості інгібувати у рослин захисні механізми проти великої кількості хвороб особливо грибкової природи.

Застосовуються у вигляді розчинів якими оброблюють насіння перед посадкою чи вже посаджені площі з молодими рослинами. Основа сфера застосування – агропромисловість, зокрема злакові.

За хімічною структурою хітозан та його похідні є поліглюканами молекулярною масою від 3800 до 20 000 дальтон. Основні представники таких полімерів є хітозан та його ацильоване похідне – хітин. Так як шлях біосинтезу хітозану є лінійним і з утворенням цілої низки ключових ізомерних форм існує цілий ряд ізомерів хітину та хітозану. Більшість з яких утворюється при переході хітозану в ацильовану форму – хітин. Таких ізомерних форм може бути до 6. Це є так зване явище поліморфізму. Близько 90 % хімічних властивостей ізомерів хітозану та хітину спричинені функціональними групами (амінні, ацильні, окси та інші). За структурною ізомерією хітин поділяють на три групи: альфа-хітин, бета-хітин, гамма-хітин. Під структурною ізомерією мається на увазі фундаментальний поділ за кількістю розгалужень та конформацією молекули хітозану.

Механізм активності щодо грибів та бактерій на сьогоднішній день точно не встановлений. Одні літературні джерела стверджують що основна активність хітозану спричинена інактивацією реплікації, що призводить до зупинки множення та поширення. Це може бути пов'язано з тим, що при проникненні в тканини рослин хітозани щільно зв'язують нуклеїнові кислоти і викликають різноманітні пошкодження та селективні гальмування. Наприклад, селективне інгібування може інактивувати синтез мРНК.

Інші стверджують, що основна інгібувальна дія спричинена обмеженням хітозаном доступності мікроелементів та мінеральних речовин для патогенів, що інгібує їх ріст а також формування фізичних бар'єрів, а саме плівок через які патогени не можуть розповсюджуватися на здорові тканини рослин.

Висновки. Хітозан та його похідні можна ефективно використовувати для захисту рослин від різних хвороб викликаних патогенами бактеріальної, грибної та вірусної природи і хоча механізм дії хітозанів недостатньо вивчений, вони мають досить високу активність для економічно-вигідного застосування.

Ministry of Education and Science of Ukraine
National University of Food Technologies

86
International scientific conference
of young scientist and students

"Youth scientific achievements
to the 21st century nutrition
problem solution"

April 2–3, 2020

Part 1

Kyiv, NUFT, 2020

39. Чутливість до антибіотиків ізолюваних із агрофітоценозу пшениці штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

Максим Танана, Людмила Буценко

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Вступ. Сучасні агроєкосистеми є джерелом поширення антибіотикорезистентних мікроорганізмів, що зумовлено інтенсифікацією використання антибактеріальних препаратів у сільському господарстві [1]. Разом із тим дані щодо поширення антибіотикорезистентності в агроєкосистемах нашої країни обмежені, що робить актуальним завданням вивчення чутливості до антибіотиків фітопатогенних бактерій, які в останні роки набувають все більшої агресивності.

Матеріали та методи. В роботі використали ізолювані із сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці штами *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* L11, L16 та штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780, який виділено із ураженої бактеріозом пшениці. Також використано штами *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* I328 і *Xanthomonas vesicatoria* I330. Культивування бактерій здійснювали на картопляному агарі при температурі 28°C упродовж 24-48 годин. Чутливість до антибіотиків визначали за використання дисків з антибіотиками фірми Conda pronadisa. Використовували 10 антибіотиків: стрептоміцин, цефазолін, тетрациклін, цефотаксим, пеніцилін, цефатазим, тобраміцин, еритроміцин, хлорамфенікол, цефтриаксон.

Результати та обговорення. Встановлено, що *P. syringae* pv. *atrofaciens* L11, L16, 9780, *P. syringae* pv. *tomato* I328 і *Xanthomonas vesicatoria* I330 чутливі до стрептоміцину (діаметри зон затримки росту становив 20-35 мм). Цей антибіотик давно використовується у рослинництві багатьох країн, однак не дозволений до застосування у рослинництві нашої країни. У попередніх дослідженнях відділу фітопатогенних бактерій було встановлено, що всі штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* є чутливими до даного антибіотика [2]. Отримані нами результати підтверджують відсутність в агроєкосистемі пшениці в Україні резистентних до стрептоміцину штамів збудника базального бактеріозу. *P. syringae* pv. *atrofaciens* L11, L16, 9780, *P. syringae* pv. *tomato* I328 і *X.vesicatoria* I330 є чутливими до хлорамфеніколу (діаметри зон затримки росту 14-27 мм). Усі досліджувані штами виявилися резистентними до пеніциліну, еритроміцину та цефазоліну. Необхідно зазначити, що штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які резистентні до цефазоліну, в агроєкосистемі пшениці України виявлено вперше, що свідчить про зростання резистентності до антибіотиків у цій екологічній ніші.

Висновки. Агроєкосистема пшениці є екологічною нішею, у якій виявляються штами фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens* із набутою резистентністю до антибіотиків, які не використовуються в рослинництві України, що необхідно враховувати у визначенні векторів поширення антибіотикорезистентності серед мікроорганізмів.

Література

1. Симочко Л.М (2017), Антибіотикорезистентні мікроорганізми в агроєкосистемах як чинних ризику для здоров'я людини, *Агроєкологічний журнал*, 2 (1), с. 201-202.
2. Булеца Н.М., Буценко Л.М., Пасічник Л.А., Патика В.П.. (2015), Чутливість фітопатогенних бактерій до стрептоміцину за дії пестицидів. *Мікробіологічний журнал*, 77 (6), с. 63.

BELARUSIAN STATE UNIVERSITY

Establishment of Education
«International Sakharov Environmental Institute»



ACTUAL ENVIRONMENTAL PROBLEMS

Proceedings of the X International
Scientific Conference of young scientists,
graduates, master and PhD students

November 19–20, 2020
Minsk, Republic of Belarus

APPLICATION OF CHITOSANS IN THE FIELD OF PLANT PROTECTION

T. Maksym

*National University of Food Technologies,
Kiev, Ukraine*

During their life cycle, plants are exposed to a significant number of biotic and abiotic stresses. The plant organism's responses to negative external factors are very complex and include physiological changes at the tissue and cellular levels [Atkinson, 2012]. Recognition of inducers and signaling molecules is one of the ways to implement their own defense mechanisms. Their inducers are abiogenic and biogenic chemical compounds that induce responses to stress in plants. This leads to enhanced synthesis and accumulation of secondary metabolites or to the synthesis of new compounds [Naik, 2016].

Inductors can be generated by external factors (exogenous inducers) or due to physical and / or chemical destruction of the plant cell wall (endogenous inducers) [García-Garrido, 2002]. After the inducer is perceived, signal transduction channels are activated, causing an increase in the level of reactive oxygen species (ROS), biosynthesis of phytoalexins, strength of the plant cell wall by phenylpropanoid compounds, callose precipitation, synthesis of protective enzymes and accumulation of PR proteins, some of which have antimicrobial properties.

Phenolic compounds are one of the most important non-enzymatic elements of the system of plant defense mechanisms. They are not only an indicator of the stress responses of plants to different levels of light or minerals, but are also key mediators in the fight against pathogens [La Camera, 2004]. The functions of phenols in defense mechanisms range from pre-formed or induced physicochemical barriers from pathogens to signaling molecules that are involved in local and systemic signals to induce the expression of the respective genes. The protective functions are not limited to individual phenylpropanoid compounds, but they can be performed by both simple hydroxycinnamic acids and monolignols, and more complex flavonoids, isoflavonoids, stilbene, etc. [Dixon, 2002].

Among the polysaccharides, one of the most famous inducers are oligosaccharide fragments of the fungal cell wall, such as oligomers of chitin, chitosan and β -1,3-glucans, as well as oligogalacturonides, fragments of plant cell wall pectin. Chitosan is the most linear polysaccharide, consisting of α , 1-4 D-glucosamine (GlcN) and N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) with different compositions of these two monomers [Katiyar, 2014].

For chitosan, due to the specificity of its production, there is a characteristic structural heterogeneity, which affects its biological properties. The key parameters of the biological activity of chitosan are its molecular weight and the degree of deacetylation. As in many other polymers, the molecular weight of chitosan varies widely from 1–2 kDa in oligomers to several hundred kDa in high molecular weight forms. Low molecular weight forms of chitosan can penetrate into cells and induce reprogramming of metabolic synthesis processes.

High molecular weight chitosan forms a film on the surface of infected plant tissues and prevents further spread of pathogens.

The production of chitin and chitosan by fungal mycelium is receiving particular attention today due to its significant benefits. For example, if the supply of crustacean waste is limited by the season and region of the fishing industry, then mushroom mycelium can be obtained through a convenient fermentation process without any geographical or seasonal restrictions. The amount of inorganic substances in the fungal mycelium is lower than in the crustacean waste, so a demineralization step is not necessary [Teng, 2001]. The characteristics of chitin and chitosan of crustaceans can vary greatly depending on the physicochemical properties, while fungal chitin and chitosan have a relatively constant composition due to the controlled conditions of the biosynthesis process. Obviously, fungal chitin and chitosan are more effective in inducing resistance responses in plants, and they are potentially more suitable for protecting crops.

BIBLIOGRAPHY

1. *Atkinson, N.* The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field / Atkinson, N., Urwin, P. // *Journal Of Experimental Botany*. – 2012. – №63(10). – p. 3523–3543.
2. *García-Garrido J.* Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis / García-Garrido J., Ocampo J. // *Journal of Experimental Botany*. – 2002. – №53(373). – p. 1377–1386.
3. *La Camera S., Gouzerh G., Dhondt S. et.al.* Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathway. *Immunological Reviews*. – 2004. – №198(1). – p. 267–284.
4. *Dixon R., Achnine L., Kota P. et. al.* The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*. – 2002. – №3(5). – p. 371–390.
5. *Naik P., Al-Khayri J.* Abiotic and Biotic Elicitors–Role in Secondary Metabolites Production through In Vitro Culture of Medicinal Plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*, 2016. – (247-277).
6. *Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B., Bhanu A.* A Future Perspective in Crop Protection: Chitosan and its Oligosaccharides. *Advances In Plants & Agriculture Research*. – 2014. – №1. – p. 1–8.
7. *Teng W., Khor E., Tan T. et.al.* Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydrate Research*. – 2001. – №332(3). – p. 305–316.