

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)

« ___ » червень 2021 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ___ » червень 2021 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

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

освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Індукція синтезу ауксинів *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241

та *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 за наявності триптофану

Виконав: здобувачка 4 курсу, групи 1

Жданюк Валентина Іванівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Пирог Тетяна Павлівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Консультанти Клименко О.М.
(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Титова Л.В.
(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 бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Пирог Т.П.

“01” квітня 2021 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Жданюк Валентини Іванівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Індукція синтезу ауксинів *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В 7241 та *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 за наявності триптофану
керівник роботи Пирог Тетяна Павлівна, докт. біол. наук, професор,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року № 228-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 28.05.2021

3. Вихідні дані до роботи _____

Літературний огляд, експериментальна частина, технологічна частина

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити РОЗДІЛ 1. АСОЦІЙОВАНІ З РОСЛИНАМИ БАКТЕРІЇ ЯК ПРОДУЦЕНТИ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ РОЗДІЛ 3. ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ АУКСИНІВ ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB-7241 ТА RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS IMB Ас-5017 РОЗДІЛ 4. ДІЛЯНКА ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ КОМПЛЕКСНОГО МІКРОБНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB 7241 РОЗДІЛ 5. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА РОЗДІЛ 6. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва- 1 аркуш формату А1. Апаратура схема виробництва- 1 аркуш А1. Схема автоматизації ділянки приготування і періодичної стерилізації поживного середовища, вирощування інокуляту - 1 аркуш формату А3.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5. Автоматизація	Клименко О.М., доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	<i>Літературний огляд</i>	<i>1.04.21–4.04.21</i>	
2	<i>Експериментальна частина</i>	<i>5.04.21–15.04.21</i>	
3	<i>Обґрунтування вибору біологічного агента</i>	<i>10.04.21–18.04.21</i>	
4	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>15.04.21–18.04.21</i>	
5	<i>Розрахунок потужності виробництва</i>	<i>19.04.21–30.04.21</i>	
6	<i>Обґрунтування вибору допоміжних стадій</i>	<i>26.04.21–2.05.21</i>	
7	<i>Специфікація</i>	<i>30.04.21–9.05.21</i>	
8	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>10.05.21–16.05.21</i>	
9	<i>Контроль виробництва</i>	<i>10.05.21–16.05.21</i>	
10	<i>Автоматизація ділянки</i>	<i>17.05.21–20.05.21</i>	
11	<i>Охорона довкілля</i>	<i>21.05.21–28.05.21</i>	
12	<i>Виконання графічної частини роботи</i>	<i>30.04.21–28.05.21</i>	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Жданюк В.І.
(прізвище та ініціали)

Пирог Т.П.
(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дана дипломна робота присвячена визначенню оптимальної концентрації триптофану (попередник біосинтезу ауксинів) та часу його внесення в середовище культивування продуцентів поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 для досягнення максимального синтезу фітогормонів, а також розробленню проекту біосинтезу комплексного мікробного препарату на основі *A. calcoaceticus* IMB В-7241. Встановлено, що незалежно від концентрації (100-300 мг/л) і моменту внесення (лаг-фаза, експоненційна) триптофану в середовище культивування обох штамів, спостерігали підвищення на два-три порядки кількості синтезованих ауксинів порівняно з показниками на середовищі без попередника. Зокрема, внесення 300 мг/л триптофану супроводжувалось синтезом максимальної концентрації ауксинів, за вирощування на різних субстратах: етанол, відпрацьована після смаження м'яса соняшникова олія для *R. erythropolis* IMB Ас-5017; технічний гліцерин, етанол для *A. calcoaceticus* IMB В-7241. Також встановлено, що порівняно із середовищем без триптофану, активність ферменту триптофантрансамінази збільшується завжди і незалежно від моменту внесення амінокислоти.

Використовуючи експериментально отримані дані, було розроблено проект виробництва комплексного мікробного препарату на основі *A. calcoaceticus* IMB В-7241 для обробки перцю солодкого з метою боротьби із фітопатогенними мікроорганізмами та стимуляції росту. Також розраховано річну потужність виробництва препарату - 2,26 м³ культуральної рідини (за умови, що втрати становлять 20%).

Дипломна робота складається із 169 сторінок машинописного тексту, 30 таблиць, 165 літературних джерел та 3 аркушів креслень формату А1.

Ключові слова: ауксини, індол-3-оцтова кислота, триптофан, трансаміназа, поверхнево-активні речовини, технічний гліцерин, перець солодкий.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	2
ВСТУП	8

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. АСОЦІЙОВАНІ З РОСЛИНАМИ БАКТЕРІЇ ЯК ПРОДУЦЕНТИ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН	12
1.1. Ризосферні бактерії як продуценти поверхнево-активних речовин	13
1.1.1. Рамноліпіди.....	14
1.1.2. Ліпопептиди.....	15
1.2. Утворення поверхнево-активних речовин ендofітними бактеріями	20
1.2.1. Рамноліпіди.....	20
1.2.2. Ліпопептиди.....	21
1.3. Фізіологічна роль поверхнево-активних речовин, синтезованих асоційованими з рослинами бактеріями	25
1.3.1. Антибактеріальна дія	25
1.3.2. Антифунгальна дія	31
1.3.3. Стимуляція росту рослин	40

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	45
2.1. Об'єкти досліджень	45
2.2. Культивування продуцентів поверхнево-активних речовин.....	45
2.3. Одержання екстрактів з фітогормональною активністю	46
2.4. Ензиматичні аналізи.....	47

2.4.1. Одержання безклітинних екстрактів..... 48

2.4.2. Аналіз активності триптофантрансамінази..... 48

РОЗДІЛ 3. ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ АУКСИНІВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB-7241 ТА *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* IMB Ас-5017..... 49

3.1. Вплив триптофану на синтез фітогормонів ауксинової природи *A. calcoaceticus* IMB 7241 51

3.2. Синтез ауксинів *R. erythropolis* IMB Ас-5017 за наявності триптофану..... 54

3.3. Вплив умов культивування *A. calcoaceticus* IMB 7241 та *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 на трансаміназну активність..... 56

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 4. ДІЛЯНКА ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ КОМПЛЕКСНОГО МІКРОБНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB 7241 62

4.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту та вибору поживного середовища для його культивування..... 62

4.2. Техніко-економічне обґрунтування 69

4.2.1. Потреба у цільовому продукті..... 69

4.2.1.1. Хімічні препарати для обробки томатів на ринку України ... 71

4.3. Розрахунок річної потреби в комплексному мікробному препараті 75

4.4. Методика обробки перців мікробним препаратом 75

4.5. Розрахунок річної потреби робочого розчину мікробного препарату 76

4.6. Розрахунок кількості культуральної рідини для обробки перців ... 77

4.7. Розрахунок потужності виробництва комплексного мікробного препарату <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	79
4.8. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу комплексного мікробного препарату на основі <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241.....	79
4.8.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування в інокуляторі об'ємом 100 л.....	80
4.8.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування в інокуляторі об'ємом 10 л.....	81
4.8.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці	82
4.9. Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва	82
4.9.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	82
4.9.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря	83
4.9.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів для виробничого біосинтезу комплексного мікробного препарату на основі <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241.....	84
4.9.4. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва комплексного мікробного препарату	85
4.10. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.....	92
4.10.1. Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках	96
4.10.2. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л.....	96
4.10.3. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л.....	97

4.10.4. Приготування поживного середовища для вирощування в ферментері об'ємом 630 л	97
4.11. Специфікація обладнання	99
4.12. Опис технологічної схеми процесу біосинтезу ПАР та фітогормонів	105
4.13. Контроль виробництва комплексного мікробного препарату на основі <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	118
4.13.1. Карта постадійного контролю виробництва комплексного мікробного препарату <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	118
4.13.2. Мікробіологічний контроль	123
4.13.3. Показники росту і синтезу	124
4.13.4. Визначення концентрація джерела карбону і нітрогену.....	125
РОЗДІЛ 5. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА.....	127
5.1. Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формування завдання на розробку системи автоматизації.....	127
5.2. Завдання на розробку схеми автоматизації ділянки виробничої ферментації	129
5.3. Опис функціональної схеми автоматизації	132
5.4. Специфікація на прилади та засоби автоматизації.....	136
РОЗДІЛ 6. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	138
6.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	138
6.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва...	140
6.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.	140
6.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	143

6.2.3. Система знешкодження та утилізації газоповітряних відходів.

..... 144

ВИСНОВКИ 147

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ..... 150

ДОДАТКИ.....170

ВСТУП

Сьогодні в сільському господарстві застосовуються стимулятори росту й розвитку рослин, які представлені переважно синтетичними сполуками, безпечність застосування яких для здоров'я людей і стану ґрунтів і досі не встановлена, що викликає певну засторогу у їх використанні. Використання біологічних регуляторів росту і альтернативних методів боротьби із фітопатогенами (що не викликають резистентних форм мікроорганізмів) в останні роки поширене в більшості економічно розвинених країн: Франції, Великій Британії, ФРН, Швейцарії, Словаччині, Аргентині, Японії, Угорщині, Білорусії, США та інших. Все частіше звертають увагу саме на біопрепарати, які одночасно можуть володіти антимікробними і рістстимулювальними властивостями [1,2].

Однак на ринку України досі більш поширеними є саме синтетичні антимікробні препарати, які найчастіше володіють лиш фунгіцидною дією, а препарати саме продуцентів поверхнево-активних речовин не є поширеними. Адже в наш час собівартість мікробних ПАР є вищою, порівняно з хімічними аналогами, за рахунок низького виходу цільового продукту та високих витрат на його виділення та очищення. Однак використання дешевих субстратів, оптимізація складу поживного середовища та умов культивування, може суттєво змінити існуючу ситуацію [2].

У попередніх дослідженнях було встановлено здатність продуцентів поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 синтезувати фітогормони стимулювальної дії – ауксини, цитокініни та гібереліни [3,4].

Наступні дослідження [5,6], проведені на вегетаційному майданчику Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного з використанням

					НУХТ БТЕК 04.01.03 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Жданюк В.І.			Літ.	Арк.	Акрівів 173
Перевір.		Пирог Т.П.				8	173
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					
ВСТУП							

як тест-культур томатів та ячменю, підтвердили, що супернатант культуральної рідини *A. calcoaceticus* IMB В-7241, *R. erythropolis* IMB Ас-5017 позитивно

впливають на ріст і розвиток рослин. У разі обробки кореневої системи томатів розчином фітогормонів штаму IMB В-7241 або IMB Ас-5017 кількість плодів перевищувала контроль більше, ніж в 2 рази, а загальна вага – на 45% для IMB В-7241 та на 62% для IMB Ас-5017, відповідно. Проте зазначимо, що концентрації позаклітинних фітогормонів, синтезованих обома штамами були невисокими, що суттєво знижує ефективність використання таких препаратів у рослинництві.

З літературного огляду [7] відомо, що більшість ґрунтових мікроорганізмів, як асоційованих, так і не асоційованих з рослинами, синтезують фітогормони ауксинової природи за наявності у середовищі культивування екзогенного триптофану, який є попередником синтезу індол-3-оцтової кислоти (ІОК).

Слід зазначити, що у роботі [8] було встановлено, що *R. erythropolis* IMB Ас-5017, *A. calcoaceticus* IMB В-7241 синтезують ауксини за умов росту на середовищах з різними субстратами (етанолі, гліцерині) без попередника, а отже, існують потенційні можливості для підвищення їх синтезу.

Тому метою даної дипломної роботи було:

- встановити оптимальну концентрацію триптофану і момент його внесення у середовище культивування продуцентів ПАР *R. erythropolis* IMB Ас-5017 та *A. calcoaceticus* IMB В-7241 для забезпечення максимального синтезу ауксинів;
- розробка апаратурної та технологічної схем виробництва комплексного мікробного препарату на основі *A. calcoaceticus* IMB В-7241 з антимікробними і рістстимулювальними властивостями для обробки поширеної в Україні овочевої культури - перцю солодкого. З використанням як дешевого субстрату технічного гліцерину – відходу виробництва біодизелю та за умови внесення попередника біосинтезу ауксинів - триптофану.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. АСОЦІЙОВАНІ З РОСЛИНАМИ БАКТЕРІЇ ЯК ПРОДУЦЕНТИ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) на сьогодні є актуальними біологічними агентами, адже їм характерні певні властивості, які можна використовувати, а саме:

- вони легко піддаються біологічному розкладанню і спричиняють менш токсичний вплив на навколишнє середовище;
- мають властивості, подібні синтетичним ПАР;
- толерантні до широкого спектру екстремальних умов (значення рН, температура і висока солоність), які часто зустрічаються в промислових процесах;
- проявляють антимікробну дію [9].

Завдяки вище описаним властивостям, мікробні ПАР можуть бути використані, наприклад, у сільському господарстві. Є кілька перспективних напрямів для застосування біогенних ПАР (біоПАР) у рослинництві [10]:

1. Покращення якості ґрунту. Показано, що мікробні ПАР відіграють велику роль у біоремедіації вуглеводнів, прискоренні біодеградації пестицидів, детоксикації або видаленні важких металів і в технологіях промивання ґрунтів.

2. Біоконтроль фітопатогенів та імуностимулюючий вплив на рослини. Володіють антибактеріальною, фунгіцидною та інсектицидною активністю щодо збудників хвороб рослин.

3. Підсилення взаємодії між рослиною та ризосферними бактеріями. Важливим фактором такої симбіотичної взаємодії є продукування ПАР ризосферними бактеріями.

					НУХТ БТЕК 04.01.03 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Жданюк В.І.			РОЗДІЛ 1. АСОЦІЙОВАНІ З РОСЛИНАМИ БАКТЕРІЇ ЯК ПРОДУЦЕНТИ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН	Літ.	Арк.	Акрівшів
Перевір.		Пирог Т.П.					10	169
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Ці мікроорганізми живляться рослинними ексудатами, водночас сприяючи росту рослин за рахунок індукції захисних механізмів проти фітопатогенів та синтезу ряду корисних сполук, зокрема, біосурфактантів.

4. Стимулювання росту рослин. Цей напрямок використання біоПАР у агропромисловості є результатом описаних вище властивостей. Проведено ряд експериментів в лабораторних та польових умовах, які підтверджують що біоПАР покращують енергію проростання та схожість насіння, стимулюють ріст та розвиток рослин і підвищують урожайність сільськогосподарських культур.

5. Заміна синтетичних ПАР біогенними при виробництві агропрепаратів (зокрема, пестицидів) [10].

Говорячи про асоційовані мікроорганізми і механізми захисту, найважливішу роль у біологічному контролі відіграють штами бактеріальних родів *Bacillus*, *Pseudomonas* та *Agrobacterium*, їх ПАР (наприклад, ліпопептиди бацил, гліколіпіди псевдомонад та агробактерій), здійснювати протимікробну, протипухлинну, інсектицидну дію [11].

Тому метою даного огляду було узагальнення наявних у сучасній літературі даних про здатність бактерій, що асоційовані із рослинами, синтезувати ПАР ліпопептидної та рамноліпідної природи, їх антимікробна дія, а також здатність до стимуляції росту рослини-хазяїна.

1.1. Ризосферні бактерії як продуценти поверхнево-активних речовин

В огляді підсумовано дані літератури щодо мікробного синтезу поверхнево-активних речовин, а саме: ліпопептидів та рамноліпідів, що продукуються бактеріями, які асоційовані із рослинами.

Рослини забезпечують угруповання мікроорганізмів середовищем проживання, яке поділяють на такі категорії як ризосфера, філосфера та ендосфера. Ризосфера - це вузька зона навколо кореня, пов'язана між собою

кореневими ексудатами (білками та цукрами), диханням та біогеохімічними реакціями [12].

1.1.1. Рамноліпіди

Рамноліпіди - це гліколіпіди, що містять гідрофільну групу, що складається з однієї або двох - молекул рамнози, що зв'язана глікозидним зв'язком з гідрофобною групою (одна або дві β -гідрокси жирні кислоти). Рамноліпіди, що містять одну і дві молекули рамнози називають монорамноліпідами та дирамноліпідами, відповідно [13].

Інформація про синтез цих гліколіпідів ризобактеріями почала з'являтися у 90-х роках ХХ ст. У роботі 1994 р. [14] описуються метаболіти бактерій роду *Pseudomonas*, завдяки цим речовинам вони здійснюють біоконтроль захворюваності рослини-хазяїна. Далі у 2008, 2009 роках досліджуються знову ж *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp. та їх здатність до синтезу рамноліпідів [15,16].

Упродовж останніх років у літературі з'являлася інформація про одночасний синтез суміші монорамноліпідів та дирамноліпідів, так, у роботах [17-20] описані штами, що були виділені із ризосфери найпоширеніших культур рослин, наприклад, *P. aeruginosa* C1501, що виділений із ризосфери пшениці, *Pseudomonas guariconensis* LE3 (ізолят виділений ризосфери томату), *P. aeruginosa* PAM8 ізолят кукурудзи або *Pseudomonas putida* BSP9 - ризобій гірчиці.

За останні 6 років також описані ПАР, але які за хімічним складом є менш різноманітні, адже представлені лиш дирамноліпідами, наприклад, штаму, що заселяє ризосферу перцю чилі - *P. aeruginosa* CR1 або ж коріння кущів чаю - *P. aeruginosa* RTE4. Лише дирамноліпідами представлені гліколіпіди *P. aeruginosa* KVD-HM52, що виділені із ризосфери екзотичних мангрових дерев (із пробкового шару, що утворюється на корінні даних рослин), ізолят ризосфери трави Розхідника звичайного - *Lysinibacillus* sp. BV152.1, що також продукує суміш дирамноліпідів [21-24].

Штами, для яких все ж визначали концентрації синтезованих ПАР, наведені у табл. 1.1, тож найбільш ефективним продуцентом є штаб, виділений із ризосфери перцю чилі *P. aeruginosa* CR1, тому що концентрація його ПАР становить понад 21,77 г/л, за вирощування на середовищі LB (*Lysogeny broth*) із олією рисових висівок, відповідно [13]. Деяко гіршими продуцентами є *P. aeruginosa* RTE4, *P. aeruginosa* KVD-НМ52, *P. putida* BSP9 (за вирощування на базових мінеральних середовищах) концентрації даних метаболітів становлять 9; 5,26 та 1,39 г/л, відповідно. Слід зазначити, що при дослідженні ефективного середовища культивування (для *P. aeruginosa* С1501), більш оптимальним субстратом виявився гліцерол, в порівнянні із глюкозою [17, 20-22]. Найбільш перспективним з технологічної точки зору є штаб, що описаний у роботі [25]. Так, ізольовані із коріння кукурудзи штаби порівнювали із еталонним щодо синтезу ПАР за екстримальних умов (температури - 120°C, кислотності - 12, та вмісту NaCl на рівні 10%), найпродуктивнішим виявився штаб РАМ8, який синтезує 1,87 г/л піаноцину, що здатен емульгувати циклогексан, нафту, дизель мастила, а також є толерантним до наявності у середовищі важких металів (As, Zn, Pb, Fe, Cd, Cu, Cr). Завдяки наведеним особливостям, штаб може бути використаний, наприклад, у біоремедіаційних процесах, з метою очищення ґрунту та вод.

Нещодавно, китайськими вченими [26] була виявлена здатність *Bradyrhizobium* sp. ВТАі1 синтезути рамноліпід - це перший приклад рамноліпиду, що містить аміноспирт, а також перший рамноліпід, виділений із бактерії, що належить до класу *Alphaproteobacteria*, адже раніше такої інформації у літературі не наводилось.

1.1.2. Ліпопептиди

Перші роботи, з яких почали досліджувати асоційовані з рослинами бактерії як продуценти ліпопептидів, були опубліковані наприкінці 80-х років. Так, у 1989 р. [27], вчені описали *Pseudomonas fluorescenes* biovar II (виділений із броколі), як продуцент ПАР. Хоча в даній статті штаб biovar II є одним із

збудників хвороби. В подальших роботах все частіше досліджується ПАР-утворююча здатність представників даного роду бактерій, які «мирно» співіснують разом із рослинами, не викликаючи при цьому захворювань, а навпаки здійснюють контроль патогенної мікрофлори внаслідок виділення ПАР. Того ж року встановлено, що флуоресцентні *Pseudomonas* spp. здатні інгібувати патогенні гриби в ризосфері цукрових буряків [28]. А вже 2003-го р. опублікована стаття, де вчені встановили, що антифунгальні властивості штама виділеного із ризосфери цукрового буряка пов'язані саме із синтезом циклічних ліпопептидів (віскозинаміду, тензину, амфізину), досліджена їх стабільність у ґрунті [29].

Надалі, протягом 2000-х у літературі описувались переважно штами псевдомонад, ПАР яких мають ліпопептидну природу (із циклічною будовою молекули) наприклад, для *Pseudomonas putida* PCL1445 [30], *P. putida* RW10S2 із ризосфери рису [31], штамів *Pseudomonas* та *P. putida* 267, виділених із чорного перцю [32,33], а також штамів *Pseudomonas* [34,35] виділених із коріння червоного кокоюму, ПАР яких дуже різноманітні (ентолізін, локізін, путізолівін і ксантолізін).

ПАР досліджені у роботі [45] є ще різноманітнішими, ізоляти із таких рослин як Фікуса, Макадамії, Вашингтонії, Листококосника, Юки, Манго, Мигдалю, Синяка, Сосни мають гени, що беруть участь у біосинтезі ліпопептидів: сурфактину, пумілацидину, ліхенізину, курстакіну та різних типів фенгіцинів (які різняться лиш за восьмою амінокислотою - глютаміном чи глютаматом).

У публікаціях (за останні 6 років) щодо утворення ПАР ризобіальними бактеріями, описані штами, які синтезували найпоширеніший аміноліпід – сурфактин, з дією якого найчастіше пов'язують антимікробну властивість. Досліджені ізоляти, зібрані з ризосфери різних плодових та садових рослин (томатів, мигдалю, горіхів, банана) трав (анектохіну, партеріума) [26-41].

У сучасній літературі, серед ризобіальних бактерій переважали представники роду *Bacillus*, що продукують різні ПАР ліпопептидної природи

[36-49]. Так, у роботах [42-44], виявлені штами, що синтезують відразу три аміноліпиди - сурфактин, ітурин, фенгіцин, наприклад, *Bacillus altitudinis* MS16 або ізоляти *Bacillus velezensis* 32a, *B. velezensis* Y6, що виділені із ризосфери томату. Штам *Bacillus subtilis* EA-CB0575 (ізолят банана) крім сурфактину і фенгіцину продукує ще й баціломіцин [44].

У недавніх наукових працях (за останні 6 років) визначався не лише якісний, а й кількісний склад ПАР [38-52, 45-49] (див. табл. 1.1). Найбільше бактерій було виділено із ризосфери томатів [38, 41, 46, 48], однак концентрації даних метаболітів незначні і варіюються у межах від 0,1 до 0,6 г/л. Досить низькі концентрації і ліпопептидів, що синтезовані штамми, які виділені із трав'янистих рослин [47,39,40,43], серед них, відносно продуктивним є *B. altitudinis* MS16 - 3,8 г/л.

Найкращі результати описані у роботі [40], де вченими встановлювалось оптимальне середовище для біосинтезу ПАР. Для *B. altitudinis* MS16 оптимальним виявилось середовище з глюкозою, куди додатково внесено розчин мікроелементів, внаслідок чого максимальний вихід ліпопептидів - 3,8 г/л.

Синтез поверхнево-активних речовин ризосферними бактеріями

ПАР	Штам-продуцент	Рослина, з ризосфери якої виділений штам	Хімічний склад ПАР	Ростовий субстрат, концентрація (г/л)	Концентрація ПАР, г/л	Література
Рамноліпіди	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CR1	Перець чилі	Дирамноліпід	Гліцерин - 30 Олія рисових висівок – 3%	21,77	[21]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KVD-HM52	Мангрові дерева	Монорамноліпід, дирамноліпід	Нафта – 2 % (об'ємна частка)	5,26	[23]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> C1501	Пшениця	Дирамноліпід	Гліцерин - 3% (об'ємна частка)	1,39	[17]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RTE4	Чай сорту «Rosekand»	Дирамноліпід	Глюкоза – 20	9	[22]
	<i>Pseudomonas putida</i> BSP9	Гірчиця	Монорамноліпід, дирамноліпід	Гліцерин – 1% (об'ємна частка)	2,5	[20]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAM8	Кукурудза	Монорамноліпід, дирамноліпід	Пептон -10 глюкоза –	0,187	[25]
Ліпопептиди	<i>Bacillus velezensis</i> 32a	Томат	Сурфактин, ігурин, фенгіцин	Сахароза -20	0,629 ±0,165	[38]
	<i>Bacillus velezensis</i> Y6	Томат	Ігурин, фенгіцин, сурфактин	Триптон – 10, дріжджовий екстракт - 5	0,5	[41]
	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	Томат	Сурфактин	Глюкоза – 20	0,128	[46]
	<i>Bacillus tequilensis</i> SDS21	Партеріум пізньостигий	Сурфактин	Сахароза – 30	1,879	[39]

Продовження табл. 1.1

Ліпопептиди	<i>Bacillus altitudinis</i> MS16	Різноманітні культури Ірану	Сурфактин, ітурин, фенгіцин	Глюкоза - 20	3,8	[40]
	<i>Bacillus sp.</i> FJAT-14262	Трава Анекохіл	Сурфактин	Глюкоза – 5; Триптон -	0,576	[37]
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> RHNK22	Різноманітні рослини Індії	Ітурин А	Глюкоза - 20	0,270	[43]
	<i>Bacillus subtilis</i> JW-1	Перець	Сурфактин	Глюкоза - 20	0,97	[48]
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JK6	Томат	Сурфактин	Триптон – 10, дріжджовий екстракт - 5	0,064	[49]

Можна зробити висновок, що ризобіальні бактерії ефективні продуценти як рамноліпідів так і ліпопептидів. Однак, концентрації рамноліпідів, синтезованих бактеріями роду *Pseudomonas* (0,187-21,27 г/л), дещо більші за кількість ліпопептидів бактерій роду *Bacillus*. Зокрема, найвища продуктивність спостерігалась за умови використання в якості джерела вуглецю гліцерину та нафти. Продуценти ліпопептидів синтезували ПАР в менших концентраціях (0,064-3,8 г/л), за використання переважно глюкози як субстрату (див. табл. 1.1).

Отже, гліцерин є оптимальним субстратом, для найбільшого виходу рамноліпідів, дешевою альтернативою може стати технічний гліцерин, що є побічним продуктом виробництва біодизелю, саме його використання дасть змогу здешевити процес біосинтезу даних метаболітів.

1.2. Утворення поверхнево-активних речовин ендоефітними бактеріями

Ендоефітні бактерії населяють тканини рослин, не завдаючи їм при цьому ніякої шкоди. Нині встановлено, що ендоефітні (поряд із бульбочковими бактеріями) здатні формувати на коренях потужний симбіотичний апарат, а також синтезують різноманітні біологічно-активні метаболіти [50].

1.2.1. Рамноліпіди

Проаналізувавши літературу, щодо синтезу рамноліпідів ендоефітними штамми, встановлено, що за останні 7 років публікувались роботи, де визначали здатність бактерій синтезувати ПАР. Точний якісний та кількісний склад яких у переважній більшості робіт не визначався. Наприклад, ендоефіт *Burkholderia* sp. WYAT7 [51], виділений із Гіркового полину, який синтезує ПАР - гліколіпідної природи. Також, досліджено, що продуцентами рамноліпідів найчастіше є бактерії, що належать до роду *Pseudomonas* [52,53].

Дослідження [53-55] показують, що ендоефіти (продуценти ПАР) витримують високу концентрацію важких металів, а також можуть бути

використані для деградації вуглеводнів, завдяки синтезованим ними рамноліпідам, Так, для *Pseudomonas* sp. J4AJ (виділеного із стебла та кореню очерету) [53], виявлено надзвичайну адаптаційну здатність біодеградувати дизельне паливо, штам *Pseudomonas* RE1 ефективно споживає важкі метали Zn, Cr, Cd та Ni (при екстримальних температурах, рН та солоності) [54], ізолят *Bacillus subtilis* U-3 зменшує поверхневий натяг до 30,9 мН/м. Штам *Pseudomonas* sp. Ph6 ефективно деградує поліциклічні ароматичні вуглеводні – фенантрен у кількості 100 мг/л [55], дані властивості можна використовувати для оздоровлення забрудненого нафтою середовища.

1.2.2. Ліпопептиди

Одне з перших повідомлень про здатність ендоефітних бактерій синтезувати ліпопептиди датується 1998 роком, коли Bechard J., зі співавт. [56] опублікували статтю, в якій ліпопептид був виділений із штаму *Bacillus subtilis* (ендоефіта плодів яблук) і продемонстрував антибактеріальну та антифунгальну дію. І надалі, упродовж 10 років. публікувались роботи про синтез ліпопептидів штамми, що були ізольовані яблук та цвіту квітів [57- 59].

Упродовж останніх 7-ми років були описані штами ендоефітів, а також якісний склад їх вторинних метаболітів,що синтезуються разом із ПАР [60-62]. Як от у роботі [60] досліджено, що штам *Pseudomonas fluorescens* BRZ63 (ендоефіт олійного ріпаку) синтезує не лише поверхнево-активні речовини, а також сидерофори, індол-3-оцтову кислоту (ІОК) і 1-аміноциклопропанкарбонову кислоту (АКК) (похідну гормону росту - етилену). А у роботі [61] Akinsanya разом із колегами встановили, що ізолят *Bacillus tequilensis* ALR-2 (виділений із Алое вера) проявляє антимикробну активність, пов'язану з синтезом ліпопептидних антибіотиків та поверхнево-активних речовин, концентрацію яких також не визначали. А у дослідженні [62] китайськими вченими було виділено понад сім циклічних ліпопептидних ПАР *Bacillus clausii* DTM1 - сурфактини, що різняться лиш амінокислотними залишками.

Робіт, де визначався кількісний склад ліпопептидів небагато (див. табл.1.2), а досліджувані штами належать до роду *Bacillus*, їх характерною особливістю є здатність продукувати відразу кілька ліпопептидів: найчастіше - сурфактин, ітурин. Наприклад, ізоляти *Bacillus* у роботі [63] виділені із цитрусових дерев і продукують відразу три види амінопептидів (ітурин, сурфактин, фенгіцин А). А для штамів, що описані у роботах [64,66] – спільним є синтез сурфактинів і баціломіцину .

Найперспективнішим продуцентом серед наведених у табл. 1.2 є ендодіт виділений із рису - *Bacillus* ХТ1 СЕСТ 8661. Його продуктивна здатність досліджувалась підбором ефективного середовища культивування, найкращим є таке, що містить кілька джерел азоту - пептон та дріжджовий екстракт, а концентрація ПАР – 10 г/л, результати на «бідніших» середовищах є значно гірші: 2,8 та 2,13 г/л [64].

Синтез поверхнево-активних речовин ендofітними бактеріями

ПАР	Штам-продуцент	Рослина, з якої виділено штам	Хімічний склад ПАР	Ростовий субстрат, концентрація (г/л)	Концентрація ПАР, г/л	Література
Ліпопептиди	<i>Bacillus subtilis</i> LE24	Лайм	Ітурин, Сурфактин, Фенгіцин А	Триптоза.- 10.0	0,42	[63]
	<i>Bacillus tequilensis</i> PO80	Помело	Ітурин, Сурфактин, Фенгіцин А	Декстроза - 20	0,38	[63]
	<i>Bacillus amyloliquefacins</i> LE109	Лайм	Ітурин, Сурфактин, Фенгіцин А	Декстроза - 20	0,46	[63]
	<i>Bacillus</i> XT1 СЕСТ 8661	Рис	Сурфактин, ліхеніцин, фенгіцин, бациломіцин, ітурин	Сахароза - 20	10	[64]
	<i>Bacillus mojavensis</i> RRC101	Кукурудза	Сурфактин	Сахароза - 20	0,119	[57]
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> C5	Олива	Сурфактин, Бациломіцин D	Глюкоза – 20 Борошно виноградних кісточок - 2	0.80	[66]
Гліколіпіди	<i>Bacillus. pumilus</i> 2A	Олива	-	Пивоварне зерно - 50	6,8	[67]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> L10	Очерет	Рамноліпід	Глюкоза -30	5	[68]

Більшість ендосферитів, що описані в табл. 1.2, культивувались за використання вуглеводів у якості джерела вуглецю, зокрема, найефективнішим субстратом є пивоварне зерно (основними моносахаридами якого є глюкоза, сахароза, мальтоза). Дана особливість пояснюється здатністю ендосферитів проникати у тканини рослин. Адже ендосферитні бактерії виділяють екзоферменти (ендоглюконаза та полігалактураназа) для проникнення бактерії у транспортні компартменти клітин рослини, які транспортуються ксилемними судинами рослини, для споживання вуглеводів [67]. Також, поясненням може слугувати біохімія синтезу рамноліпідів із глюкози: глюкоза може бути перетворена в діокситимідин дифосфат -L-рамнозу (дТДФ-L-рамноза) - цукровий фрагмент, і ацил-КоА може синтезуватись із глюкози та перетворюватись на гідрофобну частину [69].

Порівнюючи здатність ризосферних та ендосферитних штамів синтезувати ПАР (див. табл. 1.1 і 1.2), із глюкозою і сахарозою у якості субстратів. Можна зробити висновок, що бактерії виділені із ендосфери рослин є значно продуктивнішими, концентрації їх ліпопептидів (0,1-10 г/л), перевищують як мінімальні, так і максимальні показники для ризосферних (0,064-3,8 г/л).

Аналогічно, при порівнянні гліколіпідів із табл. 1.1 і 1.2, встановлено, що ризосферні штами можуть бути більш ефективними продуцентами за використання гліцеролу як субстрату (0,187-21,27 г/л), ніж ендосферити, що культивувались на вуглеводах (5-6,8 г/л).

1.3. Фізіологічна роль поверхнево-активних речовин, синтезованих асоційованими з рослинами бактеріями

1.3.1. Антибактеріальна дія

Відомо, що мікробіота рослин є дуже різноманітно, представлена асоційованими та/або патогенним бактеріями і грибами, які перебувають у жорсткій конкуренції за поживні речовини. Антагоністичні взаємовідносини відбуваються завдяки синтезу зазвичай комплексу антибіотичних речовин, летких органічних речовин, токсинів, а також поверхнево-активних речовин. На початку 2000-х рр. почала активно досліджуватись саме антибактеріальна дія ПАР асоційованих бактерій, щодо найпоширеніших родів *Xanthomonas*, *Pectobacterium*, *Ralstonia* [72, 79].

Упродовж 2013-2020 рр. при дослідженні антибактеріальної дії ПАР більшість патогенних тест-культур належали до роду *Xanthomonas*, збудники бактеріального опіку у рослин [22,41,45,49,73-75,77,83] (див. табл. 1.3). Наприклад, яскраві антагоністичні властивості проявляють циклічні ліпопептиди, ендofітних бактерій *Bacillus amyloliquefaciens* LE109, *Bacillus subtilis* LE24 та *Bacillus tequilensis* PO80, отримані із здорових цитрусових дерев і які є ефективними проти *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Найефективнішим із трьох штамів є *B. amyloliquefaciens* LE109, адже мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) його ПАР становить 0,3 мкг/мл, а зона затримки росту бактерії – 25 мм, що перевищує показники *B. subtilis* LE24 – 22 мм. Встановлено, що антибактеріальна активність штамів залежить від середовища культивування: для *B. amyloliquefaciens* LE109 та *B. tequilensis* PO80 оптимальним був саме пептон-декстрозний відвар із дріжджовим екстрактом, а для *B. subtilis* LE24 – відвар із модифікованим крохмалем [55].

Антибактеріальна дія відносно тест-культур роду *Xanthomonas* досліджувалась і для ПАР – *Bacillus* sp., *Bacillus* SS-12.6, *B. velezensis* 9D-6, *B. velezensis*, *Paenibacillus polymyxa* Sx3 [73-75,77]. Так, фузаріцидин А штама *P. polymyxa* Sx3 є найбільш ефективним, в порівнянні із іншими продуцентами,

адже зони інгібування внаслідок дії його ПАР (з фільтрату культуральної рідини) є найбільшими і становлять 33-57 мм, тоді як для інших штамів цей показник знаходиться у межах 8-22 мм. Також штам є ефективним і за ступенем інгібування (89 %,) в порівнянні із таким для *B. velezensis* – 78 % (див. табл. 1.3).

Антибактеріальна дія щодо фітопатогенної бактерії *Ralstonia solanacearum* (причини бактеріального в'янення) визначалась для багатьох штамів (див. табл.1.3): *B. velezensis* 9D-6, *B. amyloliquefaciens* JK6 – синтезують сурфактини, але проявляють різну ефективність щодо фітопатогенної бактерії *Ralstonia solanacearum*. За дифузійного методу *in vitro* у штама 9D-6 (10^9 КУО/мл) зона інгібування росту бактерії до 2 мм, тоді як у *B. amyloliquefaciens* JK6 (10^7 КУО/мл) становить 34 мм, що значно перевищує показники усіх перелічених штамів у табл. 1.3.

Є незначна кількість наукових робіт щодо антибактеріальної дії ПАР гліколіпідної природи проти збудників захворювань у рослин, а дані що наявні вказують на слабкі антибактеріальні властивості [22,83]. Так у роботі [22] описаний ендоситий штам чаю, рамноліпід якого є малоефективним щодо *Xanthomonas campestris*, тому що МІК становить понад 5000 мкг/мл. Низька ефективність і у штама *Acinetobacter* sp. ACMS25, гліколіпід якого інгібує ріст *Xanthomonas oryzae* всього на 43%, в порівнянні із показниками ліпопептидів 70-80% [83].

Антибактеріальна активність ПАР асоційованих бактерій проти фітопатогенів рослин

ПАР	Штам-продуцент	Хімічний склад	Рослина, з якої виділений штам	Тест-культура	Антимікробна активність		Література
					МІК, мкг/мл	Зона затримки росту, мм	
Ліпопептиди	<i>Bacillus subtilis</i> LE24	Ітурин, фенгіцин, сурфактин	Лайм	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	0,3	24	[63]
	<i>Bacillus tequilensis</i> PO80	Ітурин, фенгіцин, сурфактин	Лайм	<i>Xanthomonas . citri</i> subsp. <i>citri</i>	1,5	22	[63]
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LE109	Ітурин, фенгіцин, сурфактин	Лайм	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	0,3	25	[63]
	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	Баціломіцин D	-	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomat</i>	25-100		[46]
	<i>Bacillus</i> spp.	Ітурин, фенгіцин, сурфактин	Польові культури	<i>Erwinia amylovora</i> <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>fragariae</i> <i>X. axonopodium</i> pv. (syn. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>), <i>Ralstonia solanacearum</i> <i>Clavibacter michiganensis</i> sbsp. <i>michiganensis</i> <i>Pectobacterium carotovorum</i> sbsp. <i>carotovorum</i>		22	[73]

	<i>Bacillus</i> spp. SS-12.6	Ітурин, фенгіцин, сурфактин	-	<i>Xanthomonas arboricola</i> <i>Pectobacterium carotovorum</i> <i>Pectobacterium carotovorum</i>		10 4 4	[74]
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JK6	Сурфактин	Томат	<i>Ralstonia solanacearum</i>		34	[49]
	<i>Bacillus velezensis</i> D-6	Сурфактин	Картопл я	<i>Bacillus cereus</i> <i>Clavibacter michiganensis</i> <i>Erwinia amylovora</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Ralstonia solanacearum</i> <i>Xanthomonas campestris</i> <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> <i>Clavibacter carbonus</i> <i>Pseudomonas syringae</i>	10 000 5000	2 2-5 - 2 - 2 5-10 5-10	[75]
	<i>Bacillus velezensis</i>	Сурфактин Ітурин Фенгіцин	-	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> 414 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>		78* 70*	[41]
	<i>Paenibacillus polymyxa</i> Sx3	Фузаріцидин А	Рис	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>		33-57 83*	[77]
Гліко- ліпіди	<i>Acinetobacter</i> sp. ACMS25	-	Ката- рантус рожевий	<i>Xanthomonas oryzae</i>		43,5*	[81]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RTE4	Рамноліпід	Чай	<i>Xanthomonas campestris</i>	5000		[22]

Примітка: * - інгібування росту, %

Також антибактеріальна дія ПАР асоційованих мікроорганізмів досліджувалась і відносно патогенних та умовно-патогенних бактерій людини, зокрема щодо найпоширеніших клінічних штамів: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (див. табл. 1.4). Показники МІК ліпопептидів визначались для штамів *B. velezensis* FZ06, *B. tequilensis* SDS21, *Bacillus amyloliquefaciens* C5. Найкращі результати встановлені для штама *B. amyloliquefaciens* C5, МІК ПАР якого – 60 мкг/мл. Найефективнішими щодо *S. aureus* є сурфактин і бациломіцини *B. amyloliquefaciens* C5, тому що зона затримки росту становить – 20, 25 мм [66].

Антибактеріальна активність ПАР асоційованих з рослинами бактерій проти патогенів людини

Штам-продуцент	Хімічний склад	Рослина, з якої виділений штам	Тест-культура	Антимікробна активність		
				МІК, мкг/мл	Зона затримки росту, мм	Література
<i>Bacillus velezensis</i> FZ06	Ітурин Сурфактин Фенгіцин А	Чай <i>Camellia assamica</i>	<i>Escherichia coli coli</i> ATCC 25,922 <i>Staphylococcus typhimurium</i> GIM 1.237 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 51,650 <i>Listeria monocytogenes</i> CMCCB 54,002 <i>Bacillus cereus</i> GIM 1.602	512-2048	3-10	[82]
<i>Bacillus tequilensis</i> SDS21	Сурфактин	Партеніум пізньоплідний	<i>Escherichia coli coli</i> V517 MTCC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 4306 <i>Staphylococcus aureus</i> MTCC 3160 <i>Staphylococcus epidermidis</i> MTCC 435 <i>Staphylococcus typhi</i> MTCC 733 <i>Staphylococcus typhimurium</i> MTCC 98	2000 2000 500 4000 4000 4000	-	[36]
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> C5	Сурфактин Бациломіцин D		<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 <i>Escherichia coli</i> 3431 <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 <i>Escherichia coli</i> pus <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076 <i>Salmonella zanzibar</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 <i>Klebsiella pneumoniae</i> CIP105705 <i>Klebsiella pneumoniae</i> CIP104727	60	25 20 24 20 15 13 13 12 13 10 12 17	[66]

Примітка:*

-

показник

не

визначали;

Отже, порівнюючи дані щодо антибактеріальної активності ПАР відносно патогенів рослин і патогенів людини (див. табл. 1.3, 1.4), можна зробити висновок, що проти фітопатогенних бактерій ПАР є набагато ефективнішими, адже мінімальні інгібуючі концентрації є мізерними (МІК переважно 0,3-30 мкг/мл), тоді як відносно збудників хвороб людини необхідно застосовувати значно більші концентрації ПАР (МІК у межах 500-4000 мкг/мл).

1.3.2. Антифунгальна дія

Здатність асоційованих бактерій проявляти антифунгальну дію відома ще з кінця минулого століття. Однією із перших була робота 1995-го року, в якій штами *Bacillus* spp. (виділені із яблук) перевіряли на антимікробну активність відносно *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, тест виявився позитивний, автори пояснюють результати здатністю бактерій синтезувати ітурин, опираючись на інші статті [71].

Схожі роботи проловжували публікуватись, так, у 2004 р. була опублікована робота в якій теж описувався *Bacillus subtilis* (штам GA1 - ендодіт плодів полуниці), який проявляв антагоністичну дію щодо фітопатогенних грибів (найбільший рівень інгібування спостерігався відносно родів *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhizoctonia* 56-63%), при якісному аналізі встановлено, що антифунгальна дія забезпечується синтезом фенгіцину та ітуруну [70]. А саме: було встановлено, що штами, які належать до родів *Pseudomonas*, *Bacillus* (особливо *B. subtilis* та *B. amyloliquefaciens*) ефективні в біоконтролі фітопатогенних мікроорганізмів, така дія пояснювалась синтезом ряду антимікробних речовин, зокрема ПАР ліпопептидної природи (сурфактинів, ітуринів та фенгіцинів). У роботах [22, 41, 47,49, 77] досліджувався вплив біогенних ПАР саме на представників роду *Fusarium*

За даними авторів види роду *Fusarium* активно поширюються в агрофітоценозах. Вони здатні уражати понад 150 видів вищих рослин,

паразитуючи на зерні, сходах та колосках. Збудники очкової плямистості і септоріозу можуть уражувати майже всі злакові культури. Стійкість рослин до фітопатогенних мікроміцетів може змінюватись впродовж онтогенезу [80,81] Узагальнені дані про антифунгальні властивості бактерій наведено в табл. 1.5 та 1.6..

Фузаріоз є причиною псування рослинної продукції у всьому світі, опираючись на дані наведені у табл. 1.5 (за показниками МІК), можна стверджувати, що ліпопептиди *Bacillus* sp. FJAT-14262, *Bacillus velezensis* Y6 є ефективними в боротьбі із найпоширенішими збудниками фузаріозу. Однак сурфактин *Bacillus* sp. FJAT-14262 є більш дієвим, МІК становить 10 мкг/мл, в порівнянні із дією ітурину штама Y6, МІК – 75 мкг/мл [41,47]. Аналізуючи дані щодо затримки росту грибів (в тому числі проти *Fusarium oxysporum*) штами *Bacillus* sp. FJAT-14262 та *B. amyloliquefaciens* JK6 ефективно затримували ріст патогенного гриба завдяки синтезу сурфактинів, ефективнішою затримка була у штама JK6 – 36 мми порівняно із зоною затримки для FJAT-14262 – 21 мм [39,41].

Таблиця 1.5

Антифунгальна активність ПАР, синтезованих ризосферними бактеріями

Штам-продуцент	Хімічний склад	Рослина, з ризосфери якої виділений штам	Тест-культура	Антимікробна активність		Літера-тура
				МІК, мкг/мл	Зона затримки росту, мм / інгібування росту, %	
<i>Bacillus</i> sp. FJAT-14262	Сурфактин	Анектохіл	<i>Fusarium oxysporum</i>	10	15-21 мм	[39]
<i>Bacillus velezensis</i> Y6	Ітурин	Томат	<i>Fusarium oxysporum</i>	75	-	[33]
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S499	Фенгіцин	Кукурудза	<i>Rhizomucor variabilis</i>	-	8 мм	[70]
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JK6	Сурфактин	Томат	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Peronophythora litchii</i> <i>Magnaporthe oryzae</i> <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>	-	36 мм 42 мм 34 мм 43 мм 36 мм 58%	[41]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> C1501	Дирамноліпід	Пшениця	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus flavus</i>		17 мм 14 мм 6 мм	[9]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RTE4	Дирамноліпід	Чай	<i>Fusarium solani</i> <i>Corticium invisium</i>	5000 10000 20000	-	[14]

Примітка:* - показник не визначали;

За даними, що наведені у табл. 6, можна бачити, що при визначенні ступеня інгібування росту патогенних грибів, найчастіше в якості тест-культур використовували представників родів *Aspergillus*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, а найбільшу антифунгальну активність проявляють саме комплекси ліпопептидів.

Зокрема, найбільший ступень інгібування 88% спостерігається проти *Verticillium dahlia*, зумовлений дією комплексу ПАР штама виділеного із оливи *B. velezensis* XT1 [28]. Найменший індекс інгібування - 35% спостерігається при дії ПАР (фенгіцину) ендofіта *B. mojavensis* RRC101. Усі ендofітні штами (*B. velezensis* FZ06, *B. velezensis* XT1, *Bacillus* sp. Fc11, *B. licheniformis* GL174, *B. subtilis* SCB-1, *B. velezensis* LHSB1), які здатні ефективно інгібувати ріст фітопатогенних грибів, містять у комплекси ПАР, спільним є наявність сурфактину. Високий рівень затримки росту 19-21 мм, представлені у роботі [47], де штам *Bacillus* sp. FJAT-14262 синтезує лише сурфактин.

Антифунгальна здатність може залежити і від умов культивування, так, у дослідженні [64] екстракти клітин, ендofітних *Bacillus* sp. Fc11, культивованих за наявності різних добавок, перевіряли на протигрибкову активність. В результаті дослідження встановлено, що добавки джерел вуглецю та наночастинок оксиду цинку у середовище культивування мають посилюючий ефект на антифунгальну дію, так, найвища протигрибкова активність (73,2%) у зразка Fc11, де концентрація ZnONP – 5 мг/л. Також оптимальні результати спостерігають при внесенні 30 г/л сахарози у середовище, рівень інгібування *P. aphanidermatum* становить 60%, за внесення нітрату натрію і гліцину в концентрації 7,5 г/л інгібування *P. aphanidermatum* – 50%.

Інфікування харчових продуктів, спричинене мікроорганізмами, може являти загрозу здоров'ю споживачів. Тому у роботі [82] вивчалась перспектива застосування антагоністичного ендofіта зі свіжих листків чаю, які використовують у виробництві чайних напоїв. Штам *B. velezensis* FZ06 синтезує три групи ліпопептидів (сурфактин, ітурин та фенгіцин), тест на мінімальну

інгібуючу концентрацію (МІК) довів, що екстракт комплексу ліпопептидів продемонстрував значний інгібуючий та токсигенний ефект на гриби родів *Aspergillus* та *Fusarium* (МІК 128–256 мкг / мл), однак набагато ефективнішим є фенгіцин ізоляту *B. mojavensis* RRC101, за меншої концентрації одного ліпопептиду, інгібування – 119 мкг/мл [65].

Антифунгальна активність ліпопептидів, синтезованих ендосферними бактеріями

Штам-продуцент Родова назва повністю	Хімічний склад	Рослина, з ендосфери якої виділений штам	Тест-культура Родова назва повністю	Антимікробна активність		
				МІК, мкг/мл	Інгібування росту, %	Література
<i>Bacillus velezensis</i> FZ06	Комплекс ліпідів (ітурин сурфактин фенгіцин А)	Чай	<i>Aspergillus niger</i> FZ11 <i>Aspergillus flavus</i> CGMCC 3.4410 <i>Aspergillus parasiticus</i> GIM 3.395 <i>Fusarium moniliforme</i> CCTCC AF 91017	256 128 128 128	-	[84]
<i>Bacillus mojavensis</i> RRC101	Фенгіцин	Резуховидка Таля	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Aspergillus flavus</i>	119	35	[65]
<i>Bacillus subtilis</i> 9407	Циклічний ліпопептид (фенгіцин)	Яблуко	<i>Pyricularia oryzae</i> <i>Phytophthora infestans</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	8000	72	[91]
<i>Bacillus velezensis</i> XT1	Комплекс ліпідів (сурфактин бациломіцини D фенгіцин А,В)	Олива	<i>Verticillium dahliae</i>	-	88	[92]
<i>Bacillus</i> sp. Fc11	Комплекс ліпідів (сурфактин, ітурин)	Куркума	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Pythium myriotylum</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Corynespora cassiicola</i>	-	50-60	[64]

Продовження табл. 6

Штам-продуцент	Хімічний склад	Рослина, з ендосфери якої виділений штам	Тест-культура	Антимікробна активність		
				Зона затримки росту, мм	Інгібування росту, %	Література
<i>Bacillus licheniformis</i> GL174	Комплексу ліпідів (лінійні та циклічні сурфактин, ліхенізин)	Виноград	<i>Botrytis cinerea</i>	-	84	[94]
			<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>		86	
			<i>Botryosphaeria spp.</i>		63	
			<i>Phytophthora infestans</i>		16	
			<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		84	
<i>Bacillus subtilis</i> SCB-1	Комплексу ліпідів (сурфактин, фенгіцин)	Цукрова тростина	<i>Saccharicola bicolor</i> SC1.4	13	20	[81]
			<i>Neodeightonia subglobosa</i> SC2.1	15	18	
			<i>Cochliobolus hawaiiensis</i> SC2.3	11	21	
			<i>Curvularia senegalensis</i> SC4.1	12	17	
			<i>Phomopsis sp.</i> SC4.2	13	35	
			<i>Curvularia lunata</i> SC5.1	15	27	
			<i>Alternaria alternata</i> SC6.2	15	26	
			<i>Fusarium oxysporum</i> SC7.1	9	10	
			<i>Fusarium verticillioides</i> SC8.1	9	9	
<i>Fusarium sp.</i> SC9.1	1	12				
<i>Bacillus velezensis</i> LHSB1	Комплексу ліпідів (бациломіцин А, сурфактин А, фенгіцин А)	Арахіс	<i>Aspergillus flavus</i>	11	72	[95]
			<i>Aspergillus niger</i>	13	77	
			<i>Diplodia gossypina</i>	10	70	
			<i>Fusarium oxysporum</i>	11	72	
			<i>Fusarium moniliforme</i>	10	70	
			<i>Rhizopus sp.</i>	8	65	

Продовження табл.1.6

<i>Bacillus</i> sp. FJAT-14262	Сурфактин	Анактохім	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cbense</i> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melongenae</i> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	19-21	-	[47]
<i>Bacillus</i> <i>velezensis</i> LDO2	Комплекс ліпідів (сурфактин бацилін, бацилізин фенгіцин		<i>Aspergillus tenuissima</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus. niger</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizopus</i> sp.	5,8 6,5 6,1 6,6 6,7 5,9 4,5 6,0	79 81 80 81 81 79 76	[87]

Примітка:* - показник не визначали;

Отже, можна зробити висновок, що ПАР ендofітних штамів є більш активними в своїй антифунгальній дії (див. табл. 5 і 6), в порівнянні із ПАР ризобіальних штамів. Так, мінімальні інгібуючі концентрації ліпопептидів ризосферних бактерій становлять 1—75 мкг/мл, тоді як для ендofітних МК значно вищі і становлять 110-8000 мкг/мл. Аналогічні закономірності спостерігаються, при порівнянні показника інгібування росту: для ризосферних він у межах 23-58%, а для ендofітних 9-88%.

Як бачимо, із вище наведених таблиць, численні наукові дослідження були зосереджені на представниках роду *Bacillus*. Що не дивно, адже представники цього роду вважаються біологічно безпечними і широко використовуються в сільському господарстві. Спороносна здатність цих мікроорганізмів надає їм високу стійкість, високу виживаність у різноманітних середовищах існування та стабільність у рецептурних продуктах [4]. Безпосередньо антимікробна здатність поверхнево-активних речовин зумовлена зміною заряду поверхні клітини, порушення цілісності та проникності ліпідного бішару клітинної мембрани. Сурфактини впливають на ліпідний бішар мембран і, таким чином, є ефективний як проти грам-позитивних, так і проти грам-негативних бактерій. Проявляють антимікоплазматичну, протівірусну та протипухлинну активність, а також пригнічує запальні реакції через інгібування фосфоліпази А2. Ітурин мають антимікробний потенціал щодо рослинних патогенів. Біопестицид і фунгіцидні властивості ітуринів реалізуються взаємодією зі стеринними компонентами клітини мембрана фітопатогенного гриба. Сполуки сімейства ітуринів характеризуються а пептидне кільце з семи амінокислот, яке виявляє високий поліморфізм, що призводить до різноманітних біологічних та фізико-хімічних властивості. Фенгіцини проявляють мають протигрибкову активність і впливають на ниткоподібні гриби, найважливішу групу фітопатогенів (*Plasmodiaophora moniliforme*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium gramineareum* та *Podosphera fusca*) [96].

Отже, узагальнюючи дані щодо антимікробної активності ПАР асоційованих із рослинами бактерій, можна дійти висновку, що у своїй антибактеріальній дії вони є ефективнішими саме проти патогенів рослин, яскраву антифунгальну дію проявляють штами ендofітних ізолятів.

1.3.3. Стимуляція росту рослин

Асоційовані бактерії крім поверхнево-активних речовин, продукують й інші метаболіти, що здійснюють пряму або опосередковану стимуляцію росту рослини хазяїна. Так у роботі [97], із трави Тимофіївки виділено ендofіні та ризосферні бактерії, що належать до різноманітних родів і синтезують речовини, що підсилюють ріст рослини: сидерофори, ауксини – індол-3-оцтову кислоту (ІОК) у невеликих концентраціях (мкг/мл): *Arthrobacter*– 13,52, *Bacillus* – 13,27, *Brevibacterium* – 14,42, *Chryseobacterium* 14,07, *Curtobacterium* – 16,23, *Microbacterium* – 13,29, *Methylobacterium* – 13,31, *Paenibacillus* – 13,35, *Pantoea* –13,67, *Pedobacter*– 14,27 мкгмл, *Pseudomonas* –12,38, *Rahnella* – 12,44, *Stenotrophomonas* – 13,71, *Streptomyces* – 13,50 , *Xanthomonas* – 17,39. З 60 бактеріальних ізолятів спостерігали різні ступені протигрибкової активності щодо п'яти фітопатогенів демонструючи великий діаметр гальмування (> 15 <3 см), зокрема бацила (ізолят 333), *Brevibacterium* (ізолят 70), *Pseudomonas* (ізоляти 12 і 17) та *Streptomyces* (ізолят 48), *Microbacterium* (ізолят 48) продемонстрували сильну протигрибкову активність проти всіх або 3 із 5 грибкових патогенів (*Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia* AG3, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*) під час спільного посіву на чашці. Для 23 ізолятів (за допомогою тесту на розподіл масла) була встановлена здатність синтезувати біоповерхнево-активні речовини, зокрема для тих самих ізолятів (ізоляти 33, 70, 12, 17 та 48), що характеризувались сильною протигрибковою активністю. Найбільш високопродуктивним за синтезом ІОК є *Stenotrophomonas* sp. 474, концентрація його ауксину складає понад 20,93 мкг/мл. Також штам може солубілізувати фосфор та кальцит,

завдяки синтезованим ПАР (концентрація яких у роботі не визначалась). Найбільшу активність ферменту 1-аміноциклопропан -1-карбоксилат деамідази виявили у штама *Microbacterium* sp. 50 , активність ферменту становить 125,151нмоль мг⁻¹ 30 хв⁻¹ [97].

Відомо, що даний фермент відіграє ключову роль у стресових реакціях рослини. Вперше охарактеризований вченими Nonna і Shimomura у 1978 р. Фермент безпосередньо бере участь у стимулюванні росту рослин за допомогою RGPB (plant growth-promoting rhizobacteria). Тобто після поглинання 1-аміноциклопропан-1-карбоксілової кислоти (АЦК), що виділяється корінням рослин, RGPB розщеплює АЦК до α -кетобутирата та аміаку, RGPB катоболізує АЦК попередника фітогормона інгібіторної дії - етилену. Тобто, ризосферні бактерії виступають стимуляторами росту рослин, оскільки вони пом'якшують стрес рослин завдяки блокуванню синтезу етилену [98].

Деякі ліпопептиди крім властивостей біоповерхнево-активних речовин та протимікробних препаратів, мають ще й властивості сидерофорів. Відомо, що існують ліпопептидні - варіохеліни, клас фотореактивних сидерофорів, що в основному виробляються певними родами морських бактерій, але також можуть синтезуватись асоційованою наземною бактерією *Variovorax boronicumulans* ВАМ-48, ці ліпопептиди стимулюють ріст продукуючого організму та рослини, переводячи залізо у доступну форму, а також відіграють вирішальну роль у формуванні складу мікробіоти рослини [99]

Відомо, що деякі асоційовані бактерії опосередковано захищають рослини від хвороботворних мікробів через стимулювання індукцйбельних захисних механізмів. Ліпопептиди також беруть участь у даному процесі, тобто слугують сигнальними молекулами, які запускають каскад захисних реакцій рослини, які до кінця поки не є вивченими. Відомо, що *Bacillus subtilis* 168 підвищував потенціал захисних механізмів у рослин томатів та бобах. Ендofітні бактерії *Bacillus* sp. пов'язані з кукурудзою та бобами безпосередньо

пригнічують розвиток патогенів, а також індукують активацію гена «захисту» рослини господаря проти грибкових патогенів [100].

Синтез фітогормонів - відома особливість симбіотичних мікроорганізмів. Продукування саме індол-3-оцтової кислоти (ІОК) є достатньо поширеним явищем серед епіфітів. Впродовж тривалого часу утворення мікроорганізмами ауксинів, які викликають гіперплазію рослин, розглядалось як паразитична активність. Здатність до синтезу ІОК спостерігається як для фітопатогенів, так і для сапрофітних ендоефітів. Вважається, що утворення епіфітами помірної кількості ІОК за умов екзогенного впливу стимулює руйнування клітинної стінки, що призводить до вивільнення полісахаридів. Структурні полісахариди суттєво збагачують філоплан, що сприяє колонізації поверхні листка епіфітами [69].

Продуценти ПАР також синтезують ауксини, а саме ІОК. Зокрема, ендоефітні *Bacillus* sp. Fc11 [85] синтезували ітурин А і сурфактин, які проявляли антимікробну дію щодо фітопатогенних грибів родів *Fusarium*, *Phytophthora*, *Sclerotium*, *Corynespora*, а також синтезують індол-3-оцтову кислоту, наявність якої у культуральній рідині було встановлено якісною реакцією з реагентом Салковскі.

Представники родів *Pseudomonas* синтезують ауксини у невеликих концентраціях: ендоефітний *P. aeruginosa* L10 [68] за культивування на дизельному паливі синтезував рамноліпіди та ІОК у концентрації 27 мкг/л, а *P. aeruginosa* RTE4 [14], штаб (виділений з ризосфери чаю) крім дирамноліпідів утворює 74,54 мкг/л індол-3-оцтової кислоти. Значно більші кількості ІОК утворюються під час культивування *B. amyloliquefaciens* JK6 [49] (виділений із ґрунту ризосфери томатів) окрім сурфактину може виробляти сидерофори, протеази та індол оцтову кислоту – 3 650 мкг/л. Штами бацил: *Bacillus* sp. B19, *Bacillus* sp. P12 [101] ізольовані із ризосферного ґрунту бобових, синтезують комплекс антимікробних сполук (поверхнево-активні ліпопептиди: курстакін,

сурфактин, ітурин, фенгіцин і антибіотик поліміксин), а також ауксини, концентрація останніх становила 5710 і 4900 мкг/л.

Найбільш продуктивними є ендоефітний штам Олійного ріпаку *P. fluorescens* BRZ63 та *Enterobacter asburiae* 4FJK (індофіт Ястребинки високої) концентрації їх ІОК становлять 59 620 мкг/л та 34 530 мкг/л, відповідно. Позитивна реакція на агарі з метиленовим синім показала, що ПАР, синтезовані штамом BRZ63, за хімічною природою є рамноліпідами [60].

Отже, на теперішній час є невелика кількість повідомлень про здатність продуцентів поверхнево-активних речовин синтезувати фітогормони, причому наявні у літературі дані засвідчують синтез продуцентами ПАР тільки ауксинів, здебільшого індоліл-3-оцтової кислоти, найбільш продуктивним виявився саме ендоефітний штам роду *Pseudomonas*.

Описавши сучасну наукову літературу про асоційовані із рослинами бактерії, можна дійти висновку, що дані мікроорганізми найчастіше належать до роду *Pseudomonas* – продуценти рамноліпідів та до роду *Bacillus* – ліпопептиди. Зокрема, саме дією аміноліпідів (найчастіше сурфактинів, ітуринів, фенгіцинів) пояснюються їх антимікробні властивості. Вторинні метаболіти, що продукуються даними мікроорганізмами, у комплексі позитивно впливають на організм рослини. Так, ПАР виконують роль не лише агентів у боротьбі із фітопатогенами (проявляючи антибактеріальну і антифунгальну дію), а й стимуляторів росту, адже дають змогу засвоювати нерозчинні у воді поживні речовини. Деякі ліпопептиди виконують роль сидерофорів, їх дія покращує засвоюваність поживних речовин (в тому числі і заліза). Також бактерії родів *Pseudomonas*, *Bacillus* можуть синтезувати фітогормони – ауксини (переважно індол-3-оцтову кислоту), найефективнішими продуцентами є саме бацили. РГРВ здатні активувати захисні механізми рослини. ПАР асоційованих бактерій проявляють високу антибактеріальну здатність щодо фітопатогенів, а щодо патогенних грибів найбільш дієвими є ПАР саме ендоефітних штамів.

Саме тому, вторинні метаболіти асоційованих бактерій можуть стати основою для створення комплексного препарату із антимікробними і ріст-стимулювальними властивостями, задля використання у рослинництві, адже вони мають ряд переваг перед синтетичними аналогами:

- є екологічно безпечними;
- можуть застосовуватись з метою біоремедіації, адже ПАР здатні емульгувати вуглеводні (наприклад, нафту);
- ПАР є стійкими до широкого спектру екстримальних умов (значення рН, температура, висока солоність, концентрація важких металів);
- завдяки наявності фітогормонів відбувається стимуляція росту рослин..

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Методики визначення оптимальної концентрації триптофану та часу його внесення в середовище культивування продуцента поверхнево-активних речовин (ПАР).

2.1. Об'єкти досліджень

Об'єкти дослідження – штами нафтоокиснювальних бактерій, виділені із ґрунту ідентифіковані як *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 та *Rhodococcus erythropolis* К-9, зареєстровані у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номерами ІМВ В-7241 та ІМВ Ас-5017 .

2.2. Культивування продуцентів поверхнево-активних речовин

Культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 здійснювали в рідкому мінеральному середовищі (г/л дистильованої води): NaNO_3 – 1.3, NaCl – 1.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0.6, KH_2PO_4 – 0.14, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.001, рН 6.8–7.0. Джерело вуглецю та енергії – етанол, а також відпрацьована після смаження м'яса соняшникова олія в концентрації 2 % (об'ємна частка).

A. calcoaceticus ІМВ В-7241 теж культивували в рідкому поживному середовищі (г/л дистильованої води): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0.35, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, NaCl – 1.0, Na_2HPO_4 – 0.6, KH_2PO_4 – 0.14, рН 6.8–7.0. Середовище доповнювали дріжджовим автолізатом – 0.5 % (за об'ємом) і розчином мікроелементів - 0,1% (за об'ємом). Розчин мікроелементів наступного складу (г/100 мл): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1.1, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.6, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.004, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.03, H_3BO_3 – 0.006, KI – 0.0001, EDTA – 0.5.

					НУХТ БТЕК 04.01.03 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	Літ.	Арк.	Акрівшів
Розроб.		Жданюк В.І.					43	169
Перевір.		Пирог Т.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		

У якості джерела вуглецю використовували технічний гліцерин (побічний продукт виробництва біодизелю - Комсомольський біопаливний завод, Полтавська область) та етанол у концентрації в 2.0 % (об'ємна частка).

Триптофан вносили у середовище у вигляді 1 %-го розчину у кількості 100, 200 або 300 мг/л для *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та у кількості 200 або 300 мг/л для *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на початку процесу або в кінці експоненційної фази росту (на 48 год культивування).

У якості інокуляту використовували культури в експоненційній фазі росту, вирощені на відповідних рідких середовищах, що містили 0,5–1 % (об'ємна частка) субстрату. Кількість посівного матеріалу (10^4 – 10^5 кл/мл) становила 5–10 % від об'єму поживного середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 28–30°C упродовж 120 год (5 діб).

2.3. Одержання екстрактів з фітогормональною активністю

Фітогормони визначали у супернатанті, для отримання якого культуральну рідину *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 центрифугували (5000 g) упродовж 25 хв. Залишки соняшникової олії з культуральної рідини видаляли шляхом її трикратної екстракції петролейним ефіром або гексаном (співвідношення 1:1).

Позаклітинні фітогормони ауксини виділяли методом перерозподілу фітогормонів у двох фазах розчинників, що не змішуються між собою. Як органічний розчинник використовували етилацетат, рН 3,0. Екстракти випарювали під вакуумом при 40-45°C. Сухий залишок перерозчиняли у 80%-ному етанолі, переносили у мікропробірки. Отримані екстракти зберігали за температури –24°C.

Визначення концентрації фітогормонів ауксинової природи

Попереднє очищення і концентрування фітогормональних екстрактів (накопичувальна тонкошарова хроматографія) проводили на пластинках із силікагелем марки «Silufol UV₂₅₄» (*Chemapol*, Чехія) у суміші розчинників, що

вводили послідовно: хлороформ, 12,5 % водний аміак, етилацетат: оцтова кислота (20:1).

Якісний і кількісний склад ауксинів аналізували методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC), з використанням рідинного хроматографа Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) та мас-спектрометричного детектора Agilent G1956B. HPLC/MS аналіз ауксинових екстрактів ІМВ В-7241 та ІМВ Ас-5017 виконано у Центрі колективного користування при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Для порівняння використовували стандартні синтетичні фітогормони *Sigma* (Німеччина) і *Acros Organic* (Бельгія).

В якості рухомої фази використовували метанол (А) та 1% розчин оцтової кислоти в воді (В). Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (2,1мм×150мм, 3 мкм) (Agilent Technologies, USA), швидкість потоку через колонку 0,25 мл/хв, температура термостату 30 °С, об'єм інжекції 2 мкл. Елюювання проводили в градієнтному режимі: 0 хв – А (30 %) : В (70 %); 25 хв – А(30 %) : В (70 %); 35 хв – А (100 %) : В (0 %); 35 хв – А (100 %) : В (0 %).

Детекцію сполук проводили з використанням діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналу при 254 та 280 нм та фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 191-700 нм. Для визначення молекулярних мас досліджуваних сполук використовували мас-спектрометричний детектор Agilent G1956B (Agilent Technologies, USA). Іонізацію проводили в режимі ESI та APCI з фіксацією позитивних іонів в режимі SCAN в діапазоні 100-1200 m/z. Калібрування проводили з використанням стандартних розчинів ауксинів.

2.4. Ензиматичні аналізи

Для визначення активності ферменту трансамінази після внесення триптофану.

2.4.1. Одержання безклітинних екстрактів

З метою одержання безклітинних екстрактів культуральну рідину, отриману після вирощування як *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 так і *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, центрифугували (4000 g, 15 хв, 4°C). Осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М К⁺-фосфатним буфером (рН 7,0), центрифугували (4000 g, 15 хв, 4°C). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М К⁺ - фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнували ультразвуком (22 кГц) трикратно (по 60 с при 4°C на апараті УЗДН-1). Дезінтеграт центрифугували (12000 g, 30 хв, 4 ° С), осад відкидали, надосадову рідину використовували в якості безклітинного екстракту.

2.4.2. Аналіз активності триптофантрансамінази

Активність триптофантрансамінази (ЕС 2.6.1.27, інші назви: L-фенілаланін-2-оксоглутарат амінотрансфераза; триптофан амінотрансфераза; 5-гідрокситриптофан-кетоглутарова трансаміназа; гідрокситриптофан амінотрансфераза; триптофан амінотрансфераза; L-триптофан трансаміназа) визначали за утворенням L-триптофану і 2-оксоглутарату індол-піруват, який аналізували спектрофотометрично при 330 нм [117].

Всі досліді проводили в 3 повтореннях, кількість паралельних визначень в експериментах становило від 3 до 5. Статистичну обробку експериментальних даних проводили, як описано раніше [1]. Відмінності середніх показників вважали достовірними при рівні значущості $p < 0.05$.

РОЗДІЛ 3. ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ АУКСИНІВ

ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB-7241 ТА

RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS IMB Ac-5017

Попередні дослідження показали, що синтез метаболітів ауксинової природи залежав від природи джерела вуглецю в середовищі культивування як для *R. erythropolis* IMB Ac-5017, так і для *A. calcoaceticus* IMB B-7241 [8].

Вибір субстратів (етанол та технічний гліцерин) для вирощування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 обумовлений даними отриманих в попередніх дослідженнях:

1. за умов росту на відходах виробництва біодизелю штам *A. calcoaceticus* IMB B-7241 синтезував найвищу кількість ауксинів (122,0 мкг/л) порівняно з такою на інших субстратах [8].
2. існує проблема утилізації технічного гліцерину, у зв'язку зі збільшенням обсягів виробництва біодизелю у світі, а саме: з кожних 100 кг біодизелю утворюється 10 кг гліцерину [118].
3. комплексний мікробний препарат повинен характеризуватися високою антимікробною активністю щодо фітопатогенних бактерій, а раніше [103] було встановлено, що такі властивості притаманні поверхнево-активним речовинам, синтезованим у процесі культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на етанолі.

Аналогічним чином здійснювався вибір субстратів (етанол та відпрацьована після смаження м'яса соняшникова олія) з метою інтенсифікації синтезу ауксинів для вирощування *R. erythropolis* IMB Ac-5017.

Вибір субстрату зумовлений такими причинами:

					НУХТ БТЕК 04.01.03 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Жданюк В.І.			РОЗДІЛ 3. ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ АУКСИНІВ <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> IMB-7241 ТА <i>RHODOCOCCLUS</i> <i>ERYTHROPOLIS</i> IMB Ac-5017	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Пирог Т.П.					47	169
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

- штам ІМВ Ас-5017 синтезував найвищу кількість ауксинів за умов росту на відпрацьованій олії (91,3 мкг/л) та етанолі (84,3 мкг/л) порівняно з такою на інших субстратах [115];
- комплексний мікробний препарат повинен характеризуватися високою антимікробною активністю щодо фітопатогенних бактерій, а раніше [120] було встановлено, що такі властивості притаманні поверхнево-активним речовинам, синтезованим у процесі культивування ІМВ Ас-5017 на відпрацьованій соняшниковій олії;
- відпрацьована олія є токсичним відходом, викиди якої в Україні не регламентуються, а використання її як субстрату дасть змогу одночасно утилізувати небезпечні відходи та знизити собівартість цільового продукту для рослинництва.

Інтенсифікація синтезу ІОК за наявності триптофану зумовлена тим, що у мікроорганізмів ця амінокислота є попередником біосинтезу 3-індолілоцтової кислоти [121].

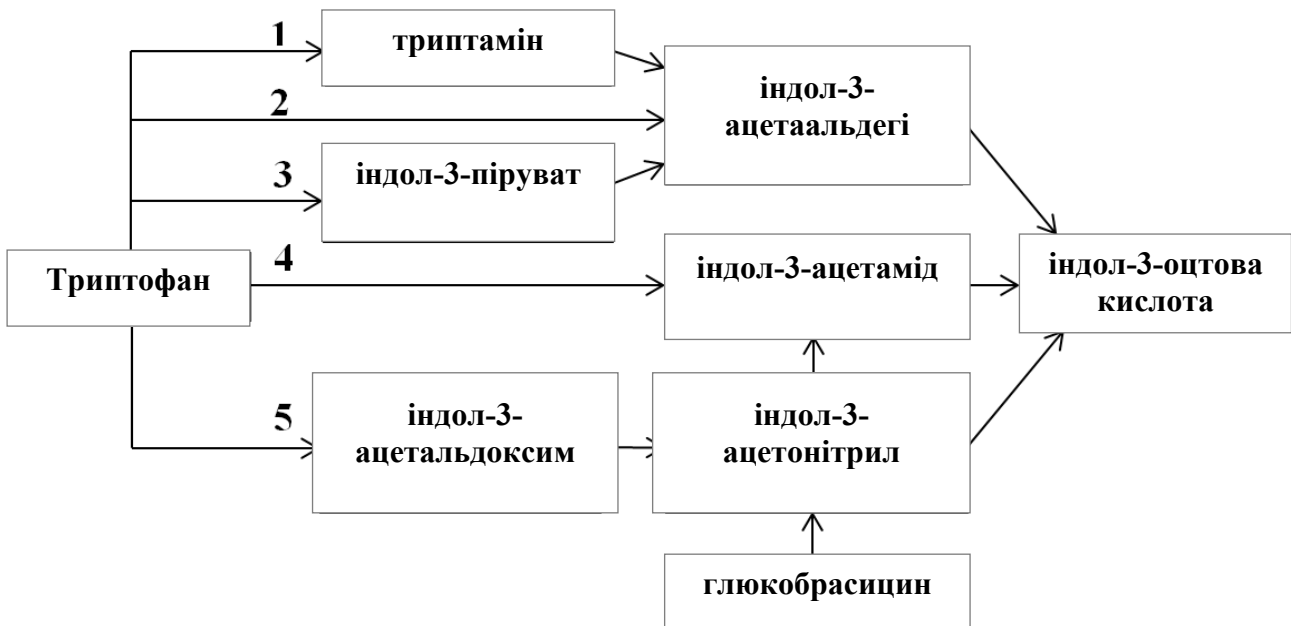


Рис. 3.1. Шляхи синтезу індоліл-3-оцтової кислоти з триптофану у бактерій.

1 – через триптамін; 2 – обхідний триптофановий шлях; 3 – через індол-3-піруват; 4 – через індол-3-ацетамід; 5 – через індол-3-ацетонітрил.

Перетворення триптофану на ІОК може здійснюватися трьома шляхами (рис. 3.1):

– синтез через індол-3-піровиноградну кислоту та індол-3-оцтовий альдегід. Це основний шлях, характерний для грибів і бактерій;

– перетворення триптофану на індол-3-оцтовий альдегід може включати альтернативний шлях синтезу, в якому утворюється триптамін. Даний шлях зустрічається у мікоризних грибів та ціанобактерій.

– утворення ІОК через індол-3-ацетамід. Характерний для фітопатогенних бактерій і грибів.

В опублікованому огляді [7] ми акцентували увагу на тому, що більшість ґрунтових мікроорганізмів, як асоційованих, так і не асоційованих з рослинами, синтезують фітогормони ауксинової природи за наявності у середовищі культивування екзогенного триптофану, який є попередником синтезу індол-3-оцтової кислоти (ІОК). Причому дослідники вносили триптофан у середовище на початку процесу культивування і зазвичай у достатньо високій концентрації (до 10 г/л). Зазначимо, що фітогормони є вторинними метаболітами, утворення яких починається у стаціонарній фазі росту, тому логічнішим видається і додавання попередника на цьому етапі процесу. Крім того, концентрація попередників, використовуваних для інтенсифікації синтезу у мікробних біотехнологіях, як правило становить 0,1–0,2 % від вмісту джерела вуглецю у середовищі культивування [114]

3.1. Вплив триптофану на синтез фітогормонів ауксинової природи

***A. calcoaceticus* IMB 7241**

Дані, наведені у табл. 3.1, засвідчують, що незалежно від моменту внесення триптофану у середовище культивування штаму IMB B-7241 з технічним гліцериним спостерігали суттєве підвищення синтезу ауксинів порівняно з показниками на середовищі без цього попередника. Серед ауксинів були виявлені індол-3-оцтова кислота, індол-3-карбонова кислота, індол-3-

масляна кислота, індол-3-оцтової кислоти гідрозид, проте найбільший вміст становила ІОК, попередником якої є триптофан.

Таблиця 3.1

**Вплив триптофану на синтез ауксинів у процесі культивування
A. calcoaceticus ІМВ В-7241 на технічному гліцерині**

Кількість триптофану, мг/л	Фаза росту	Концентрація ауксинів, мкг/л				Сума ауксинів, мкг/л
		ІОК	ІКК	ІМК	ІОК-гідрозид	
0	Лаг-фаза	150,8	24,6	–	–	175,4
100	Лаг-фаза	207,65	171,15	–	–	378,80
	Кінець експоненційної фази	359,85	309,22	–	735,66	1404,73
200	Лаг-фаза	242,46	184,38	–	–	426,84
	Кінець експоненційної фази	694,74	600,3	–	–	1295,04
300	Лаг-фаза	1123,0	401,70	47,74	–	1572,44
	Кінець експоненційної фази	4091,0	717,89	42,09	–	4850,98

Примітка. ІОК – індол-3-оцтова кислота; ІКК – індол-3-карбонова кислота; ІМК – індол-3-масляна кислота; ІОК-гідрозид – індол-3-оцтової кислоти гідрозид. «–» – не виявлено.

Відомо [114], що більшість попередників залучаються до процесів біосинтезу вторинних метаболітів в кінці експоненційної або на початку стаціонарної фаз росту. Це чітко прослідковувалося за умов вирощування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва біодизелю: внесення 100, 200 і 300 мг/л триптофану в кінці експоненційної фази росту супроводжувалося підвищенням концентрації синтезованих ауксинів в 8, 7.4 та 27.7 рази відповідно (див. табл. 3.1). У той же час інші закономірності спостерігали під час культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі з етанолом: для більшості варіантів найвищу концентрацію ауксинів спостерігали у разі внесення триптофану на початку процесу культивування (див. табл. 2.2). Виясненню даних питань будуть присвячені подальші дослідження. Разом з тим зазначимо, що з точки зору організації технологічного виробництва внесення попередника на початку процесу є значно зручнішим

Суттєве підвищення концентрації ауксинів при культивуванні *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на етанолі (табл. 3.2) спостерігали лише у разі внесення максимальної кількості триптофану (300 мг/л). За внесення 100 мг/л триптофану рівень синтезу ауксинів практично не відрізнявся від такої, одержаної при культивуванні без попередника. А при додаванні 200 мг/л, зокрема, в кінці експоненційної фази росту, спостерігали незначне підвищення – в 1,6 разів .

Таблиця 3.2

Синтез ауксинів за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі з етанолом із внесенням триптофану

Кількість триптофану, мг/л	Фаза росту	Концентрація ауксинів, мкг/л		Сума ауксинів, мкг/л
		ІОК	ІКК	
0	Лаг-фаза	173,32	47,10	220,42
100	Лаг-фаза	126,98	113,89	240,87
	Кінець експоненційної фази	130,08	95,67	225,75
200	Лаг-фаза	135,67	97,30	232,97
	Кінець експоненційної фази	136,04	216,84	352,88
300	Лаг-фаза	995,47	1242,0	2261,66
	Кінець експоненційної фази	710,13	396,74	1106,87

Примітка. ІОК – індол-3-оцтова кислота; ІКК – індол-3-карбонова кислота.

Дані, наведені у табл. 3.1 і 3.2, засвідчують, що концентрація синтезованих ауксинів підвищувалася із збільшенням концентрації попередника у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241. Не виключено, що й подальше підвищення кількості триптофану буде супроводжуватися інтенсифікацією синтезу ауксинів. Проте на даному етапі для створення ефективного мікробного препарату з ріст-стимулювальними властивостями в цьому немає необхідності, оскільки за досягнутої концентрації ауксинів (2000–5000 мкг/л, див. табл. 2.1 і 2.2) культуральну рідину *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з метою обробки насіння або кореневої системи розсади рослин необхідно розбавляти як мінімум у 400–500 разів.

3.2. Синтез ауксинів *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за наявності триптофану

Встановлено (див. табл. 3.3) , що незалежно від моменту внесення триптофану у середовище культивування штаму ІМВ Ас-5017 з відпрацьованою олією спостерігали суттєве підвищення синтезу ауксинів порівняно з показниками на середовищі без цього попередника. Серед ауксинів були виявлені індол-3-оцтова кислота, індол-3-карбонова кислота, індол-3-масляна кислота, абсцизова кислота, проте найбільший вміст становила ІОК, попередником якої і є триптофан.

Таблиця 3.3

Вплив триптофану на синтез ауксинів у процесі культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на відпрацьованій олії

Ауксини	Концентрація ауксинів (мкг/л) за наявності у середовищі триптофану (мг/л)				
	Без триптофану (контроль)	200		300	
		а	б	а	б
ІОК	2.49	565.248	374.798	424.888	1876.0
ІКК	5.4	606.042	273.08	320.221	522.144
ІВutА	1.96	–	–	–	–
АВА	–	18,293	–	21,007	–
Сума	9.85	1189.58	647.88	766.125634	2398.14

Примітка. Триптофан вносився під час лаг-фази або наприкінці експоненційної фази. ІОК – індол-3-оцтова кислота; ІКК – індол-3-карбонова кислота; ІК – індол-3 -карбоксальдегід; ІОК-гідрозид – індол-3-оцтової кислоти гідрозид. «–» – не виявлено.

Найбільший рівень синтезу спостерігали при додаванні 300 мг/л триптофану в кінці експоненційної фази росту (2398.14 мкг/л порівняно з 9.85 мкг/л на середовищі без попередника). Такі дані узгоджуються з припущенням,

що більша інтенсифікація синтезу фітогормонів буде відбуватися саме за таких умов, оскільки фітогормони є вторинними метаболітами (рис. 3.1) .

У той же час у разі внесення 300 мг триптофану у середовище з етанолом кількість синтезованих *R. erythropolis* IMB Ac-5017 ауксинів становила 5634.22 мкг/мл (табл. 3.4) і була у два рази вищою, ніж за аналогічних умов культивування на відпрацьованій олії (2398.14 мкг/л, див. табл. 3.3). Так само, як і при вирощуванні *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на відпрацьованій олії, під час культивування штаму на етанолі збільшення концентрації триптофану у середовищі супроводжувалося підвищенням кількості синтезованих ауксинів. Зазначимо проте, що рівень синтезу ауксинів на етанолі не залежав від моменту внесення триптофану. За додавання триптофану як на початку процесу культивування, так і в кінці експоненційної фази росту концентрація ауксинів була практично однаковою (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Синтез ауксинів *R. erythropolis* IMB Ac-5017 за наявності у середовищі з етанолом триптофану

Ауксин	Концентрація ауксинів (мкг/л) за наявності у середовищі триптофану (мг/л)				
	Без триптофану (контроль)	200		300	
		a	b	a	b
ІОК	110.31	3302.0	2189.0	4404.0	4597.0
ІКК	25.63	452.016	370.752	979.48	977.54
ІButA	–	41.564	38.014	54.755	59.678
АВА	7.225	104.402	111.579	113.693	–
Сума	143.17	2899.98	2709.35	5551.93	5634.22

Примітка. Триптофан вносився під час лаг-фази або наприкінці експоненційної фази. ІОК – індол-3-оцтова кислота; ІКК – індол-3-карбонова кислота; ІК – індол-3-карбоксамальдегід; ІОК-гідрозид – індол-3-оцтової кислоти гідрозид. «–» – не виявлено.

Загалом, внесення триптофану у середовище з обома субстратами дало змогу підвищити сумарну концентрацію ауксинів у 20-240 разів порівняно з такою без попередника біосинтезу. Не виключено, що й подальше підвищення кількості триптофану буде супроводжуватися інтенсифікацією синтезу ауксинів. Проте на даному етапі для створення ефективного мікробного препарату з ріст-стимулювальними властивостями в цьому немає необхідності, про що сказано вище.

3.3. Вплив умов культивування *A. calcoaceticus* IMB 7241 та *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на трансаміназну активність

Для підтвердження того, що екзогенний триптофан залучається до біосинтезу ауксинів, проводили аналіз активності одного з ключових ферментів синтезу індол-3-оцтової кислоти – триптофантрансамінази, яка каталізує реакцію утворення індол-3-піровиноградної кислоти з триптофану і 2-оксоглутарату. Як свідчать дані, наведені на рис. 2.2 та 2.3, при культивуванні *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на середовищі з технічним гліцерином та *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на середовищі з етанолом за внесення 300 мг/л триптофану, активність цього ферменту була вищою, ніж на середовищі без цього попередника..

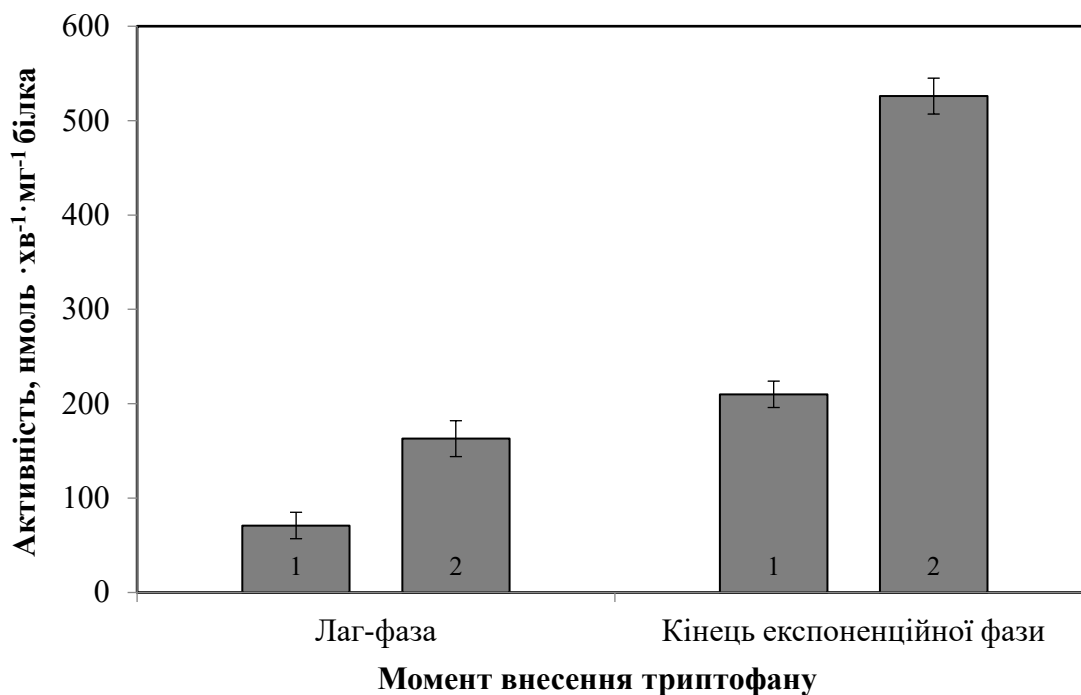


Рис. 3.2 Вплив триптофану на активність триптофантрансамінази в різних умовах культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241
1 – без триптофану; 2 – триптофан, 300 мг/л

Аналогічні результати дослідження можна спостерігати для *R. erythropolis* IMB Ac-5017, однак слід сказати, що активність триптофантрансамінази за умови внесення попередника під час лаг-фази є дещо більшою, порівнюючи із даними щодо активності цього ферменту у *A. calcoaceticus* IMB B-7241. Крім того, варто зазначити, що при внесенні триптофану в кінці експоненційної фази росту активність ферменту триптофантрансамінази для IMB B-7241 була в 3.2 рази вищою і в 1,6 разів для IMB Ac-5017, у порівнянні з внесенням під час лаг-фази, що узгоджується з даними, наведеними в табл. 3.1-3.4, щодо концентрації утворених ауксинів

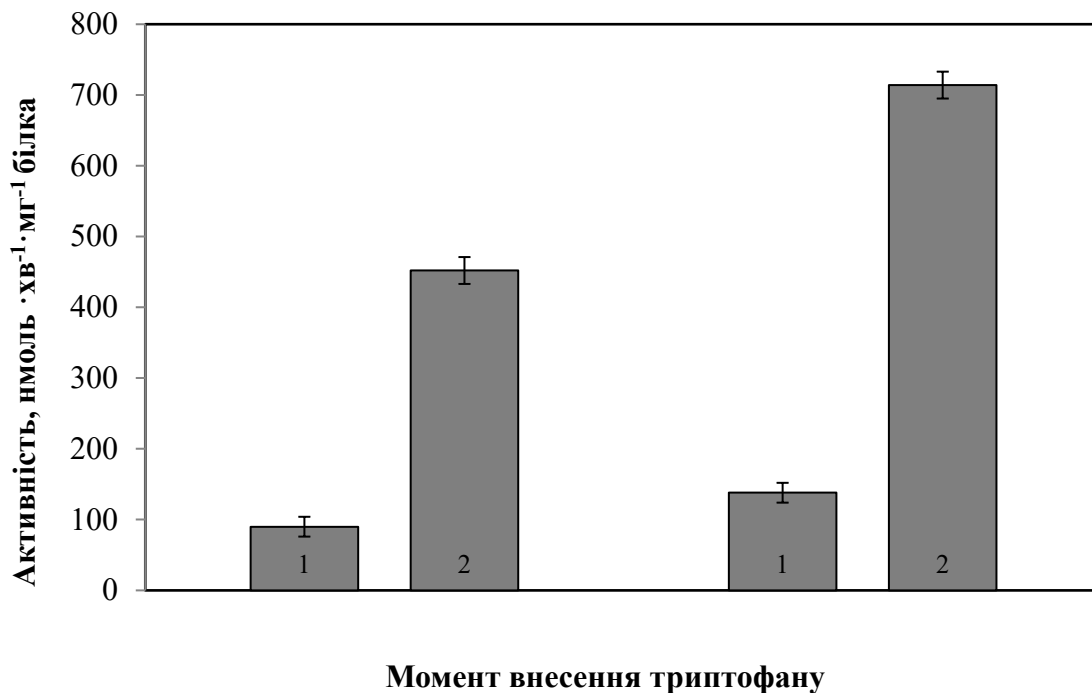


Рис. 3.3 Вплив триптофану на активність триптофантрансферази *R. erythropolis* IMB Ac-5017

1 – без триптофану; 2 – триптофан, 300 мг/л

Наведені дані, дають змогу припустити, що біосинтез ІОК для обидвох штамів відбувається через утворення індол-3-пірувату (див. рис. 3.2 та 3.3).

У 2015–2016 рр. було опубліковано дві роботи [3,122], в яких вперше повідомили про здатність продуцентів поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 синтезувати фітогормони ауксинової природи.. Тільки після публікації цих робіт з'явилось повідомлення про утворення індоліл-3-оцтової кислоти бактеріями (переважно представниками роду *Rhodococcus*), ізольованими з забруднених вуглеводнями і важкими металами ґрунтів [123]. У 2018 р. було опубліковано три роботи [68,93,101], в яких встановлено здатність продуцентів поверхнево-активних ліпопептидів і рамноліпідів синтезувати фітогормони ауксинової природи. Так, ендofітний штам *Bacillus* sp. Fc11 [93] синтезував ітурин А і сурфактин, які проявляли антимікробну дію на фітопатогенні гриби родів *Fusarium*, *Phytophthora*, *Sclerotium*, *Corynespora*, а також індоліл-3-оцтову кислоту, наявність якої у культуральній рідині було

встановлено якісною реакцією з реагентом Салковскі (без попереднього внесення триптофану). Автори роботи не аналізували концентрацію синтезованих ліпопептидів та індоліл-3-оцтової кислоти.

Bacillus sp. B19, *Bacillus* sp. P12 і *Bacillus amyloliquefaciens* B14, як згадувалось раніше, синтезують комплекс антимікробних сполук (поверхнево-активні ліпопептиди курстакін, сурфактин, ітурин, фенгіцин і антибіотик поліміксин), а також ауксини [101]. Концентрація ауксинів, синтезованих штамом B14 становить 10 000 мг/л. В середовище культивування не вносили триптофан. Однак, як джерело вуглецю для вирощування продуцентів використовували триптон, який містить в своєму складі триптофан.

Ендofітний штам *Pseudomonas aeruginosa* L10 [68] за умов росту на дизельному паливі (5 г/л) синтезував рамноліпіди, які знижували поверхневий натяг до 29,5 мН/м, та індоліл-3-оцтову кислоту у концентрації 27 мкг/л. Зазначимо, що у даній роботі автори не намагалися підвищити синтез ІОК.

Таким чином, дана робота є першою, в якій повідомляється про інтенсифікацію синтезу ауксинів продуцентами поверхнево-активних речовин шляхом внесення попередника біосинтезу – триптофану. Втім, є повідомлення щодо інтенсифікації синтезу ІОК іншими ґрунтовими мікроорганізмами. Liu зі співавт. [104] показали, що культивування *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007, ендofіту тополі, на триптон-соєвому середовищі у присутності 1 г/л триптофану дало змогу підвищити синтез ІОК з 0,795 мг/л до 6,621 мг/л. Дослідниками не вдалося досягти необхідного ступеня трансформації триптофану в індол-3-оцтову кислоту.

В наступних роботах [105–110, 111–113] спостерігали значно ефективніше перетворення попередника в ауксин. Так, збудник хвороби томатів *Pseudomonas syringae* DC3000 синтезує ІОК через утворення індол-3-ацетальдегіду з індол-3-пірувату (див рис. 3.1) [105]. При додаванні у середовище культивування 0,1 г/л триптофану концентрація ІОК становила 2,7

мг/л, що на декілька порядків вище, ніж без внесення попередника біосинтезу (0,03 мг/л). У той же час дослідники перевіряли вплив і інших попередників на утворення ІОК, зокрема, індол-3-ацетальдегіду та індол-3-ацетонітрилу. Таким чином, при внесенні в середовище культивування цих попередників концентрація ауксину на 48 год культивування становила 11,7 мг/л і 14,1 мг/л відповідно.

Вченими з Таїланду [107] з ризосфери орхідеї (*Dendrobium pulchellum*) було виділено неідентифікований штам під номером DPY-05, який на маніто-дріжджовому середовищі утворював ІОК в концентрації 67,18 мг/л (в присутності 0,5 г/л триптофану), що майже в 9 разів вище, ніж без внесення попередника біосинтезу (11,48 мг/л). У роботі [108] зазначено, що концентрація ІОК, синтезованої виділенням з ризосфери гусятника (*Eragrostis cynosuroides*) *Bacillus subtilis* DR2, підвищувалася майже в 1,7 разів (168,1 мг/л порівняно з 100,26) у середовищі з манітолом і 1,2 г/л триптофану.

Є дослідження [109,111,113], які спрямовані на створення потенційних промислових штамів-продуцентів ІОК з метою одержання високих концентрацій синтезованого ауксину. На сьогоднішній день найбільш широко застосування отримали методи генетичної модифікації для конструювання організмів з необхідними властивостями. Не винятком є і отримання над продуцентів індол-3-оцтової кислоти.

Guo зі співавт. [112] *de novo* розробили індол-3-піруватний шлях синтезу ІОК в геномі *Escherichia coli* RARE, який нездатний до синтезу фітогормонів ауксинової природи. Процес генетичної модифікації відбувався із використанням трьох генних продуктів: амінотрансфераза ARO8 від *Saccharomyces cerevisiae*, яка перетворює L-триптофан в індол-3-піруватну кислоту, декарбоксилаза KDC для декарбоксилювання індол-3-пірувату до індол-3-ацетальдегіду та послідовність генів *E. coli aldH*, яка відповідає за окиснення індол-3-ацетальдегіду до індол-3-оцтової кислоти. Новостворений штам *E. coli* DG121 утворював до 387 мг/л ІОК у присутності 0,5 г/л

триптофану на середовищі з глюкозою (концентрацію ІОК без внесення триптофану не визначали).

Однак, є повідомлення [113] про те, що ендофіт рису *Enterobacter* sp. DMKU-RP206 здатен до синтезу індол-3-оцтової кислоти на рівні 415 мг/л без внесення триптофану у середовище культивування. Далі при культивуванні штаму в колбах найвищу концентрацію фітогормонів було одержано на середовищі з лактозою і 11 г/л триптофану – 3804 мг/л ІОК. Подальше масштабування процесу у ферментері і підбір оптимальної аерації середовища (2 л/л·хв) дали змогу підвищити вихід ауксину до 5,56 г/л, що в 13,4 рази більше, ніж в умовах культивування без попередника. Така концентрація дає змогу розглядати штам DMKU-RP206 як перспективний продуцент ауксину для розробки відповідної технології.

Крім того, більшість дослідників проводять аналіз здатності до синтезу фітогормонів на багатих поживних середовищах, які містять як джерело вуглецю триптон [104], манітол [105], сахарозу [109], пептон [111], глюкозу [11262], лактозу [113]. Такі середовища для вирощування продуцентів фітогормонів є дорогими, тому існує потреба у зниженні їх собівартості, зокрема за рахунок пошуку дешевших вуглецевих субстратів.

Отже, проаналізувавши літературні дані, можна стверджувати, що дослідження синтезу ауксинів *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMBAs-5017 на дешевому середовищі з використанням як субстрату пересмаженої олії були першими. Подібні відомості у літературі відсутні.

Отже, результати досліджень є основою для підвищення ефективності використання у рослинництві комплексних препаратів *R. erythropolis* IMB As-5017 та *A. calcoaceticus* IMB B-7241 з ріст-стимулювальними і антимікробними щодо фітопатогенних бактерій властивостями.

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 4. ДІЛЯНКА ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ КОМПЛЕКСНОГО МІКРОБНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ІМВ 7241

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

Здатність *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 утворювати комплекс ПАР та фітогормонів була встановлена, за умови вирощування на різноманітних субстратах: традиційних (етанолі, гліцерині, н-гексадекані, рафінованій олії, глюкозі) та промислових відходах (відпрацьованій олії після смаження м'яса, технічному гліцерині, рідких парафінах, фузах, мелясі) [124,125,126].

Аналізуючи наукову літературу, задля об'єктивного порівняння продуцентів вище наведених метаболітів, було обрано наступні штами *Pseudomonas aeruginosa* Prh1AB, *P. aeruginosa* LBI 2A1 та *P. azotoformans* AJ15.

Наведені штами Prh1AB, LBI 2A1 є доволі ефективними продуцентами поверхнево-активних речовин при вирощуванні на відході біодизелю – технічному гліцерині, а *P.azotoformans* AJ15 має здатність до синтезу як ПАР, так і фітогормону, що дає змогу порівнювати його із штамом ІМВ В-7241.

Узагальнююча характеристика технологічних особливостей одержання поверхнево - активних речовин та фітогормонів наведено у табл. 4.1.

Безсумнівною перевагою *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 перед іншими порівнюваними мікроорганізмами є висока концентрація синтезованих ПАР (5,6 г/л), а також його здатність утворювати комплекс фітогормонів стимулювальної дії (ауксинів, цитокінінів, гіберелінів).

					НУХТ БТЕК 04.01.03 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Літ.	Арк.	Акрюшів
Розроб.		Жданюк В.І.				60	169
Перевір.		Пирог Т.П.			Кафедра БТМ		
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					

Інші три штами практично не відрізняються між собою за ПАР-синтезувальною здатністю (концентрація ПАР 1–2,9 г/л).

Перевагою штаму *P. azotoformans* AJ15 перед *P. aeruginosa* LBI 2A1 та *P. aeruginosa* PrhlAB є те, що він синтезує фітогормони, щоправда, лише індол-3-оцтову кислоту (ІОК) і тільки за наявності в середовищі культивування попередника біосинтезу триптофану.

Тому для одержання мікробного препарату доцільно обрати один з двох мікроорганізмів – *A. calcoaceticus* IMB B-7241 або *P. azotoformans* AJ15.

Особливості одержання поверхнево- активних речовин та фітогормонів за допомогою

A. calcoaceticus IMB B-7241, *P.aeruginosa* Prh1AB, *P.aeruginosa* LBI 2A1, *P. azotoformans* AJ15

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація ПАР, мг/л	Концентрація фітогормонів мкг/л	Особливості процесу біосинтезу	Виділення цільового продукту (екстракція ПАР)	Використана література, рік
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	Технічний гліцерин – 2%(об'ємна частка) (NH ₂) ₂ CO ₃ –0,35; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,1; NaCl–1,0; Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O–0,6; KH ₂ PO ₄ – 0,14; Дріжджовий автолізат – 0,5% Розчин мікроелементів 0,1% (г/100 мл): ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 1,1; MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,6; FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,1; CuSO ₄ ·5H ₂ O– 0,004; CoSO ₄ ·7H ₂ O–0,03; H ₃ BO ₃ – 0,006; KI – 0,0001; ЕДТА (трилон Б) – 0,5.	168	5,6± 0,28	122.0 (ауксини), 363,9 (цитокініни), 7,36 (гібереліни)	Культивування в колбах об'ємом 750 мл на качалці (320 об/хв) при 28-30 °С;	Культуральну рідину центрифугують протягом 20 хв. при 5000 об/хв та температурі 5°С. Супернатант екстрагують сумішшю Фолча (хлороформ – метанол – 2:1). Випарювання екстракту на ротаційному випарнику при 50 °С.	Пирог Т.П., Леонова Н.О., Шевчук Т.А. Синтез фітогормонів– продуцентами поверхностно-активних речовин. <i>Известия Нац. ак.наук Беларуси. Серия биологических наук.</i> 2016, (1): 111-116. Пирог Т.П., Гаврилкіна Д.В., Леонова Н.О., Іутинська Г.О., Шевчук Т.А. Синтез біологічно активних гіберелінів ГК4 і ГК7 мікроорганізмами. <i>Mikrobiol. Z.</i> 2019; 81(2): 90-109. doi: https://doi.org/10.15407/microbiolj81.02.090 . Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Машенко О.Ю. Пути підвищення біоконверсії технічного гліцерина в поверхностно-активні речовини <i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB Ac-5017, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241, <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B 7405. <i>Мікробіол. журн.</i> , 2015, 77(1): 8-14.

1	2	3	4	5	6	7	8
<i>P.aeruginosa</i> Prh1AB	Технічний гліцерин – 60 ; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,80; NaCl–0,50; KCl–0,5; NaNO ₃ – 3,5; KH ₂ PO ₄ – 3,4; K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O – 4,0; CaCl ₂ – 0,05;	120	2.87	-*	Культивування в колбах Ерленмайера об'ємом 250 мл (120 мл середовища), на качалці (200 об/хв) при 37°C, рН 6,8.	Культуральну рідину центрифугували при 10 000 об/хв, 10 хв, ПАР екстрагують сумішшю хлороформ: метанол (2:1).	Feng Z., Hao J.,Huichun S., Chang L. Siqin H., Ying Z. Production of rhamnolipids with different proportions of mono-rhamnolipids using crude glycerol and a comparison of their application potential for oil recovery from oily sludge. <i>J. RSC Adv.</i> , 2019, 9: 2885-2891. DOI: 10.1039/C8RA09351B.
<i>P.aeruginosa</i> LBI 2A1	Технічний гліцерин – 50 ; NaNO ₃ –15 ; MgSO ₄ ·7H ₂ O–0,5; KCl –1; K ₂ HPO ₄ – 0,3; Розчин мікроел. (0,1%): C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O – 2,0; FeCl ₃ · 6H ₂ O – 0,28; ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,87; CoCl ₂ · 6H ₂ O – 1,2; CuSO ₄ · 5H ₂ O1 – 1,2; MnSO ₄ · H ₂ O – 0,8;	120	2,55	-*	Культивування в колбах Ерленмайера об'ємом 1 л (300 мл середовища), на качалці (200 об/хв) при 37°C.	Культуральну рідину центрифугували при 10 000 об/хв, 10 хв, при температурі 4 °С, ПАР екстрагують етилацетатом 1: 2.	Salazar-Bryama A.M., Lovagliob R.B, Contiero J. Biodiesel byproduct bioconversion to rhamnolipids: Upstream aspects. <i>J. Heliyon</i> , 2017, 3(6): e00337.. doi:10.1016/j.heliyon.2017.e00337.

Закінчення табл. 4.1

1	2	3	4	5	6	7	8
<i>P.azotoformans</i> AJ15	Декстроза – 15; MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,5; NaNO ₃ – 2.5; KH ₂ PO ₄ – 1.0; FeSO ₄ · 7H ₂ O – 0.01; KCl – 0.1; Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O – 5.67; CaCl ₂ – 0.1; NH ₄ NO ₃ – 0.39; MnSO ₄ · H ₂ O – 0.002; Триптофан – 0,005;	72	1	16.3 ± 0.8 ** (індол-3-оцтова кислота)	Культивування в колбах (500 мл середовища), при 30 °С.	Культуральну рідину центрифугували при 11 963 об/хв 20 хв., при температурі 4 ° С, ПАР екстрагують діетиловим етером 1:1.	Das A.J., Kumar R. Bioremediation of petroleum contaminated soil to combat toxicity on <i>Withania somnifera</i> through seed priming with biosurfactant producing plant growth promoting rhizobacteria. <i>J. Environ. Manage.</i> 2016, 174(1):79-86. doi:10.1016/j.jenvman.2016.01.031. Das A.J., Kumar R. Utilization of Agro-industrial Waste for Biosurfactant Production under Submerged Fermentation and its Application in Oil Recovery from Sand Matrix. <i>Bioresour. Technol.</i> 2018. 260: 233-240. doi:10.1016/j.biortech.2018.03.093.

Примітки -* продуцент не синтезує фітогормони; ** – в середовище вносили триптофан, у концентрації 500 мкг/мл.

Порівняння технологічного процесу, наведеного в табл. 4.1, є недостатнім. Саме тому, надалі вибір ефективного продуцента буде враховувати також вартість поживного середовища, що дозволить обрати найбільш рентабельне виробництво препаратів із комплексом біологічно-активних речовин. Вартість поживних середовищ порівнюваних штамів наведено у табл. 4.2.

Для культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 кількість гліцерину представлена у вигляді об'ємної частки (2%): в 1 л поживного середовища міститься 20 мл технічного гліцерину, вартість якого за 1 кг – 3,5 грн, $m = \rho \times V = 1,261 \text{ г/см}^3 \times 20 \text{ см}^3 = 25,22 \text{ г}$. Тоді $3,5 \times 0,02522 = 0,09 \text{ грн}$.

Таблиця 4.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *P.azotoformans* АJ15

Продуцент	Компонент ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (1 грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9)*
<i>A. calcoaceticus</i> ІМВ В-7241	Гліцерин технічний, 25,22	3,5	0,09	1
	(NH ₂) ₂ CO–0,35;	10,20	0,00357	2
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,1;	8,70	0,00087	2
	NaCl–1,0;	6,6	0,0066	3
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O –0,6;	43	0,0258	3
	KH ₂ PO ₄ – 0,14;	52,50	0,007	2
	дріжджовий автолізат – 0,25	783	0,195	4
	Розчин мікроелементів – 0,1%(г/100 мл):			
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,011;	28,80	0,0003	2
	MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,006;	27,60	0,00016	2
	FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,001;	4,80	0,0000048	2
	CuSO ₄ ·5H ₂ O– 0,00004;	72	0,0000028	2
	CoSO ₄ ·7H ₂ O – 0,0003;	780	0,00023	2
	H ₃ BO ₃ – 0,00006;	27,30	0,0000016	3

	КІ – 0,000001;	840	0,00000084	3
	ЕДТА (трилон Б) – 0,005.	80	0,0004	3
Вартість 1 л ПС = 0,69 грн				
<i>P.azotoformans</i> AJ15	Декстроза – 15;	24	0,36	3
	MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,5;	8,70	0,004	2
	NaNO ₃ – 2,5;	19,20	0,048	2
	KH ₂ PO ₄ – 1,0;	52,50	0,05	2
	FeSO ₄ · 7H ₂ O – 0,01;	4,80	0,048	2
	KCl – 0,1;	14,40	1,44	2
	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O – 5,67;	43	0,24	3
	CaCl ₂ – 0,1;	15	0,0015	2
	NH ₄ NO ₃ – 0,39;	9,90	0,0038	2
	MnSO ₄ · H ₂ O – 0,002;	27,60	0,000055	2
	Триптофан – 0,005;	135	0,00067	4
	Вартість 1 л ПС = 2,18 грн.			

Примітка. * – ціни наведено станом на травень 2020 року. 1. <https://zaporozhskij-biotoplivnyj-zavod.uaprom.net/> ; 2. <https://www.systopt.com.ua> ; 3. <https://prom.ua/>; 4. <https://russian.alibaba.com/>;

Дані, наведені у табл. 4.2, показують, що середовище для культивування *A. calcoaceticus* IMB В-7241 є більш рентабельним, тому що вартість середовища для його культивування у 3 рази дешевше, ніж для *P.azotoformans* AJ15. Надалі, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент, слід розрахувати умовну вартість 1 г ПАР (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Умовна вартість 1 г поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB В-7241 та *P.azotoformans* AJ15

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація ПАР, г/л	Умовна вартість 1 г ПАР, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утворених ПАР за 1 год, г/год
<i>A. calcoaceticus</i> IMB В-7241	0,69	5,6	0,12	168	0,03
<i>P.azotoformans</i> AJ15	2,18	1	2,18	72	0,013

Так, із даних, наведених у табл. 4.3, видно, що культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 як біологічного агента є ефективнішим та дешевшим, умовна вартість 1 г ПАР становить всього 0,12 грн, проти умовної вартості ПАР *P. azotoformans* AJ15 – 2,18 грн. Крім того, завдяки здатності до синтезу різних класів фітогормонів, використання як продуцента *A. calcoaceticus* IMB B-7241 дозволить отримати в одному процесі комплексний мікробний препарат з різноманітними біологічними властивостями. А саме, може бути використаний в медицині та промисловості (за рахунок антиадгезивних властивостей ПАР при використанні на абіогенних та біогенних поверхнях), для очищення довкілля від ксентобіотиків, а також в сільському господарстві як для боротьби з фітопатогенною мікробіотою завдяки антимікробній дії, так і з метою стимуляції росту сільськогосподарських культур.

4.2. Техніко-економічне обґрунтування

4.2.1. Потреба у цільовому продукті

Комплексний мікробний препарат на основі *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, якому притаманні антимікробні властивості і який виявляє стимулюючу дію на ріст рослин [5,6,119,120].

Штам можна використовувати при вирощуванні різноманітних культур, об'єктом дослідження став перець солодкий, вирощування якого є досить перспективним в Україні. Адже, відповідно до основних положень галузевої комплексної програми «Малопоширені овочеві культури – 2025» передбачається нарощування обсягів виробництва малопоширених видів овочевих рослин на період до 2025 р. до 3 млн. т на рік та підвищення норми споживання до 28 кг на одну людину. Науково-виробничий потенціал України у цьому аспекті досить значний, адже за оцінками фахівців аграрного ринку обсяг овочевого сегменту навіть перевищує зерновий. На даний час змінюються загальні стандарти, зокрема структура продовольчого кошика. Дослідження соціологів і дієтологів доводять, що у структурі харчування зменшується частка

споживання хліба, картоплі та цукру, натомість в раціоні збільшується кількість овочів [131].

Тому з кожним роком все більше збільшується площа відведена для овочевих культур. Зокрема, згідно статистичних даних Державної служби статистики України, у 2018 році загальна площі, відведені під вирощування перцю солодкого становили 15,2 тисячі гектарів. Найбільші виробничі посівні площі солодкого перцю зосереджені південніше лінії Чернівці – Знам'янка – Ізюм. Найвищі середні урожаї культури спостерігаються в Одеській, Миколаївській, Херсонській, Запорізькій, Донецькій областях та в АР Крим і становлять 200 – 260 ц/га. На родючих землях заплав річок урожаї на окремих полях досягають до 600 ц/га. В Книзі рекордів України зафіксовано рекорд, адже на Херсонщині у 2018 р. фермерськими господарствами "Панарін-Агро" та "Лідер-Агрі", було засаджено найбільшу площу вирощування солодкого перцю, а саме 79 гектарів [132,133,134].

Однією із перепон до динамічного розвитку ринку овочів в Україні є відсутність високоякісної продукції. Саме якість продукції – основний фактор, яким керується споживач під час вибору будь-якого товару. Однак лише висока якість не зможе забезпечити повного успіху товару на ринку, треба враховувати й інші фактори – господарські, функціональні, органолептичні та економічні показники [135].

Солодкий перець дуже схильний до враження різноманітними мікроорганізмами, захворювання плодів перцю можуть викликати як бактерії, так і грибки, а інфікування може бути як первинним, так й вторинним [136].

Серед найпоширеніших на території України є такі фітопатогени перцю солодкого *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas viridiflava* [137].

Erwinia carotovora – найнебезпечніший бактеріальний патоген плодів солодкого перцю, що викликає хворобу під назвою «м'яка бактеріальна гниль». Інвазія починається з плодоніжки або чашечки, але може виникнути й унаслідок механічних подразнень на поверхні овочу. Тканини біля місця

інфікування пом'якшуються та втрачають тургор, а плід перетворюється на водянисту масу. Це захворювання в першу чергу вражає плоди в період дозрівання, але й може інфікувати їх до збору врожаю [136].

Бактерія *Xanthomonas campestris* викликає плямистість плодів паприки. Цей мікроорганізм однаково може вражати листя, плоди й стебла перцю. На плодах хвороба проявляється у вигляді зон некрозу з коричневим центром, інколи має вигляд бородавки [136].

Також на плодах паприки можуть розвиватися неспецифічні первинні й вторинні бактеріальні інфекції, викликані бактеріями роду *Bacillus*, *Clavibacter* *Pseudomonas*. Ці мікроорганізми не тільки причиняють бактеріальне в'янення плодів, а й є типовими шкідливими патогенами для людей і тварин, можуть завдати потенційної шкоди здоров'ю споживачів. Кількість видів патогенних грибів, що найчастіше інфікують плоди перцю є дещо більшою. До них належать гриби родів *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Additionally*, *Geotrichum*, *Phytophthora* та інші., але не всі види патогенів є специфічними для нашої країни. Антракноз плодів солодкого перцю, викликаний окремими представниками роду *Colletotrichum* (особливо *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum acutatum* й *Colletotrichum coccodes*) [136].

4.2.1.1. Хімічні препарати для обробки томатів на ринку України

Однією з причин несвоєчасного виявлення бактеріозів є схожість симптоматики цих хвороб з нестачею поживних елементів. Для боротьби з бактеріозами сільськогосподарських культур використовують агротехнічні, фізико-механічні і хімічні методи. Останні, хоча й ефективні, проте негативно впливають на довкілля і спричиняють виникнення резистентних форм бактерій. Розповсюдженню бактеріальних хвороб сільськогосподарських культур певною мірою сприяє застосування фунгіцидів і пестицидів (протруйників, інсектофунгіцидів, гербіцидів), які не діють на фітопатогенні бактерії та є екологічно небезпечними [138].

На ринку України найбільш поширеними пестицидами є речовини синтетичного походження, це зумовлено насамперед їх доступною ціною. Також, на ринку представлені біопрепарати, до складу яких входять живі мікроорганізми або продукти їх життєдіяльності. Враховуючи щорічні втрати врожаю в Україні через бактеріози, а також необхідність використання недорогих та екологічно безпечних препаратів, які будуть ефективними щодо фітопатогенних бактерій, актуальною є розробка нових методів біологічного контролю бактеріозів сільськогосподарських культур [138].

У табл. 1.1 наведено найпоширеніші препарати на ринку України, призначені для обробки перців.

Таблиця 4.4

Препарати для обробки перцю солодкого

Препарат	Діюча антимікробна речовина	К-ть в 1 упаковці кг (л)	Вміст діючих речовин	Ціна 1 упаковки, грн	Спектр в-ння (рослини)	Збудники	К-ть препарату для обробки 1 га кг(л)/га	Вартість обробки 1 га, грн	К-ть обробок на рік	Джерело
Оксихом	міді хлорокись, оксадиксил	0,04 кг	670 г/кг 130 г/кг	7,5	Овочі, фрукти	<i>Phytophthora</i> , <i>Alternaria</i>	2	750	3	1,2
Ридоміл Голд МЦ 68 WG в.г.	Мефенокса,манкоцеб	5 кг	16 г/кг, 26 г/кг	2 800	Картопля, овочі, виноград	<i>Plasmopara halstedii</i> <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Gloeosporium</i> , <i>Cladosporium</i>	2,5	2 800	4	3,4
Превікур Енерджі	пропамокарб гідрохлорид, фосетил алюмінію	1 л	530 г/л, 310 г/л	777	Овочеві та баштанні культури	<i>Pythium sp.</i> , <i>Pseudoperonospora sp.</i> <i>Peronospora sp.</i> <i>Phytophthora capsici</i>	2	3 108	2	5,6
Фітолавін	стрептотрицин	1 л	32 г/л	723	Для всіх видів культур (крім огірків)	<i>Erwinia carotovora</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Xantomonas campestris</i>	2	2 892	2	7

Ціни наведені за даними сайту станом на 9.09.2020 : 1-http://s-ah.ru/protection-of-plants/fungicides/oksihom_sp/; 2 - https://prom.ua/search?search_term=оксихом; 3 - <https://www.syngenta.ua/product/crop-protection/ridomil-gold-mz-68-wg-v-g>; 4 - <https://prom.ua/p588770095-fungitsid-ridomil-gold.html>; 5 - <https://www.cropsscience.bayer.ua/uk-UA/Products/Fungicides/Previcur-N.aspx>; 6-<https://prom.ua/p1106811604-fungitsid-previkur-enerdzhi;wholesale.html>; 7 - <https://prom.ua/p1039430878-biofungitsid-bakteritsid-fitolavin.html>;

На теперішній час у сільському господарстві основна увага приділяється біологічним методам захисту рослин, оскільки застосування біопрепаратів має низку переваг перед хімічними засобами захисту рослин, а саме:

- високу біологічну активність стосовно патогенних мікроорганізмів; загибель шкідливих мікроорганізмів у наступних поколіннях;
- вибірковість, безпечність для ентомофагів та комах-запилювачів; безпечність для теплокровних тварин і людини;
- відсутність фітотоксичності та впливу на смакові якості продукції;
- малий термін очікування дії препарату;
- можливість застосування в різні фази вегетації рослин та уникнення ризику нагромадження токсичних ефектів [139].

Упродовж останніх 20 років в Україні використовують різноманітні за біологічною дією препарати. Проте засобів для боротьби саме з бактеріозами сільськогосподарських рослин є не так багато: одним із таких препаратів є Фітолавін, який діє на збудників бактеріозу *E.carotovora*, *P.syringae* pv. *syringae*, *C. michiganensis*, *R. solanacearum*, *A. tumefaciens*, *X. campestris*, *P. syringae* pv. *atofaciens*. Препарат розроблений на основі культуральної рідини *S.griseus* 420, який є продуцентом стрептотрицинових антибіотиків [139].

Erwinia carotovora, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xantomonas. campestris*, *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens*.

Однак, неконтрольоване використання антибіотиків, у тому числі й препарату Фітолавін, у сільському господарстві призводить до виникнення резистентних форм мікроорганізмів. В свою чергу механізм антимікробної активності поверхневоактивних речовин, на відміну від антибіотиків,

унеможливиює виникнення стійких до них бактерій за рахунок руйнування клітинної стінки та плазматичної мембрани [139].

Саме тому біопрепарат на основі *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 є оптимальною альтернативою стрептотрицинам Фітолавіну.

4.3. Розрахунок річної потреби в комплексному мікробному препараті

Опираючись на інформацію Держстату в 2018 році для вирощування перцю солодкого загалом було відведено 15,2 тисяч гектарів земельних угідь. Однак врожайність даної культури варіюється з року в рік. Урожай перців в 2018 р. становив 113,4 ц/га, в минулі роки урожайність була дещо кращою: 2015 р. – 113,8 ц/га та у 2017 р. – 125,8 ц/га, причиною чого могли бути бактеріози [132].

Біопрепаратом на основі ІМВ В-7241 не можлива обробка всієї площі засаджень, оскільки на ринку існує безліч препаратів, які можна використовувати для обробки перцю солодкого. Тому припустимо, що комплексним мікробним препаратом буде оброблено 79 га об'єднаних земель фермерських господарств "Панарін-Агро" та "Лідер-Агрі" [134].

4.4. Методика обробки перців мікробним препаратом

Вивчення якісного складу синтезованих ауксинів штаму ІМВ-7241 показало, що 80% фітогормонального комплексу припадає на індол-3-оцтову кислоту (гетероауксин), а в слідових кількостях були виявлені інші фітогормони ауксинової природи. З літератури відомо, що найбільша біологічна активність (стимулюючий ефект) гетероауксину спостерігається в концентраціях близько 10^{-4} - 10^{-9} моль/л, що є доказом теорії «парадоксального ефекту» над малих доз [3,140,141].

Визначимо ефективну концентрацію ауксинів, проводячи приблизний розрахунок за індол-3-оцтовою кислотою, якщо її молекулярна маса становить 175 г/моль:

$$175 \times 10^{-7} = 0,0000175 \text{ г/л}$$

Тобто концентрація ауксинів в робочому розчині має становити 16-17 мкг/л.

Встановлено, що за використання технічного гліцерину як джерела вуглецю, при культивуванні *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та внесення 300 мг триптофану в кінці експоненційної фази, штам здатен утворювати 4850,98 мкг/л ауксинів, рекомендується розведення у 300-400 разів.

Якщо культуральну рідину розвести у 300 разів, концентрація ауксинів буде становити:

$$\frac{0,004851}{3} \times 10^{-2} = 0,0000162 \text{ г або } 16 \text{ мкг}$$

З метою стимуляції росту рослин кореневу систему перців замочують в робочому розчині з концентрацією і витримують протягом 2 годин. Після цього молоді рослини можна переносити в ґрунт для посадки .

Для захисту перцю солодкого від бактеріозів, рослини оброблюють робочим розчином з концентрацією ПАР 0,1 г/л шляхом розпилення його на рослини. Обробку рекомендовано проводити двічі на рік, з появою перших листків і під час вегетаційного росту [138].

4.5. Розрахунок річної потреби робочого розчину мікробного препарату

Для обробки перців задля захисту від фітопатогенів і стимуляції росту рослин культуральну рідину розводять у різних співвідношеннях, саме тому готують два окремих розчини.

Розчин для захисту від фітопатогенів. Експериментально встановлено, що для обробки одиниці розсади потрібно 10 мл робочого розчину. Дізнаємось необхідний об'єм робочого розчину на 1 га, із стандартною густотою посадки 50 000 од/га [142]:

$$\frac{0,01 \times 50\,000}{1} = 500 \text{ л}$$

Згідно з інструкцією використання біопрепарату Фітолавін, пропонується двократна обробка (обприскування на початку і в кінці вегетаційного росту),

аналогічним чином можливе використання комплексного мікробного препарату *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 [138].

Кількість робочого розчину при дворазовій обробці:

$$500 \times 2 = 1000 \text{ л}$$

Тоді для обробки 79 га потрібно розчину:

$$79 \times 1000 = 79\,000 \text{ л}$$

Для стимуляції росту: З експериментальних даних відомо, що на обробку одиниці розсади потрібно 30 мл робочого розчину. Тобто, на 1 га, з приблизною густиною посадки рослин 50 000 од/га, потрібно робочого розчину:

$$\frac{50\,000 \times 0,03}{1} = 1\,500 \text{ л}$$

А на 79 га потрібно розчину:

$$1\,500 \times 79 = 118\,500 \text{ л}$$

У табл. 4.5. представлена річна потреба у робочому розчині мікробного препарату *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Таблиця 4.5.

Розрахунок річної потреби у робочому розчині *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

Мета обробки	Кількість робочого р-ну на 1 га, л	Концентрація робочого р-ну, г/л	Кількість обробок на рік	Потреба робочого розчину, л
Захист від фітопатогенів	1000	0,1 (поверхнево-активні речовини)	2	79 000
Стимуляція росту	1500	0,0000162 (ауксини)	1	118 500

Примітка. Розрахунок річної потреби робочого розчину на 79 га землі.

4.6. Розрахунок кількості культуральної рідини для обробки перців

Для антимікробної обробки

Потрібно 79 000 л робочого розчину культуральної рідини. Концентрація ПАР у робочому розчині становить 0,1 г/л (Див. табл. 4.5) [120].

Тому визначимо кількість ПАР, яка необхідна для приготування 79 000 л робочого розчину:

$$79\,000 \times 0,1 = 7\,900 \text{ г}$$

A. calcoaceticus ІМВ В-7241 на технічному гліцерині утворює до 5,6 г/л поверхнево-активних речовин [143], тому об'єм культуральної рідини для отримання 7 900 г ПАР буде:

5,6 кг ПАР міститься в 1 м³ культуральної рідини

7,9 кг ПАР – в X м³ культуральної рідини

$$X = \frac{7\,900 \times 1}{5,6} = 1\,411 \text{ л}$$

Отже, для того, щоб обробити 79 га земель потрібно отримати 1 411 л культуральної рідини *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (для захисту від фітопатогенів).

Розрахунок об'єму КР з метою стимуляції росту перців

Визначаємо, скільки ауксинів міститься у 118500 л робочого розчину, в якому концентрація ауксинів становить 16,2 мкг/мл:

$$118500 \times 16,2 = 1919700 \text{ мкг ауксинів.}$$

Далі розраховуємо, в якій кількості культуральної рідини міститься така кількість ауксинів.

Отже, 4850,98 мкг ауксинів міститься в 1 л культуральної рідини, дізнаємось в якому об'ємі культуральної рідини міститься 1919700 мкг ауксинів:

$$X = (1919700 \times 1) / 4850,98 = 396 \text{ л}$$

Для обробки коренів саджанців (для засаджень на площі 79 га), потрібно одержати 396 л культуральної рідини.

Сумарний об'єм культуральної рідини, що необхідна для обробки перцю солодкого:

$$V_{\text{кр0}} = V_{\text{кр1}} + V_{\text{кр2}} = 1411 + 396 = 1\,806 \text{ л}$$

де $V_{\text{кр1}}$ - об'єм культуральної рідини, для приготування робочого розчину з антимікробними властивостями, л;

$V_{кр2}$ - об'єм культуральної рідини, потрібної для приготування робочого розчину зі стимулюючими ріст властивостями;

Якщо сумарні втрати цільового продукту при виробництві - 20 %, то загальна кількість культуральної рідини становить:

$$V_{кр} = \frac{1\ 806}{1 - 0,2} = 2\ 257,5 \approx 2258 \text{ л}$$

4.7. Розрахунок потужності виробництва комплексного мікробного препарату *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

Прийmemo, що для отримання потрібного об'єму культуральної рідини, кількість робочих днів ($T_{рд}$) 30, а кількість продукту на добу ($V_{д}$):

$$V_{д} = \frac{V_{кр}}{T_{рд}} = \frac{2258}{30} = 75 \text{ л}$$

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

$$V_{крц} = \frac{K1 \times V_{д} \times T_{цф}}{24} = \frac{1,1 \times 75 \times 103}{24} = 354 \text{ л або } 0,354 \text{ м}^3,$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, остигання ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год, вивантаження -1 год, тривалість процесу – 9 год), $K1$ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Геометричний об'єм ферментера для одержання 354 л культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення $K_{зап}$ 0,7, має становити:

$$V_{г} = \frac{V_{крц}}{K_{зап}} = \frac{0,354}{0,6} = 506 \text{ л або } 0,506 \text{ м}^3$$

Обираємо ферментер з геометричним об'ємом 0,63 м³.

4.8. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу комплексного мікробного препарату на основі *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

За виробничий цикл отримують $V_{крц}=0,354 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

При отриманні культуральної рідини варто врахувати її втрати у вигляді краплини через колектор відпрацьованого повітря, що становить приблизно 20%.

Отже, з урахуванням втрат, кількість культуральної рідини становитиме:

$$V_{\text{роб1}} = \frac{V_{\text{крц}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{0,354}{1 - 0,2} = 0,443 \text{ м}^3$$

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

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб1}} = 0,443 \text{ м}^3$.

Можливий геометричний об'єм, при вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,7$, буде $V_{\phi1} = 0,443/0,7 = 0,63 \text{ м}^3$.

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 0,63 \text{ м}^3$.

Уточнюємо, прийнятий раніше, коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап1}} = \frac{V_{\text{роб1}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{0,443}{0,63} = 0,7$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває в обраних раніше межах.

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

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб1}}}{1 + X_{\phi}} = \frac{0,443}{1 + 0,1} \approx 0,4 \text{ м}^3,$$

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

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 0,443 - 0,4 = 0,043 \text{ м}^3 \text{ або } 43 \text{ л}$$

4.8.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування в інокуляторі об'ємом 100 л

Беручи до уваги те, що втрати при краплиносі (20%), кількість культуральної рідини буде:

$$V_{\text{роб}2} = \frac{V_{\text{пм}1}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{43}{1 - 0,2} \approx 53,75 \text{ л},$$

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

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс}2} = V_{\text{роб}2} / (1 + X_{\text{па}}) = 53,75 / (1 + 0,1) = 49 \text{ л},$$

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

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{\text{пм}2} = V_{\text{роб}2} - V_{\text{пс}2} = 53,75 - 49 = 4,75 \text{ л або } 0,00475 \text{ м}^3.$$

Можливий геометричний об'єм $V_{\text{ін}1} = 53,75 / 0,7 = 76,7$ або 77 л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}1} = 100$ л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}2} = \frac{V_{\text{роб}2}}{V_{\text{ін}1}} = \frac{54}{100} = 0,54$$

4.8.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування в інокуляторі об'ємом 10 л

Беручи до уваги втрати (20%), кількість культуральної рідини буде:

$$V_{\text{роб}3} = \frac{V_{\text{пм}2}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{4,75}{1 - 0,2} \approx 5,93 \text{ л},$$

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

Кількість посівного матеріалу (доза) для інокулятора -10 % від об'єму поживного середовища. Кількість поживного середовища становитиме:

$$V_{\text{пс}4} = V_{\text{роб}4} / (1 + X_{\text{ін}}) = 5,9 / (1 + 0,1) = 5,39 \text{ л},$$

де $X_{\text{ін}} = 0,10$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу : $V_{\text{пм}4} = V_{\text{роб}4} - V_{\text{пс}4} = 5,93 - 5,39 = 0,54 \text{ л}.$

Можливий геометричний об'єм $V_{\text{ін}2} = 6 / 0,7 = 8,57$ л. Приймаємо стандартний інокулятор $V_{\text{сін}1} = 10$ л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{запз}} = \frac{V_{\text{робз}}}{V_{\text{ін2}}} = \frac{6}{10} = 0,6$$

Коефіцієнт заповнення - у обраних межах.

4.8.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Для отримання 0,54 л посівного матеріалу використовують качалочні колби (750 мл) і коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Кількість колб становить:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пмз}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{540}{750 \times 0,2} = 3,6 \text{ приймаємо } 4 \text{ шт.}$$

Тобто, для одержання 540 мл посівного матеріалу необхідно 4 качалочні колби.

Отже, для отримання комплексного мікробного препарату *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 необхіден ферментер для процесу біосинтезу об'ємом 0,63 м³, інокулятори для посівного матеріалу об'ємом 100 л та 10 л та 4 качалочних колби.

4.9. Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва

4.9.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 проводиться за температури 30°C, рН 6,8-7,0, на качалках, виходячи з цього стає зрозумілим, що даний мікроорганізм є мезофільним нейтрофілом, а також аеробом. Ці умови є оптимальними для розвитку інших мікроорганізмів, які можуть становити контамінуючу мікробіоту. Саме тому культивування штаму ІМВ В-7241 має проводитись в стерильних умовах.

Оскільки *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 є облігатним аеробом, тому процес ферментації проходить за безперервної подачі стерильного повітря через барботер.

Штам ІМВ В-7241 синтезує комплекс вторинних метаболітів (ПАР, фітогормони), які накопичуються в культуральній рідині в стаціонарній фазі

росту культури. Таким чином культивування слід здійснювати періодично глибинним методом, для подальшого виділення метаболітів.

Штам ІМВ В-7241 є облигатним аеробом, для життєдіяльності якого необхідна інтенсивна аерація середовища упродовж всього процесу культивування. Оскільки культивування проводиться глибинним способом, а мікроорганізми здатні використовувати лише розчинений кисень (швидкість розчинення кисню підвищується зі збільшенням поверхні розділення між газовою та рідкою фазами), в'язкість середовища не збільшується, тому нами було обрано ферментер з барботером, а з метою інтенсифікації масообмінних процесів – турбінну мішалку закритого типу із швидкістю перемішування 100-400 об/хв [144,145].

4.9.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

A. calcoaceticus ІМВ В-7241 є облигатним аеробом, тому процес ферментації проходить за безперервної подачі стерильного повітря через барботер. Тому однією із найважливіших задач є одержання великої кількості стерильного аераційного повітря. Підготовку посівного матеріалу та інокуляту здійснюють в приміщенні лабораторії та мікробіологічному боксі, тож повітря стерилізують застосовуючи ультрафіолетове опромінення (УФ-лампи).

Підготовку аераційного повітря ферментерів здійснюють наступним чином:

- атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту, на висоті 2-3 м від найвищої точки будівлі, тобто на висоті 10 м (висота ферментра - 2,58 м, висота поверху 6 м, разом із косим дахом будівлі – 8 м);
- повітря попадає в фільтри попереднього очищення, де воно звільняється від грубого аерозолу – пилу, такі фільтри захищають компресори від забруднення і знижують кількість контамінантів;
- далі стискають повітря у турбокомпресорі до 0,35–0,5 Мпа (стиснення повітря в компресорі приводить до підвищення його

температури до 120–250°C і збільшенню вологовмісту на одиницю об'єму);

- для випадання вологи в каплевловлювачі, повітря охолоджують за допомогою водяного теплообмінного апарату; видалення конденсованої вологи у ресивері;
- очищення на головних фільтрах (де очищають повітря для усіх ферментаторів цеху, видаляється 98% мікроорганізмів);
- очищення повітря на індивідуальних фільтрах, повітря надходить через колектори від головних фільтрів (встановлені безпосередньо на кожному ферментері, затримують 99,999% мікроорганізмів) [145].

4.9.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів для виробничого біосинтезу комплексного мікробного препарату на основі *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

Процес культивування штаму потрібно проводити в асептичних умовах з метою запобігання контамінації та усунення ризиків отримання неякісного кінцевого продукту, а також матеріальних втрат.

З цією метою проводять генеральне прибирання перед початком виробничого процесу, перед кожним циклом виробництва та після останнього, також миття та стерилізацію обладнання, комунікацій.

Виробництво препарату включає такі приміщення: лабораторія, качалочна кімната, цех підготовки поживного середовища, вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу.

- Розрахунок загальної площі миття та дезінфекції проводять з врахуванням того, що отримання вторинних метаболітів штаму ІМВ В-7241 здійснюється протягом 30 робочих днів:
- підлогу миють кожного робочого дня (30 разів)
- апарати та комунікації перед кожним виробничим циклом та після останнього (всього – 7 циклів, разом 8 разів);
- стіни миють при генеральному прибиранні (перед початком виробництва) – 1 раз.

4.9.4.Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючий засобів для виробництва комплексного мікробного препарату

При виборі миючих та дезінфікуючий засіб, слід врахувати його вартість та витрати при обробці певних площ виробництва. Згідно рекомендацій МОЗ України відомо, що на 1 м² поверхні, яка піддається очищенню, використовують близько 100 мл робочого розчину. [147].

Задля уникнення утворення резистентних форм мікроорганізмів засоби слід змінювати раз в 3 місяці. Виробництво одержання комплексного препарату триває всього 30 днів, отже можна підібрати 1 миючий засіб та дезінфікуючий засіб. Вартість мийних та дезінфікуючих розчинів наведена в табл. 4.6.

Об'єм робочих розчинів для миття приблизно складає 50% від загального об'єму (за один цикл на миття ферментеру, інокуляторів, ректорів-змішувачів і збірника):

$$1,400 \times 0,5 = 0,7 \text{ м}^3$$

Об'єм робочого розчину для миття та дезінфекції:

$$0,7 \times 8 = 5,6 \text{ м}^3$$

Загальна площа миття підлоги, стін, вікон та дверей становить близько 3 000 м².

Як варіанти можливих миючих засобів були обрані:

1. *«Каустична сода» або натр їдкий.*

Це безбарвна, без запаху, гігроскопічна, кристалічна речовина, що добре адсорбує вологу з повітря і розчиняється у воді з виділенням великої кількості тепла. Використовується для миття забруднених поверхонь біотехнологічного устаткування. За ступенем впливу на організм людини відноситься до речовин 2-го класу небезпеки, може викликати опіки шкіри, а при тривалому впливі може викликати виразки та екземи. Не схильна до самозаймання, горіння не підтримує, але ємності можуть вибухати при

нагріванні. У великих концентраціях та в чистому вигляді він розм'якшує епідерміс та ін. та викликає некроз органічних тканин. Тому при роботі, персоналу потрібно дотримуватися всіх правил безпеки. У вигляді 2-3% гарячого (70°C) розчину володіє антимікробною дією вісно бактерій і вірусів. При поєднанні з 5-10% - м хлоридом натрію дезінфікуючий вплив підвищується. Гранульований їдкий натр упаковують у клапанні поліетиленові двошарові мішки, в клапанні мішки, вологозахисні, закриті, з тканинним ламінатом. За узгодженням зі замовником, можна використовувати сталеві барабани [148].

2. «ЕКЛІН-Софт».

Це рідкий лужний пінний або малопінний (на вимогу покупців) миючий засіб, призначений для очищення різноманітних поверхонь від жирових, білкових, вуглеводних та інших органічних забруднень.

Зовнішній вигляд: у вигляді прозорої рідини від світло-жовтого до коричневого кольору, без вираженого запаху або з помірним запахом компонентів, що входять до складу. Допускається випадання незначного осаду. Має м'який лужний компонент, тому може бути використаний на більшості поверхонь, які руйнуються або пошкоджуються сильним лугом. Рекомендований для механізованої, пінної мийки, а також мийки ручними методами. Рекомендовано для використання в процесі очищення і знежирення, у тому числі поверхонь з алюмінію та інших металів та сплавів:

- поверхонь (підлоги, стіни, меблі, і т.д.);

- виробничого та лабораторного обладнання з нержавіючої сталі, алюмінію, поліетилену, скла, органічного скла;

- ємнісного та неємнісного устаткування (зовнішні та внутрішні поверхні танків, ємностей, трубопроводів, транспортерних стрічок, ліній розливу і упакування).

Рідкий концентрований лужний засіб, є стабільним у водних розчинах і на повітрі, негорючий і повністю розпадається у зовнішньому середовищі.

Для приготування робочих розчинів використовується вода будь-якої жорсткості, засіб добре розчинний у воді при температурі 20 – 25°C, володіє високою змочуючою, емульгуючою, диспергуючою дією. За робочих концентрацій розчину 0,5 - 1,5 % здійснюють миття устаткування за високого або низького тиску при температурі 18 – 50°C або з витримкою наповнених ємностей протягом 10-15 хв. Працівники повинні пройти навчання, інструктаж з безпечної роботи з дезінфікуючими і миючими засобами і по наданню першої допомоги при випадковому отруєнні. Всі роботи слід проводити в робочому одязі з захистом шкіри рук гумовими рукавичками [149].

Варіанти дезінфекційних засобів:

1. Засіб дезінфекційний «Славін» (допоміжні речовини: полігексаметиленгуанідин гідрохлорид – 4,5% глутаровий альдегід – 2,5%, допоміжні неіоногенні поверхнево-активні речовини).

Рекомендований для застосування на підприємствах парфумерно-косметичної, хіміко-фармацевтичної, мікробіологічної, харчопереробної промисловості, агропромислового комплексу, інші. Норма витрат робочого розчину при обробці поверхонь складає 150 мл/м², санітарно-технічне обладнання - 200 мл/м², при обробці способом орошення за норми витрат - 300 мл/м² (гідропульт, автомакс) або 150 мл/м² (розпилювач типу «Квазар»). Після обробки поверхонь способом орошення після завершення дезінфекційної видержки проводять вологе прибирання. Спектр антимікробної дії: відносно бактерій (включаючи мікобактерії туберкульозу), вірусів (тестовано на вірус поліомієліту), дріжджоподібних грибів роду Кандида, дерматофітів, а також миючими властивостями. «Славін» (концентрат) за параметрами гострої токсичності по ГОСТ 12.1.007-76 належить до 3 класу помірно небезпечних сполук при введенні в шлунок і до 4 класу малонебезпечних - при нанесенні на шкіру; за ступенем летючості (пари) малонебезпечні, надає помірно виражену подразнюючу дію на шкіру та слизові оболонки очей; має слабку сенсibiliзуючу дію.

Робочі розчини не спричиняють місцево-подразнюючої дії при одноразових влучань на шкіру, при використанні способом зрошення викликають подразнення верхніх дихальних шляхів і очей.

Засіб "Славін" призначено для дезінфекції поверхонь в приміщеннях, жорстких меблів, поверхонь апаратів, медичних приладів, санітарно-технічних обладнання, прибирального інвентарю, лабораторного посуду, виробів медичного призначення тощо [150].

2. "Фамідез"

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: гліоксаль – 8,93-10,07, бензалконію хлорид 20,9-23,1 (діючі речовини); ізотридеканолетоксилат - 2,0; 1,2,3-бензотриазол - 0,5 (інгібітор корозії); барвник - до 0,01; вода - до 100,0. 1.4. Прозора рідина жовтого або світло блакитного кольору (колір засобу залежить від кольору використаного барвника). Має помірний специфічний запах поверхнево-активних речовин. Добре розчиняється у воді. Робочі розчини засобу прозорі, мають слабкий запах поверхнево-активних речовин, виявляють мийні властивості, не ушкоджують об'єкти, що виготовлені із металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, добре змиваються з оброблених об'єктів, не залишають нальоту. Призначення засобу: поточна та заключна дезінфекція у лікувальнопрофілактичних закладах та вогнищах кишкових і крапельних інфекцій бактеріальної (включаючи туберкульоз), інфекціях вірусної етіології профілактична дезінфекція у лікувальнопрофілактичних, дитячих та навчальних закладах різних рівнів акредитації, в аптечних закладах, на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної, парфумерно-косметичної та переробної промисловості. Спектр антимікробної дії. "Фамідез" виявляє бактерицидні, туберкулоцидні, віруліцидні (щодо збудників крапельних інфекцій, ротавірусів та інфекцій з парентеральним механізмом передачі збудника – гепатити, СНІД), фунгіцидні (щодо грибів роду *Candida*) Токсичність та безпечність засобу. "Фамідез" за параметрами гострої

токсичності при введенні в шлунок належить до помірно небезпечних речовин (3 клас безпеки відповідно до вимог ГОСТ 12.1.007) та до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру (4 клас безпеки відповідно до вимог ГОСТ 12.1.007). Не виявляє шкірно-подразнювальних властивостей при однократному нанесенні на шкіру білих щурів у дозі 20 мг/см². У нативній формі та концентрованих розчинах подразнює слизову оболонку очей. Поріг подразнювальної дії на слизову оболонку очей встановлений на рівні розчину 5,0 % концентрації. Не виявляє сенсibiliзуючих властивостей.

Поверхні ретельно протирають ганчір'ям, що змочене робочим розчином (норма витрат 100 мл/м² поверхні або до повного зволоження поверхні), або зрошують робочим розчином засобу "Фамідез" (норма витрат 200 мл/м² поверхні) за допомогою дезінфекційного обладнання [151].

Характеристика основних мийних та дезінфікуючих засобів наведена в табл. 4.6.

Узагальнена характеристика основних мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва комплексного мікробного препарату на основі *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Назва мийного/ дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Конц. робочого розчину, %	Приблизна загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн.	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична сода ¹	Обладнання, комунікації, інвентар	2,0	180	92	17,90	0,36	32 940
«ЕКЛІН-Софт» ²	Обладнання, комунікації, інвентар	1,5	180	92	38,4	0,57	52 000
«Славін» ³	Стіни, підлога, вікна, двері	1,0	25 245	2,5	86,4	0,86	2 171
"Фамідез комбі" ⁴	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2	25 245	2,5	460	0,92	2 322

Примітка. Ціни вказані станом на 3.11.2020. 1- <https://prom.ua/p1265346755-kausticheskaya-soda-rasoil.html>; 2 - <https://prom.ua/p1148158687-moyuschee-sredstvo-eklin.html>; ; 3 - <https://prom.ua/p895499-slavin-dezinfektsiya-instrumentov.html?&primelead=M>;; 4 - <https://prom.ua/p691761088-famidez-kombi-new.html>.

Отже, за даними таблиці 4.6 для миття обладнання доцільним буде використання каустичної соди, а для миття та дезінфекції стін, дверей, вікон та підлоги – розчин «Славін». Ці засоби є вигіднішими за відсотковою концентрацією розчину та вартістю одного літру за весь період виробничого біосинтезу (30 днів).

Їдкий натр відповідає основним вимогам до хімічних засобів для миття та дезінфекції:

- доступність, дешевизна, зручність транспортування та зберігання.
- добре розчинення у воді;
- отримання ефекту в невеликих концентраціях;
- короткий час для отримання результату;
- забезпечення знезараження навіть при наявності органічних речовин;
- оптимальна стійкість при зберіганні плюс повільне зниження знезаражувальної дії;
- не надмірна токсичність для людей і тварин;

Слід сказати, що розчин «Славін» має наступні переваги:

- *широкий спектр біоцидної дії*, вже в невеликих концентраціях вони ефективні проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, різних родів грибів, як й інші ПАГи одночасно діють не тільки на аеробну і анаеробну мікрофлору, але і пригнічують віруси;
- *продовгованість*, як й інші ПАГи володіє пролонгованою антимікробною дією, яка зберігається мінімально від кількох місяців, що в нашому випадку є оптимальним, адже біосинтез займає 30 робочих днів.
- *екологічна безпечність*, не містить у своєму складі важких металів, активного хлору і інших небезпечних елементів.
- *водні розчини* стабільні і довго зберігають свої фізико-хімічні властивості і біоцидну активність (не менше року).

4.10. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

A. calcoaceticus ІМВ В-7241 вирощують на рідкому мінеральному поживному середовищі такого складу (г/л) [1,2]:

- Технічний гліцерин – 2%(об'ємна частка)
- $(\text{NH}_2)_2\text{CO}_3$ –0,35;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1;
- NaCl –1,0;
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,6;
- KH_2PO_4 – 0,14;
- дріжджовий автолізат – 0,5%
- Розчин мікроелементів. 0,1% (об'ємна частка)

Розчин мікроелементів, зі складом (г/100 мл):

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,1;
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,6;
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1;
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,004;
- $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –0,03;
- H_3BO_3 – 0,006;
- KI – 0,0001;
- ЕДТА (трилон Б) – 0,5.
- триптофан – 0,3 г/л (для виробничого культивування);

Для спрощення технологічного процесу, основні та фосфорні солі стерилізуються разом для посівних апаратів на 10 л, 100 л, 0,63 м³, тому, для уникнення утворення осаду, рН розчину доводять до значення 4-4,5, розчином соляної кислоти, концентрація якої становить 6%.

Оскільки для вирощування культури рівень рН повинен бути на нейтральному рівні (рН = 7), то перед внесенням посівного матеріалу поживне середовище стабілізують стерильним 6%-вим розчином NaOH . Піногасник

непотрібний, адже в середовищі культивування міститься піногасна речовина – гліцерин, у середовищі немає компонентів, що створюють стійку піну.

Доцільно приготувати 3 запасних розчини мікроелементів об'ємом 100 мл, для трьох стадій вирощування посівного матеріалу, це робиться з метою запобігання контамінації на усіх етапах виробництва. А вже для промислового біосинтезу, солі мікроелементів слід об'єднати з іншими солями і стерилізувати разом (див. табл. 4.7., 4.9).

Технічний гліцерин не стерилізують, адже він крім гліцерину містить багато домішок (метанол, етанол, хлориди натрію або калію, золу, нелеткі органічні речовини, смоли, ПАР, сірчаноокислі сполуки, важкі метали), які є токсичними для більшості мікроорганізмів, також для технічного гліцерину характерна висока відносна густина, що унеможлиблює його споживання більшістю мікроорганізмів [152,153].

Триптофан вноситься у поживне середовище лише на стадії безпосередньо біосинтезу, у робочий ферментер об'ємом 0,63 м³ (див. табл. 4.7.). Задля зменшення ризику контамінації триптофану, слід приготувати розчин з мінімальною кількістю води. З літератури [154] відомо, що розчинність триптофану у воді становить 1,057 г в 100 мл води за температури 20°C, тож можемо розрахувати, у якому об'ємі слід розчинити 120 г триптофану:

$$(120 \times 0,1) / 1,057 = 11 \text{ л.}$$

Таблиця 4.7

Вміст деяких компонентів поживного середовища для культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 і особливості їх приготування

Об'єм поживного середовища, л	Дріжджовий автолізат			Розчин мікроелементів		Триптофан		Технічний гліцерин	
	Вміст $V_{c-ща}$, г	Об'єм 5%-го р-ну	Особливість приготування	Об'єм р-ну в $V_{c-ща}$	Особливості приготування	Вміст, г	Особливості приготування	Об'єм, м л	Особливість приготування
0,54	0,135	2,7 мл	Запасний розчин у колбі на 250 мл	0,54 мл	Запасний розчин	-	-	10	Піпеткою
6	1,5	30 мл		6 мл	Запасний розчин	-	-	108	Колба на 250 мл
49	12,25	245 мл	Композиція Б у колбі на 750 л	49 мл	Запасний розчин	-	-	980	Колба на 1 л
400	100	2 л	Композиція Б у збірнику на 5 л	-	Компоненти композиції А	120	Збірник на 15 л	8 л	Збірник на 10 л

Примітка. — - не розраховують;

$V_{c-ща}$ – вміст в об'ємі поживного середовища (ПС)

Таблиця 4.8

Вміст і підготовка титрувальних агентів

Об'єм середовища, л	HCl (6%)		NaOH	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,54	-	-	-	-
6	12	У колбі на 2 л	12	У колбі на 50 мл
49	98		98	У колбі на 250 мл
400	800		800	У колбі на 1 л

Таблиця 4.9

Вміст компонентів розчину мікроелементів для культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 і особливості їх приготування

Об'єм середовища, л	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	MnSO ₄ · H ₂ O	FeSO ₄ · 7H ₂ O	CuSO ₄ · 5H ₂ O	CoSO ₄ · 7H ₂ O	H ₃ BO ₃	KI	ЕДТА
0,54	5,94 мг	3,24 мг	0,54 мг	21,6 мкг	0,16 мг	32,4 мкг	0,54 мкг	2,7 мг
6	61,67 мг	32,34 мг	6 мг	5,39 мг	1,6 мг	0,32 мг	5,39 мкг	26,95 мг
49	539 мг	294 мг	49 мг	1,96 мг	14,7 мг	2,9 мг	49 мкг	245 мг
400	4,4 г	2,4 г	0,4 г	0,016 г	0,12 г	0,024 г	0,0004 г	2 г

4.10.1. Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування початкового посівного матеріалу необхідно у 4 колбах об'ємом 750 л приготувати 540 мл поживного середовища (ПС), при цьому поживне середовище за рахунок малих об'ємів стерилізується в автоклаві. Залежно від умов стерилізації складових ПС, ділимо його на наступні композиції:

Композиція А: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}_3$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Б: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Дані композиції стерилізують окремо для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію.

Дріжджовий автолізат вносять у поживне середовище в невеликих кількостях, тому його готують у вигляді запасного розчину (режим стерилізації 112 °С, 30 хв). Розчин мікроелементів теж готується як запасний, адже він вносить по 0,1 % від об'єму середовища (умови стерилізації: 131 °С, 40 хв, в автоклаві) (див. табл. 2.1, 2.3).

Технічний гліцерин не потребує попередньої стерилізації і вноситься безпосередньо у колбу.

4.10.2. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

Композиція А: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}_3$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Б: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

На даному етапі вирощування посівного матеріалу, потрібно приготувати 6 л поживного середовища, об'єми не є великими, тому солі знову ж можна простерилізувати у автоклаві.

По закінченню стерилізації в інокулятор подають простерелізовані композиції А та Б, запасні розчини мікроелементів, дріжджового автолізату та технічний гліцерин (див. табл. 2.1, 2.3) і доводять рН до 6,8-7,0 6% стерильним розчином їдкого натру. Після додається посівний матеріал.

4.10.3. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

Об'єм поживного середовища становить 49 л, об'єм є великим, тож стерилізацію можна проводити безпосередньо у посівному апараті.

Композиція А: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}_3$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Б: дріжджовий автолізат (режим стерилізації: 112°С, 30 хв).

Відповідно, на даному етапі фосфорні і основні солі готують в одному збірнику (композиція А) на 63 л і стерилізують в інокуляторі об'ємом 100 л при 131°С і 1,5 атм впродовж 40 хв. Після стерилізації у посівний апарат додають стерилізований дріжджовий автолізат, розчин мікроелементів та гліцерин (див. табл. 2.1).

Перед культивуванням рН середовища доводять до 6,8-7,0 за допомогою стерильного 6% розчину їдкого натрію. Далі додають посівний матеріал.

4.10.4. Приготування поживного середовища для вирощування в ферментері об'ємом 630 л

Для об'єму середовища 400 л, солі можна об'єднати разом із компонентами розчину мікроелементів, дріжджовий автолізат стерилізується у збірнику об'ємом 5 л, розчин триптофану у збірнику на 15 л (див. табл. 2.1).

Композиція А: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, NaCl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI , ЕДТА (за температури 131 °С, 40 хв, при рН 4,0 – 4,5).

Композиція Б: дріжджовий автолізат (за температури 112°С, 30 хв).

Композиція В: розчин триптофану (режим стерилізації 112°С, 30 хв).

Для уникнення осаду фосфатів магнію та кальцію, необхідно забезпечити кисле рН на рівні 4,5, підкислення поживного середовища здійснюють за допомогою 6% розчину соляної кислоти, яка не потребує попередньої стерилізації.

Дріжджовий автолізат вносять у кількостях 0,5% від об'єму ПС, що становить 2 л розчину, який готують в реакторі-змішувачі об'ємом 5 л.

Після стерилізації та охолодження, з окремого збірника об'ємом 10 л самопливом подають необхідну кількість технічного гліцерину у кількості 2% (об'ємна частка), доводять 6 %-м розчином стерильного гідроксиду натрію до рН 7,0. Після цього подають посівний матеріал з попередньої стадії.

Отже, окрім підготовки поживного середовища, потрібні додаткові роботи:

- приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при стерилізації його в посівному апараті об'ємом 100 л та ферментаторі 0,63 м³;

- приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації рН середовища перед початком культивування в посівному апараті об'ємом 10, 100 л та ферментаторі 0,63 м³;

- приготування та стерилізація запасних розчинів дріжджового автолізату для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках, посівному апараті на 10 л ;

- приготування та стерилізація розчинів мікроелементів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках, посівному апараті на 10 та 100 л.

Також необхідно передбачити збірники:

- з сорочкою і мішалкою для приготування та стерилізації дріжджового автолізату для посівного апарату об'ємом 0,63 м³ (5 л);

- з сорочкою і мішалкою для розчинення і стерилізації розчину триптофану для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 0,63 м³ (15 л);

– збірник із сорочкою і мішалкою для розчинення компонентів композиції А при стерилізації середовища для посівного апарату об'ємом 100 л (63 л);

– збірник з сорочкою і мішалкою для розчинення компонентів композиції А при стерилізації середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 0,63 м³ (630 л);

– збірник з сорочкою і мішалкою об'ємом 10 л для технічного гліцерину для культивування в посівному апараті об'ємом 0,63 м³ (оскільки гліцерин іноді випадає в осад і спостерігається згущення).

4.11. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена у табл. 4.10.

Таблиця 4.10

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу комплексного мікробного препарату

Позиція	Найменування обладнання	Кількість	Характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозбірник	1	«Клімтокомплект» (Україна) Пристрій для забору повітря Ступінь захисту пристрою IP43; Максимальна температура транспортованого повітря+ 40°C. Габаритні розміри, мм: 82x82x30
Ф 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр ФВП-592-592-48- G3 / PS, Фільтруючий матеріал – скловолокно (20-100 мм), Продуктивність – 3 400 м ³ /год, Е=90%, втрати тиску 40 – 250 Па Габаритні розміри, мм: 592x592x48 Виробник: «ВентАльянс» (Росія).
К-3	Компресор	1	Компресор гвинтовий К-МАХ 7,5-10 (ІЕЗ) Продуктивність 1050 л/хв Тиск повітря 10 бар Потужність 7,5 кВт Виробник: «Fini» (Італія) Габаритні розміри: 800 x 650 x 860 мм

Т-4	Теплообмінник	1	Повітроохолоджувач кубічного типу ICE65D12 ED, Холодовиробництво при t°кип.- 8°C; t°кам. – 0°C (SC2) –40,8 кВт Ламель – 12 мм Потужність вентилятора – 2,3 кВт Повітрявиробництво – 20250 м ³ /год Виробник: «ЕСО», Італія
РЕС-5	Ресивер	1	Максимальний робочий тиск – 1,6 МПа Матеріал корпусу - сталь Ст3 Виробник: «Remeza» (Білорусь) Габаритні розміри, мм: 700 x1800
Т-6	Теплообмінник	1	Повітронагрівач Потужність – 28.0 (кВт) Вид енергоносія – вода Витрати повітря – 5600.0 м ³ /час Максимальна температура теплоносія – 90.0 °С. Виробник: «Turbovent», Україна
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтр компактний класу F9. Фільтруючий матеріал – скловолокно з алюмінієвим сепараторами, E>95% Продуктивність - 4 250 м ³ /год Виробник: «ВентАльянс» (Росія)
Ф-8	Індивідуальний фільтр	1	ULPA-фільтр U15, E=99,999%, продуктивністю 270 м ³ /год *м ² Фільтруючий матеріал водовідштовхуюче і вологостійке скловолокно виробництва компанії Виробник: «Ahlstrom» (Фінляндія).
ІН-9	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 10 л, оснащений лопатевою мішалкою (50-1500 об/хв), з рубашкою, витратоміром, манометром, барботером, датчиками вимірювання рН, рО ₂ , температури, удосконаленим контроллером DO нержавіюча сталь - AISI 316L Габаритні розміри, мм: 700x1900 Виробник: «Sartorius» (Німеччина)
Р-10	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 63 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (20-3000

			об/хв) Потужність привода: 0,75-1,25 кВт Нержавіюча таль - 12X18H10T. Виробник: ООО«МашХим» (Росія) Габаритні розміри, мм: 614x1520
Д-11	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор «АД-200-2БЖ» Діапазон: 8–50 л, час дозування, не більше 45 с, похибка $\pm 0,5\%$, робочий тиск 0,4-0,5 МПа Габаритні розміри, мм: 1025x810x1330 Виробник: «Дозавтомати» (Україна)
Н-12	Насос відцентровий	1	Відцентровий насос Потужність: 0,3 кВт Максимальний напір: 30 м Максимальна продуктивність: 40 л/хв Нержавіюча сталь AISI 304 Габаритні розміри: 365 x 185 x 208 мм Виробник: «Aquatica» (Україна)
Ф-13	Індивідуальний фільтр	1	ULPA-фільтр U15, E=99,999%, з продуктивністю 5 400 м ³ /год*м ² Фільтруючий матеріал - вологостійкий склокартон Виробник: «AIR-Ukraine» (Україна)
ІН-14	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 100 л, оснащений сорочкою, барботером, трьох-ярусною турбінною мішалкою (200-400 об/хв), мікроспінером, відбивною перегородкою, датчиком рН, тиск в корпусі +0,3 МПа, рубашці до 0,4 МПа, температурні межі в корпусі та рубашці 5 -150 °С Установлена потужність, кВт: 0,56, сталь - AISI 316L Габарити, мм: 700 x 1600* габаритні розміри ферментера іншого виробника Виробник: «Промвіт» (Україна)

P-15	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 630 л, оснащений сорочкою лопатевою мішалкою (250 об/хв), Нержавіюча сталь 12Х18Н10Т Габарити, мм: 1128 x 2565 Виробник: ООО «МашХим» (Росія)
Д-16	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор «АД-200-2БЖ» Діапазон: 120–400 л, час дозування, не більше 45 с, похибка $\pm 0,5\%$, робочий тиск 0,4–0,5 МПа Габаритні розміри, мм: 1260x1100x1660 Виробник: «Дозавтомати» (Україна)
Н-17	Насос відцентровий	1	Відцентровий насос JEX 500 Продуктивність до 600 л/год Виробник: «Насосы+» (Україна)
Ф-18	Індивідуальний фільтр	1	УЛРА-фільтр U15, E=99,999%, продуктивністю 270 м ³ /год *м ² Фільтруючий матеріал водовідштовхуюче і вологостійке скловолокно виробництва компаній Виробник: «НьюФільтер» (Україна).
P-19	Реактор-змішувач для дріжджового автолізу	1	Реактор-змішувач об'ємом 5 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100-400 об/хв), тиск - 2,5 МПа, макс. температура – 300 °С, сталь - Hastelloy C-276 . Виробник: «WIGGENS GmbH» (Німеччина) Габаритні розміри, мм: 450 x 250 x 1430 мм *
P-20	Збірник для технічного гліцерину	1	Реактор-змішувач SEon об'ємом 10 л оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (до 100 об/хв), сталь 12Х18Н10Т Виробник: ГК «ЕвроХиммаш» (Україна) Габаритні розміри, мм: 420 x 350 x 450

Ф-21	Індивідуальний фільтр	1	ULPA-фільтр U15, E=99,999%, продуктивністю 270 м ³ /год *м ² Фільтруючий матеріал водовідштовхуюче і вологостійке скловолокно виробництва компаній Виробник: «НьюФільтер»» (Україна).
P-22	Збірник для розчину триптофану	1	Збірник об'ємом 15 л, оснащений сорочкою, пропеллерною мішалкою (з плавним регулюванням частоти обертів), З робочим тиском в корпусі -0,7 до +3 бар, датчик температур ТСП Pt 100, нержавіюча сталь - AISI 316. Виробник: ООО “Кабельфармтехника” (Україна) Габаритні розміри, мм: 483 x 1767*
Ф-23	Індивідуальний фільтр	1	HEPA-фільтр U15, E=99,999%, з продуктивністю 5400 м ³ /год*м ² Фільтруючий матеріал водовідштовхуюче і вологостійке скловолокно виробництва компаній Виробник: «AIR-Ukraine» (Україна).
Ф-24	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 630 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, манометром, датчиками вимірювання рН, рО ₂ DO, температури (PT 100), дисплеєм датчика тиску Трьох-рівнева лопатева мішалка (40-500 об/хв), Нержавіюча сталь - 12X18H10T. Виробник: ООО«Биотехно»(Росія) Габаритні розміри, мм: 1045 x 1128 x 2580 * наведені габаритні розміри іншого ферментера
H-25	Насос	1	Насос відцентровий потужність: 0.75квт Максимальний напір 21.5 м Максимальна продуктивність: 190 л/хв, нержавіюча сталь - AISI 304 Виробник:«Aquatica» (Україна)

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

1. <https://klimatkomplekt.com.ua/produkcija/ffhec/> (повітрозбірник);
2. <http://vent-all.ru/filtry-dlya-ochistki-vozduha/panelnye/> (фільтр грубої очистки);
3. https://www.autom.com.ua/ru/oborudovanie_sto/kompressory_fini/kompressor_vinto_voy/good1651/ (компресор);
4. http://euromash.kiev.ua/ua/teploobmennik_truba_v_trube_ua.php (теплообмінник);
5. <https://gts.lviv.ua/g21009233-resivery-remeza> (ресивер);
6. https://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionnie_filtri/karmannye-filtry-f5-f9-dlya-ventilyatsii-izgotovlenie-karmannikov.html (головний фільтр очистки);
7. https://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionnie_filtri/hepa_filtr.html (фільтр для інокулятора 10 л, малопродуктивні);
8. <http://sartorius-sd.com.ua/index.php/стерилизуемые-на-месте-биореакторы/biostat®-cplus> (інокулятор 10 л);
9. <https://mash-him.ru/apparaty-s-peremeshivayushhimi-ustrojstvami> (реактори-змішувачі 63, 630 л, габарити ферментерів на 100 і 630 л);
10. <https://www.dozator.com.ua/products/dozator-vesovoj-avtomaticheskij-dlya-dozirovaniya-zhidkih> (дозатор для збірника на 63 л);
11. <https://megawatt.dn.ua/p257257840-tsentrobezhnyj-nasos-jex.html> (насос для збірника на 63 л);
12. http://air-ukraine.com/airfilter/category_1072.html (фільтри тонкої очистки, високопродуктивні);
13. <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rabochim-obemom-100-l/> (інокулятор на 100 л);
14. <https://www.dozator.com.ua/ua/products/dozator-vesovoj-avtomaticheskij-dlya-dozirovaniya-zhidkosti> (дозатор для збірника об'ємом 630 л);
15. <https://t-dim.com.ua/ua/product/nasos-c-b-znii-0-3kvt-hmax-30m-qmax-40l-chv-leo-3-0/> (насос для збірника об'ємом 630 л);
16. http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_emal_mehanichestkim_perem_ustroystvom_ru.php (збірник об'ємом 10 л);
17. http://www.wiggens.com/index.php?m=content&c=index&a=show&catid=171&id=914&_d_id=de380d592eb0032b840912d84bead0 (збірник на 5 л);
18. https://tirit.org/reactor_him/lab_steel_gomo.php (габарити збірника на 5 л);
19. <http://www.kft2.com.ua/reaktor15.html> (збірник на 15 л);

20. <https://chemglass.com/151-process-reactors-cylindrical-jacketed?AspxAutoDetectCookieSupport=1> (габарити збірника на 15 л);
21. <https://biotechno.ru/catalog/promyshlennye-fermentery/promyshlenny-fermenter-biotechno-obemom-500-1000-l/> (виробничий ферментер на 630 л).

4.12. Опис технологічної схеми процесу біосинтезу ПАР та фітогормонів

Технологічна схема синтезу комплексного мікробного препарату з різноманітними біологічними властивостями на основі бактерій *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 містить допоміжні роботи (а саме: підготовку повітря, підготовку і стерилізацію поживних середовищ, приготування титрувальних агентів, розчину триптофану, приготування та стерилізація запасних розчинів мікроелементів та дріжджового автолізу) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

Технологічну і апаратурну схему біосинтезу комплексного мікробного препарату наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником (ПЗ-1) у найвищій точці на висоті 10 м, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря.

ДР 1.2. Попередня очистка від грубих домішок

Попередню очистку повітря здійснюють на тканинних фільтрах грубої очистки (Ф-2). Очистка від грубих домішок проводиться до концентрації не менше $C = 90\%$, забір частинок $\delta > 50$ мкм.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Для того щоб забезпечити аерацію та подолати гідравлічний тиск стовпа рідини в ферментері і створення в ньому тиску 0,13-0,14 МПа, повітря необхідно стиснути до 0,35 – 0,5 МПа. Стиснення приводить до нагрівання повітря в компресорах (К-3) до $t = 250^{\circ}\text{C}$.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря, що утворилося при компресуванні, задля відведення надлишкової вологи необхідно охолодити у водяному теплообміннику (Т-4) до температури 25-40 °С. Зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де зменшують пульсацію руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Головний технологічний показник, що контролюється на цьому етапі це $W = 60-70\%$.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Повітря нагрівають до температури 45-50°C у теплообміннику-нагрівачі (Т-6). Вологість повітря повинна становити 50%.

ДР 1.6. Головна фільтрація

Фільтри (Ф-7), що фільтрують підготовлене на попередніх етапах повітря, встановлюють біля ферментаційних відділень. Ступінь очищення повітря повинно становити 95%.

ДР 1.7. Тонка очистка

Після фільтрації повітря через трубопроводи подається безпосередньо в індивідуальні фільтри (Ф-8, Ф-13, Ф-18, Ф-21, Ф-23) кожного біореактора до ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 6.1 та збірників, що містять стерильні розчини, (Р-19, Р-22). Ступінь кінцевої очистки повітря становить $E = 99,999\%$ та КУО – 0.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування 6% розчину НСІ для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 10 л, 100 л, 630 м³

Для підкислення поживного середовища на всіх стадіях приготування поживного середовища загалом слід приготувати 980 мл 6% соляної кислоти (див. табл. 4.8). Оскільки кислота не стерилізується, її можна підготувати в одній колбі.

Для цього в колбу об'ємом 2 л наливають 784 мл питної води, при постійному перемішуванні подають 196 мл концентрованої 36% хлоридної кислоти. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки, з

метою уникнення сильної екзотермічної реакції. Колбу закривають скляним корком.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 10 л

Потрібно приготувати 12 мл розчину 6%-го розчину натрій гідроксиду, який буде використаний на етапах нейтралізації середовища при приготуванні ПС для інокуляту в посівних апаратах об'ємами 10 л.

Для цього на технічних вагах зважують 0,72 г кристалічного NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 50 мл, додають за допомогою піпетки 12 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 100 л

Для приготування 98 мл розчину 6%-го розчину натрій гідроксиду на вагах зважують 5,88 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають в колбу об'ємом 250 мл і додають 92 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 0,63 м³

Для приготування 800 мл розчину 6%-го розчину натрій гідроксиду на вагах зважують 48 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л і, додають 752 мл питної води. Стерилізують при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація запасних розчинів

ДР 3.1.1, 3.1.2., 3.1.3 Приготування та стерилізація запасних розчинів мікроелементів

На технічних вагах зважують 6,6 мг $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 3,6 мг $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,6 мг $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 24 мкг $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,18 мг $CoSO_4 \cdot 7H_2O$; 36 мкг H_3BO_3 ; 0,7 мкг KI та 4 мг ЕДТА (трилон Б), поміщають в колбу місткістю 250 мл далі розчиняють у 100 мл дистильованої води, перемішують, стерилізують у автоклаві при $131^\circ C$ 40 хв. Готують 3 порції даного розчину, для культивування в колбах на качалках, інокуляторі на 10 та 100 л. Даний розчин використовується надалі на стадіях ТП 5.4; ТП 5.5; ТП 5.6.

ДР 3.2.1, 3.2.2 Приготування та стерилізація запасних розчинів дріжджового автолізату

На технічних вагах зважують 5 г дріжджового автолізату. Наважку вносять в колбу об'ємом 250 л, додають 100 мл дистильованої води, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі $112^\circ C$ протягом 30 хв. Готують 2 порції даного розчину, для культивування в колбах на качалках, інокуляторі на 10 л.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 4.1. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

Для вирощування інокуляту потрібно 540 мл поживного середовища (ПС). Оскільки об'єми технічного гліцерину, запасного розчину невеликі, на даній стадії можна опустити їх для розрахунку об'єму композицій. Вміст компонентів для приготування ПС об'ємом 540 мл наведено у табл. 4.10.

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 0,189 г $(NH_2)_2CO_3$, 0,054 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ та 0,54 г NaCl, наважки поміщають в колбу об'ємом 1 л, доливають 240 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення солей, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують у автоклаві при температурі $131^\circ C$ протягом 40 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,076 г KH_2PO_4 , 0,324 г Na_2HPO_4 та поміщають в колбу об'ємом 1 л. Додають 200 мл дистильованої води і

перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Далі стерилізують в автоклаві при температурі 131°C 40 хв.

Таблиця 4.10

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 540 мл
середовища**

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 540 мл ПС, г(мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}_3$	0,35	0,189	Композиція А	340
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,054		
NaCl	1,0	0,54		
Вода	-	340		
KH_2PO_4	0,14	0,076	Композиція Б	200
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,6	0,324		
Вода	-	200		

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

Для одержання рідкого посівного матеріалу в інокулятої об'єм якого 10 л, слід приготувати 5,4 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 5,4 л середовища наведено у табл. 4.11. При розрахунку потрібно врахувати 108 мл технічного гліцерину (2 %) як субстрату, об'єми запасних розчинів не враховуємо, конденсат не утворюється, адже стерилізація відбувається в автоклаві. Тому об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 5,3 л.

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1,9 г $(\text{NH}_2)_2\text{CO}_3$, 0,54 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 5,4 г NaCl , наважки поміщають в колбу об'ємом 1 л, доливають 2,65 л дистильованої води і перемішують до повного розчинення солей, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують у автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хв.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,76 г KH_2PO_4 , 3,24 г Na_2HPO_4 та поміщають в колбу об'ємом 1 л. Додають 2,65 л дистильованої води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Далі стерилізують в автоклаві при температурі 131°C 40 хв. Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль ПС.

Таблиця 4.11

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5,4 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 5,4 л ПС, г(л)	Композиція	Об'єм композиції, л
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}_3$	0,35	1,9	Композиція А	2,65
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,54		
NaCl	1	5,4		
Вода	-	2,65		
KH_2PO_4	0,14	0,76	Композиція Б	2,65
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,6	3,23		
Вода	-	2,65		

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

Для одержання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л, потрібно приготувати 49 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 49 л середовища наведено у табл. 4.12. Слід врахувати 0,98 л технічного гліцерину як субстрату, враховується конденсат (10%), оскільки стерилізація солей проходить знову гострою парою. Тоді об'єм води, потрібний для приготування ПС, становить 43,12 л. *ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують: 17,5 г $(\text{NH}_2)_2\text{CO}_3$, 4,9 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 49 г NaCl , 21,6 г Na_2HPO_4 , 6,86 г KH_2PO_4 . Наважки поміщають у реактор-змішувач (Р-10), обладнаний сорочкою, на 63 л і за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-11) додають 43,1 л води. Для кращого розчинення солей

у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин солей до 40° С при перемішуванні 50-100 об/хв. Приготовлений розчин солей подають через відцентрови насоа (Н-12) у попередньо простерилізований інокулятор (ІН-14) об'ємом 100 л, обладнаний рН-метром. Додають 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1) до досягнення рН 4,5 (контроль рН-метром).

Стерилізація поживного середовища проходить безпосередньо в інокуляторі під тиском 0,15 МПа при температурі 131°С, упродовж 1 год. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 12,25 г дріжджового автолізу, поміщають у колбу на 1 л і доливають 245 мл дистильованої води, перемішують до розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Розчин дріжджового автолізу стерилізують в автоклаві при 112°С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

Таблиця 4.12

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 49 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 49 л ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, л
(NH ₂) ₂ CO ₃	0,35	17,15	Композиція А	48 л
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	4,9		
NaCl	1	49		
KN ₂ PO ₄	0,14	6,86		
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0,6	21,6		
Вода		43,1		
Конденсат		4,7	Композиція Б	0,25
Дріжджовий автолізат	0,25	12,25		
Вода		0,245		

*ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у ферментері на 0,63 м³*

Для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 0,63 м³, потрібно приготувати 400 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 400 л середовища наведено у табл. 4.13. Враховується 8 л технічного гліцерину як субстрату, а також враховується конденсат (10%), оскільки стерилізація ПС проходить безпосередньо у ферментері. Тоді об'єм води, потрібний для приготування ПС, становить 352,8 л.

Таблиця 4.13

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 400 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 400 л ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, л
(NH ₂) ₂ CO ₃	0,35	140	Композиція А	380
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	40		
NaCl	1,0	400		
KH ₂ PO ₄	0,14	56		
NaH ₂ PO ₄ ·12H ₂ O	0,6	24		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,1	4,4		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,6	2,4		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,4		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,004	0,016		
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,03	0,12		
H ₃ BO ₃	0,006	0,024		
KI	0,0001	0,0004		
ЕДТА	0,5	2		
Вода		341		
Конденсат		38		
Дріжджовий автолізат	0,25	100	Композиція Б	2
Вода		1,8		
Конденсат		0,2		
Триптофан	0,3	120	Композиція В	11
Вода		10		
Конденсат		1		

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 140 г $(\text{NH}_2)_2\text{CO}_3$, 56 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 400 г NaCl , 24 г Na_2HPO_4 та 56 г KH_2PO_4 , 4,4 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,4 г $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,4 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,016 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,12 г $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,024 г H_3BO_3 , 0,0004 г KI , 2 г ЕДТА. Наважки поміщають у реактор-змішувач (Р-15), обладнаний сорочкою, об'ємом 0,63 м³ л і через об'ємно-вагового дозатор (Д-16) подають 341 л води. Для кращого розчинення солей у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин солей до 40°C при перемішуванні 50-100 об/хв. Приготовлений розчин солей подають через насос (Н-17) у попередньо простерилізований, ферментер (ФР-24) об'ємом 0,63 м³, який обладнаний рН-метром. Додають 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1) до досягнення рН 4,5 (контроль рН-метром).

Стерилізація поживного середовища проходить безпосередньо у ферментері під тиском 0,15 МПа при температурі 131°C упродовж 1 год. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 100 г порошку дріжджового автолізу, подають у реактор-змішувач (Р-22) об'ємом 5 л, додають 1,8 л води, вмикають перемішувальний пристрій (50-100 об/хв) до розчинення. Розчин дріжджового автолізу стерилізують у реакторі Р-19 при 112°C (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 4.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 120 г порошку триптофану, подають у реактора-змішувача (Р-23) об'ємом 15 л, додають 11 л води, вмикають перемішувальний пристрій (50-100 об/хв) до розчинення. Розчин триптофану стерилізують у реакторі Р-22 при 112°C (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 зберігають у пробірках на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА). Пересівають кожні

3 місяці. Усі роботи з колекційною культурою проходять у строго асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на агаризованому середовищі

Колекційну культуру (в пробірках з м'ясо-пептонним середовищем), розсівають до ізолюваних колоній на чашках Петрі з МПА. Вирощують при температурі 30°C упродовж 24 год.

ТП 5.3. Вирощування робочої культури *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на агаризованому середовищі

Від ТП 5.2 в асептичних умовах, ізолювані колонії, пересівають до пробірки з МПА. Інкують 24 год при температурі 30°C.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

У колбу з композицією А (від ДР 4.1.1.), вносять 200 мл композиції Б (від ДР 4.1.2), 0,54 мл розчину мікроелементів (від ДР 3.1.1), 2,7 мл розчину дріжджового автолізу (від ДР 3.2.1). Розчин перемішують і розливають по 135 мл в 4 стерильних колби (для качалок) об'ємом 750 мл і в кожену колбу, в асептичних умовах, піпеткою вносять по 2,7 мл технічного гліцерину.

У пробірку із робочою культурою *A. calcoaceticus* IMB В-7241, згідно правил асептики, додають фізіологічний розчин (5 мл), здійснюють суспендування клітин (змивають культуру), піпеткою відбирають суспензію клітин і вносять у колби (із попередньо розлитим поживним середовищем). Одну пробірку із суспензією клітин використовують для засіву однієї колби.

A. calcoaceticus IMB В-7241 культивують у колбі на качалці (320 об/хв) за температури 30°C, 48 год. Після вирощування проводять мікробіологічний аналіз культуральної рідини кожної колби, а також визначають концентрацію біомаси, яка повинна становити 0,5 г/л.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

В інокулятор (ІН-19) об'ємом 10 л через стерильну засівну колбу об'ємом 3 л подають композицію А - 2,65 л (від ДР 4.2.1), після чого

композицію Б (від ДР 4.2.2) - 2,65 л через стерильну засівну колбу об'ємом 100 мл вносять 6 мл розчину мікроелементів (від ДР 3.1.2), 30 мл дріжджового автолізу (від ДР 3.2.2) і через засівну колбу об'ємом 200 мл 120 мл технічного гліцерину. За допомогою засівної колби вносять 6%-ий розчин NaOH (від ДР 2.2.1) до досягнення рівня рН 7,0.

Після підлучення середовища, через засівну колбу вносять посівний матеріал (перед цим у боксі в попередньо простерилізовану колбу об'ємом 1 л зливають посівний матеріал з 4 колб (від ТП 5.4)), далі в сорочку інокулятора подають пару. Вмикають перемішувачий пристрій (100-400 об/хв) подачу повітря для підтримання концентрації розчиненого кисню (pO_2) на рівні 20-30% від насичення повітрям.

Культивування - при температурі 30°C, 48 год. Кожні 4 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль і визначають концентрацію біомаси ($x=0,5$ г/л).

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

У посівний апарат об'ємом 100 л (ІН-14) з композицією А (від ДР 4.3.1) через стерильну засівну колбу на 1 л вносять композицію Б (від ДР 4.3.2), через стерильну засівну колбу на 100 мл додають розчин мікроелементів (від ДР 3.1.3) і вносять технічний гліцерин у кількості 0,98 л через засівну колбу об'ємом 1 л, далі доводять значення рН до 7,0 за допомогою стерильного 6%-го розчину NaOH (від ДР 2.2.2).

Після цього в посівний апарат подають інокулят з інокулятора (ІН-19) (самоплином від ТП 5.5), в сорочку інокулятора подають пару. Вмикають перемішувачий пристрій (100-400 об/хв), подачу повітря для підтримання концентрації розчиненого кисню (pO_2) на рівні 20-30% від насичення повітрям.

Культивування здійснюють при температурі 30°C, упродовж 48 год. Кожні 3-4 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль посівного матеріалу, визначають концентрацію біомаси ($x = 0,5$ г/л).

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 0,63 м³

У ферментер об'ємом 0,63 м³ (ФР-24) з композицією А (від ДР 4.4.1) самопливом подають дріжджовий автолізатом із збірника (Р-19) (від ДР 4.4.2). Також самопливом із реактора (Р-20) об'ємом 10 л подають 8 л технічного гліцерину, а із реактора - змішувача (Р-22) об'ємом 15 л подається 11 л розчину триптофану, також самопливом. Після цього доводять рН середовища до 7,0, додаванням лугу (від ДР 2.2.3)

Після цього через трубу перетискування подають посівний матеріал з інокулятора (ІН-14) (від ТП 5.6). У сорочку ферментера подається пара, вмикається перемішуючий пристрій Вмикають перемішуючий пристрій (40-500 об/хв). подачу повітря для підтримання концентрації розчиненого кисню (рО₂) на рівні 20-30% від насичення повітрям.

Біосинтез біологічно-активних речовин здійснюють за температури 30°C упродовж 96 год.

Упродовж культивування відбирають проби культуральної рідини (кожної 4 год) для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, поверхнево-активних речовин і ауксинів. На кінець культивування концентрація ПАР становить (С = 5,6 г/л), біомаси (х = 1,0 г/л), ауксинів 4850,98 мкг/л. Після виробничого біосинтезу, культуральну рідину подають у збірник, щоб звільнити ферментер для наступного циклу виробництва [143].

ЗВ 7. Знешкодження відходів

ЗВ 7.1 Знешкодження рідких відходів.

Розчини відпрацьованої каустичної соди, після миття реакторів (Р-10, Р-15, Р-19, Р-20, Р-22), інокуляторів (ІН-9, ІН-14), та ферментера (ФР-24), а також використані розчини засобу «Славін» (після миття поверхонь) подаються на установку очистки мийних та дезінфікуючих розчинів. Зокрема, де крім фільтрування і відстоювання, відбувається опромінення ультрафіолетовим випроміненням ($\lambda=254$ нм). Після чого води зливають до каналізації.

ЗВ 7.2 Знешкодження газоповітряних відходів.

Після культивування, повітря від посівних апаратів (ІН-9, ІН-14) та ферментера (ФР-24) подається у систему фільтрації (вугільний адсорбер, що розміщено безпосередньо у випускному патрубку циклона). Після чого очищене повітря випускають у атмосферу.

4.13. Контроль виробництва комплексного мікробного препарату на основі *A. calcoaceticus* IMB B-7241

4.13.1. Карта постадійного контролю виробництва комплексного мікробного препарату *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Таблиця 4.14

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Кт 1.1 <i>Забір повітря</i>	Повітрязбірник, висота забору повітря	Висота труби забору	Протягом усього процесу культивування	H=10 м
Кт 1.2 <i>Попереднє грубе очищення</i>	Очищене повітря, ступінь очищення повітря на виході з фільтра, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження повітря через фільтр грубого очищення	E=90%, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 <i>Стиснення повітря</i>	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування	P=0,35-0,5 МПа, t=250° C
Кт 1.4 <i>Охолодження повітря і видалення вологи</i>	Охолоджене повітря, температура, частка вологи	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря і видалення вологи	t=25-30° C, W=60%
Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря, температура, частка вологи	Термометр технічний, психрометричний метод	Після нагріву повітря	t=40-50° C, W ≤ 40%

Продовження табл. 4.14

Кт 1.6 <i>Очищення повітря на головному фільтрі</i>	Очищене повітря, перепади тисків, ступінь очищення повітря на виході з фільтра	Манометр технічний, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі головного очищення	E=95%, тиск згідно паспорту
Кт, Км 1.7 <i>Очищення повітря на індивідуальних фільтрах</i>	Очищене повітря, ступінь очищення повітря, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження повітря через індивідуальні фільтри	E=99,999%
Кх 2.1. <i>Приготування 6% розчину HCl</i>	Концентрація HCl	Хімічний метод	Концентрація перевіряється в кінці приготування розчину	C=6%
Кт, Кх, Км 2.2.1 <i>Приготування і стерилізація гідроксиду натрію</i>	Розчин NaOH, концентрація, тиск, час, стерильність	Хімічний метод, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація перевіряється в кінці приготування розчину, тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації розчину	C=6%, t=131°C, P=0.15 МПа, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 2.2.2 <i>Приготування і стерилізація гідроксиду натрію</i>	Розчин NaOH, концентрація, тиск, час, стерильність	Хімічний метод, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація перевіряється в кінці приготування розчину, тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації розчину	C=6%, t=131°C, P=0.15 МПа, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 2.2.3 <i>Приготування і стерилізація гідроксиду натрію</i>	Розчин NaOH, концентрація, тиск, час, стерильність	Хімічний метод, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація перевіряється в кінці приготування розчину, тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації розчину	C=6%, t=131°C, P=0.15 МПа, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.1. <i>Розчин мікроелементів</i>	Розчин мікроелементів тиск, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний	Тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, p=0,15 МПа, τ= 40 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл 4.14

Кт, Км 4.1.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, ρ=0,15 МПа, τ= 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, ρ=0,15 МПа, τ= 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, температура, час, рН, стерильність	Манометр, Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, ρ=0,15 МПа, τ= 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, температура, час, рН, стерильність	Манометр, Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, ρ=0,15 МПа, τ= 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, температура, час, рН стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр мікробіологічний контроль	Тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131°С, ρ=0,15 МПа, τ= 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112°С, ρ=0,05 МПа, τ= 30 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл.4.14

Кт, Км 4.4.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, температура, час, рН стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр мікробіологічний контроль	Тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131°C, ρ=0,15 МПа, τ= 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.4. <i>Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках</i>	Посівний матеріал, температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, мікробіологічний контроль, ФЕК, визначення біомаси за оптичною густиною клітинної суспензії	Швидкість обертання качалки встановлюється на початку культивування, температура контролюється протягом всього періоду, визначення концентрації біомаси в кінці культивування	t = 30 °С, τ = 48 год, ω=320 об/хв, X _{біомаси} = 0,5 г/л відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.5 <i>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л</i>	Посівний матеріал, температура, тривалість культивування, рН, рО ₂ , витрати повітря, частота обертів мішалки, концентрація біомаси мікробіологічна чистота культури,	Датчик температури, рО ₂ , рН, годинник, технічний тахометр, ротометр, аналітичні ваги (ваговий метод визначення концентрації ПАР) фотоелектроколориметр (непрямий метод визначення концентрації біомаси), мікробіологічний контроль	Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН, рО ₂ , витрати повітря автоматично контролюються протягом культивування, визначають концентрацію ПАР, рівень джерела карбону і вуглецю, кожні 4 год визначають концентрацію біомаси, проводять мікробіологічний контроль	t = 30 °С, τ = 48 год, рО ₂ =20-30%, рН = 7,0 ω = 100-400 об/хв, X _{біомаси} = 0,5 г/л, С _{ПАР} =5,6 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

<p>Кт, Км 5.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л</p>	<p>Посівний матеріал, температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси</p>	<p>Датчик температури, рО₂, рН, годинник, технічний тахометр, ротометр, аналітичні ваги (ваговий метод визначення концентрації ПАР) фотоелектроколориметр (непрямий метод визначення концентрації біомаси), мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН, рО₂, витрати повітря автоматично контролюються протягом культивування, визначають концентрацію ПАР, рівень джерела карбону і вуглецю, кожні 4 год визначають концентрацію біомаси, проводять мікробіологічний контроль</p>	<p>t = 30 °С, τ = 48 год, рО₂=20-30%, рН = 7,0 ω = 100-400 об/хв, X_{біомаси}= 0,5 г/л, С_{ПАР}=5,6 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Кх, Км 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 0,63 м³</p>	<p>Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рО₂ та рН, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, концентрація ПАР та фітогормонів, Концентрації джерела карбону та нітрогену</p>	<p>Датчик температури, рО₂, рН, годинник, технічний тахометр, ротометр, аналітичні ваги, аналітичні ваги (ваговий метод визначення концентрації ПАР) фотоелектроколориметр (непрямий метод визначення концентрації біомаси), хроматограф (метод ВЕРХ – концентрації фітогормонів) мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН, рО₂, витрати повітря автоматично контролюються протягом культивування, в кінці визначають концентрацію біомаси, рівень джерела карбону і вуглецю, концентрацію фітогормонів і ПАР визначається під час після закінчення процесу культивування, мікробіологічний контроль кожні 4 год</p>	<p>t = 30 °С, τ = 96 год, рО₂=20-30%, ω = 100-400 об/хв, рН = 7,0, X_{біомаси}= 1 г/л, С_{ПАР}=5,6 г/л, С_{ауксинів}=4850,49 мкг/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

4.13.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованим поживним середовищем і мікроскопіюванням.

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

Виконання посівів. Посіви здійснюють шляхом відбору 0,1 мл з об'єму проби стерильною піпеткою і нанесення її на поверхню СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій. Чашки з посівами поміщають у термостат при температурі 32-34 °С, 1-2 доби для МПА та при температурі 24-26 °С, 3-5 діб для СА. Аналіз посівів здійснюють, починаючи з 6-8 години. На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів [155].

Мікробіологічний контроль чистоти культури

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу і культуральної рідини можна здійснювати двома методами: прямим висівом на агаризовані поживні середовища і мікроскопіюванням.

Прямий висів на агаризоване середовище. Здійснюють розсівання проби готового посівного матеріалу і культуральної рідини на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем до ізольованих колоній і подальшим мікроскопуванням мікроорганізмів з окремих колоній, які виростили на середовищі після інкубування [156].

A. calcoaceticus – аероб, на поверхні агаризованого середовища клітини утворюють колонії діаметром 0,5-1,5 мм на 24 год. культивування та діаметром 2,5-3,5 мм на 30-48 год., за температури 30°C. Колонії біло-кремового кольору, непрозорі, округлі, з гладенькою поверхнею, опуклим профілем, рівними полями, однорідною структурою [157,158].

Мікроскопіювання Мікроскопіюють зразок клітинної суспензії з використанням 1–2 краплі імерсійного масла, об'єктивом зі збільшенням 90x [156].

Якщо культура неконтамінована, при мікроскопіюванні можна спостерігати червонуваті клітини (після промивання Фуксином) *A. calcoaceticus*, паличкоподібної форми, ширина яких, в стаціонарній фазі росту, становить 0,6-1,5 мкм, а довжина 1,5 – 2,5 мкм,. Клітини – нерухомі, не утворюють спор, розміщені по двоє або ланцюжками [157] (рис. 5.1.).

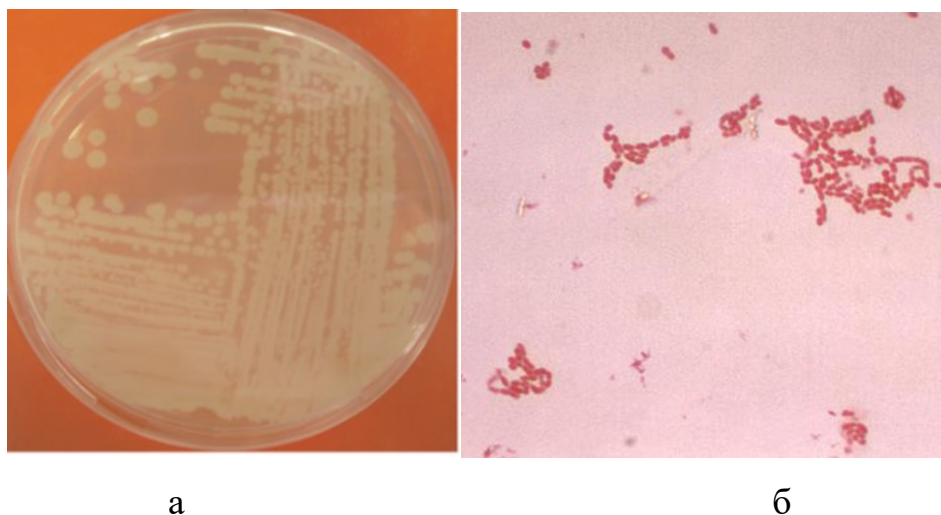


Рис. 5.1. Культура *A. calcoaceticus*:

а - на агаризованому середовищі; б - після фарбування за Граммом (90×);

4.13.3. Показники росту і синтезу

Концентрацію біомаси визначають непрямим методом за оптичною густиною клітинної суспензії за допомогою фотоелектроколориметра (з довжиною хвилі 540 нм). Отримані дані переводять у розрахунку на суху біомасу клітин за стандартним калібрувальним графіком [158].

Визначення кількості синтезованого цільового продукту

Визначення концентрації ПАР.

Концентрацію ПАР визначають ваговим методом, перед тим трьохразово, екстрагуючи супернатант сумішшю Фолча (суміш хлороформу і метанолу у співвідношенні 2:1). Для одержання супернатанту, культуральну рідину центрифугували (5000 g, 20 хв). Екстракти 1-3 об'єднують і упарюють на роторній випарній установці IP-1M2 (Росія) при 50 °C і абсолютному тиску 0.4 атм до постійної маси [159].

Визначення концентрація фітогормонів.

Виділення фітогормонів

Ауксини виділяють із супернатанту культуральної рідини *A. calcoaceticus* IMB В-7241 методом перерозподілу у двох фазах розчинників, що не змішуються між собою: етилацетат (для ауксинів) рН 3,0, екстракцію проводять тричі. Одержані екстракти випарюють під вакуумом при температурі 40-45°C. Сухий залишок перерозчиняють у 80%-ному етанолі.

Визначення кількісного і якісного складу ауксинів

Попереднє очищення і концентрування фітогормональних екстрактів здійснюють методом – накопичувальної тонкошарової хроматографії, на пластинках із силікагелем у суміші розчинників, що вводять послідовно: хлороформ, 12,5 % водний аміак, етилацетат: оцтова кислота (20:1).

Ідентифікацію та кількісне визначення фітогормонів проводять методом високоефективної рідинної хроматографії, за допомогою спектроскопії з використанням рідинного хроматографа Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) та мас-спектрометричного (mass spectrometry – MS) детектора Agilent G1956В. В якості рухомої фази використовують метанол (А) та 1% розчин оцтової кислоти в воді (В). Розділення проводиться на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (2,1мм×150мм, 3 мкм) (Agilent Technologies, USA), швидкість потоку через колонку 0,25 мл/хв, температура термостату 30 °С, об'єм інжекції 2 мкл. [3].

4.13.4. Визначення концентрація джерела карбону і нітрогену

Визначення концентрації гліцеролу.

Концентрацію гліцерину в супернатанті можна визначають за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ, Shimadzu). Для цього культуральну рідину центрифугують протягом 20 хв при 10°C і 5000 g. Обладнання для ВЕРХ складається з термостатичної колонки Aminex HPLC 87H (реакцію проводять при температурі 75 °C), насосу LC-20AD, автоматичного пробовідбірника SIC-20 AC, детектора показника заломлення RID-20A та

підігрівача колонки СТО-20 АС. В якості елюента використовують воду при швидкості потоку 0,6 мл/хв [160].

Визначення концентрації (амінного азоту) сечовини.

Концентрацію сечовини в супернатанті рідині визначають діацетилмонооксимним методом [49]. Метод базується на реакції сечовини з діацилмонооксидом в кислому середовищі, внаслідок якої утворюється комплексна сполука червоного кольору, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту сечовини в культуральній рідині, оптичну густину визначають (за довжини хвилі 520 нм) за допомогою УФ-ВИД спектрофотометра (наприклад, Agilent Сагу 60) **[Помилка! Джерело посилання не знайдено.]**.

РОЗДІЛ 5. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

5.1. Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формування завдання на розробку системи автоматизації

Після приготування і стерилізації середовища відбувається перша стадія вирощування посівного матеріалу *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 (з чого і починається автоматизація) у інокуляторі ІН-9, робочий об'єм якого становить 10 л.

У ферментер із простерилізованими композиціями вносять 6%-ий розчин NaOH до досягнення рівня рН 7,0 за показниками датчиків. Після підключення середовища, через засівну колбу вносять посівний матеріал, далі в сорочку інокулятора подають пару. Вмикають перемішуючий пристрій (100-400 об/хв) подачу повітря - для підтримання концентрації розчиненого кисню (pO_2) на рівні 20-30% від насичення повітрям. Культивування здійснюють при температурі 30°C, упродовж 48 год. Опісля, отриманий посівний матеріал подається самоплином до інокулятора об'ємом 100 л (ІН -14), відкривають вентиль.

Перед цим готується поживне середовище для ІН -14. Тому у реактор-збірник (Р-10) через об'ємно-ваговий дозатор подають 43,1 л води. У реактор уже внесені солі, що попередньо зважені на технічних вагах.

Для кращого розчинення солей у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин солей до 40° С при перемішуванні 50-100 об/хв, рівень рідини в апараті не перевищує 44 л. Приготовлений розчин солей подають через відцентровий насос (Н-12) у вже простерилізований інокулятор (ІН-14) об'ємом 100 л. Додають 6%-ий розчин соляної кислоти до досягнення рН 4,5 (контроль датчиками).

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ЛУХТ БТЕК 04.01.03 КР ПЗ			
Розроб.		Жданюк В.І.			РОЗДІЛ 5. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрівшів
Перевір.		Клименко О.М.					125	169
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Стерилізація поживного середовища проходить безпосередньо в інокуляторі під тиском 0,15 МПа при температурі 131°C, упродовж 1 год.

Далі вносять стерилізовані акомпозицію Б, розчин мікроелементів і вносять технічний гліцерин, далі доводять значення рН до 7,0 за показниками датчиків, за допомогою стерильного 6%-го розчину NaOH.

Після цього в посівний апарат подають інокулят з інокулятора (ІН-19) (самоплином), в сорочку інокулятора подають пару. Вмикають перемішуючий пристрій (100-400 об/хв), подачу повітря - для підтримання концентрації розчиненого кисню (pO_2) на рівні 20-30% від насичення повітрям. Культивування здійснюють при температурі 30°C, упродовж 48 год.

Усі параметри, які необхідно автоматизувати, їх характер контролю та/або управління, регулювання а також засоби для реалізації цих процесів указані у табл. 5.1.

5.2. Завдання на розробку схеми автоматизації ділянки виробничої ферментації

Таблиця 5.1

Ділянка приготування, періодичної стерилізації середовища та вирощування посівного матеріалу

№ п/п	Машина, апарат, агрегат	Параметр, місце відбору імпульсу	Значення параметру, допустимі відхилення	Система автоматизації			
				Вид системи автоматизації	Характер контролю, регулювання, управління	Додаткові вимоги	
1	Інокулятор-9	Рівень рідини в апараті	5,4 л	Контроль	Відображення, сигналізація, реєстрація	АРМ оператора	
2		Температура культивування	28-30 °С	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора	
				Регулювання	Стабілізація	Дія на подачу пари у сорочку	
3		Рівень рН	6,8-7,0	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора	
				Регулювання	Стабілізація	Дія на подачу титрувального агента	
4		рO ₂	20-30% від насичення повітрям	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора	
5				Регулювання	Стабілізація	Дія на подачу повітря та частоту обертів мішалки	
6		Об'ємно-ваговий дозатор	Об'єм води	43,1 л	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
					Управління	Пуск/стоп	АРМ оператора
7		Реактор-10	Рівень рідини в апараті	44 л	Контроль	Відображення	АРМ оператора

8		Частота обертів мішалки	50-100 об/хв	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Управління		Пуск/стоп, зміна частоти
9		Температура	40 °С	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання		Стабілізація
10	Насос	Стан насосу подачі розчинених солей із Реактора-10 у Інокулятор-14	Увімкнено/вимкнено	Управління	Ручне/дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю
11	Інокуято-14	Рівень рідини в апараті	49 л	Контроль	Відображення, сигналізація, реєстрація	АРМ оператора
12		Температура	28-30°С (культивування)	Контроль	Відображення	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Дія на подачу пари в сорочку
13		Температура	131°С (стерилізації)	Контроль	Відображення	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Дія на подачу пари в апарат
14		Тиск	0,15 МПа	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
15		pO ₂	20-30% від насичення повітрям	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
	Регулювання			Стабілізація	Дія на подачу повітря та частоту обертів мішалки	
16						

17		pH	4,0±0,5 од. pH (стерилізації) 6,8±7,0 од. pH (культивування)	Контроль	Відображення	АРМ оператора
----	--	----	---	----------	--------------	---------------

5.3. Опис функціональної схеми автоматизації

Перший контур. Контролю рівня рідини у ферментері, який має регламентоване значення 5,4 л. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) змін в архіві даних. Рівень вимірюється магнітостракційним поплавковим датчиком рівня (1а), який попереджає про досягнення допустимого рівня в апараті за рахунок світлової сигналізації. Сигналізація передбачається на АРМі оператора-технолога.

Другий контур контролю і регулювання температури розчину у ферментері. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в архіві даних. Для регулювання температури розчину передбачається її стабілізація на заданому значенні (28-30°C) за рахунок подачі пару у сорочку апарата регулюючим органом (поз. 2в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 2б..

Третій контур автоматичного контролю і регулювання. Необхідним є контроль і регулювання рівня рН розчину у ферментері, який має регламентоване значення 6,8-7,0 од. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві. Для регулювання рН розчину передбачається стабілізація на заданому значенні за рахунок впливу на подачу титрувальних агентів – гідроксиду калію чи хлоридної кислоти регулюючим органом (поз. 3в), що приводиться в дію за допомогою перетворювача вимірювання рН і окисно-відновного потенціалу 3б.

Четвертий контур автоматичного контролю і регулювання концентрації розчиненого кисню – 20-30% від насичення повітрям. Спостереження за допомогою датчика (поз. 4а) за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в архіві даних. Для регулювання передбачається за рахунок впливу на подачу повітря регулюючим органом (поз. 4в), та приводиться в дію за допомогою перетворювач (поз. 4б).

П'ятий контур автоматичного контролю та управління необхідним є контроль швидкості перемішування рідини у ферментері для підтримки концентрації розчиненого кисню на заданому значенні. Мішалка приводиться в дію мотором (M1), швидкість обертів контролюється на заданому значенні. 50 об/хв \pm 10 об/хв. Спостереження за зміною передбачено на АРМі оператора-технолога. Для регулювання швидкості обертів мішалки (поз. 5а) передбачається її стабілізація за рахунок впливу на частоту обертів мішалки і кнопкою «Стоп» по місцю.

Шостий контур автоматичного контролю і управління, відбувається контроль стану об'ємно-вагового дозатора увімкнений/вимкнений (поз. 6а). Управління здійснюється з АРМа оператора включенням-відключенням дозатора, у ручному режимі управління..

Сьомий контур контролю рівня рідини у збірнику-реакторі, який має регламентоване значення 44 л контролюється датчиком. Спостереження за зміною - на АРМі оператора-технолога зі реєстрацією змін в архіві даних. Рівень вимірюється поплавковим магнітним рівнеміром ПДУ-И (7а), який попереджає про досягнення допустимого рівня в апараті за рахунок світлової сигналізації. Сигналізація передбачається на АРМі оператора-технолога .

Восьмий контур передбачає автоматичний контроль і регулювання швидкості перемішування, яка приводиться в дію мотором (M2) і контролюється ж ним на заданому значенні. Швидкість обертів має регламентоване значення 50-100 об/хв і відхилення \pm 10 об/хв. Частота обертів в реакторі (поз. 8а). Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога. Для регулювання швидкості обертів мішалки передбачається її стабілізація за рахунок впливу на частоту обертів мішалки і аварійною кнопкою «Стоп» по місцю.

Дев'ятий контур контролю і регулювання температури розчину у реакторі-змішувачі. Спостереження за допомогою датчика (поз.9а) за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога із реєстрацією. Для регулювання

температури розчину передбачається її стабілізація на заданому значенні (40°C) за рахунок подачі пару у сорочку апарата регулюючим органом (поз. 9в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 9б.

Десятий контур автоматичного контролю і управління передбачає контроль увімкненого або вимкненого стану насосу. Відповідно, управління здійснюється з АРМа оператора включенням-відключенням насосу, у ручному режимі управління шляхом включення-відключення насосу на щиту перетворювачів. Аварійне відключення насосу здійснюють шляхом натискання «Пуск» на моторі МЗ та насосі.

Одинадцятий контур. контролю і регулювання температури розчину у ферментері при стерилізації. Спостереження (поз. 11а) за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в архіві даних. Для регулювання температури розчину передбачається її стабілізація на заданому значенні (131°C) за рахунок подачі пару у апарат регулюючим органом (поз. 11в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 11б.

Дванадцятий контур автоматичного контролю і регулювання, тиску у ферментері під час стерилізації, який має регламентоване значення 0,15 МПа. Спостереження (поз. 12а) за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві. Регулювання здійснюють впливом на витрату пари, за рахунок подачі пари/води у сорочку апарата регулюючим органом (поз. 12в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 11б.

Тринадцятий контур контролю рівня рідини у ферментері, який має регламентоване значення 49 л. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) змін в архіві даних. Рівень вимірюється поплавковим магнітним рівнеміром ПДУ-И (13а), який попереджає про досягнення допустимого рівня в апараті за рахунок світлової сигналізації. Сигналізація передбачається на АРМі оператора-технолога .

Чотирнадцятий контур контроль і регулювання температури розчину у ферментері. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в архіві даних. Температура у збірнику вимірюється датчиком температури (поз. 14а). У разі перевищення допустимого відхилення температури передбачається сигналізація на АРМі оператора. Для регулювання температури розчину передбачається її стабілізація на заданому значенні (28-30°C) за рахунок подачі пари/води у сорочку апарата регулюючим органом (поз. 14в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 14б.

П'ятнадцятий контур автоматичного контролю і регулювання концентрації розчиненого кисню – 20-30% від насичення повітрям. Спостереження за допомогою датчика (поз. 15а) за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в архіві даних. Регулювання передбачається за рахунок впливу на подачу повітря регулюючим органом (поз. 15в), та приводиться в дію за допомогою перетворювач (поз. 15б).

Шістнадцятий контур передбачає автоматичний контроль і регулювання швидкості перемішування, яка приводиться в дію мотором (М3) і контролюється ж ним на заданому значенні. Швидкість обертів має регламентоване значення 100-400 об/хв і відхилення ± 10 об/хв. Частота обертів в реакторі (поз. 16а). Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога. Для регулювання швидкості обертів мішалки передбачається її стабілізація за рахунок впливу на частоту обертів мішалки і аварійною кнопкою «Стоп» по місцю.

Сімнадцятий контур автоматичного контролю і регулювання. Необхідним є контроль і регулювання рівня рН розчину у ферментері, який має регламентоване значення 6,8-7,0 од. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві (поз. 17а).. Для регулювання рН розчину передбачається стабілізація на

заданому значенні за рахунок впливу на подачу титрувальних агентів – гідроксиду калію чи хлоридної кислоти регулюючим органом (поз. 17в), що приводиться в дію за допомогою перетворювача вимірювання рН і окисно-відновного потенціалу 17б.

5.4. Специфікація на прилади та засоби автоматизації

Таблиця 5.2

Специфікація засобів автоматизації

Позиція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Виробник
1	2	3	4	5	6
1а, 7а, 13а	Рівень	В агрегатах	Магнітностракційний поплавковий датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 300-4000 мм, макс. температура +70°C, аналоговий вихід [1]	NMT	KOBOLD Messring GmbH
2в, 3в, 4в, 9в, 11в, 12в, 14в, 15в, 17в	-	По місцю	Пневматичний привід для управління заслінками та кранами. Керуючий сигнал 2-100 кПа. Кут повороту 90°. Клас точності – 1% [2]	KUP	Kobold
2а, 9а, 11а, 14а	Температура	В агрегатах	Датчик термоперетворювач опору, діапазон 20-50 °С, уніфікований вихідний сигнал 4-20 мА. Матеріал: нержавіюча сталь. Макс. тиск 25 бар, клас точності – 0,10, приєднання G1/2 [3]	TCM-1187	ТОВ НВФ «Стандарт М»
2б, 9б, 11б, 14б	Температура	На щиті	Електропневмоперетворювач з сигналом 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа. Основна похибка 0,16% [4]	Dwyer серія 2700	СВ АльтерА
3а, 17а	рН	В агрегаті	Датчик рН. Діапазон вимірювань від 0-14 од. рН. Температура середовища 0-100 °С [5]	П-02 Т	<u>Dilis</u>
3б, 17б	рН	На щиті	Перетворювач вимірювання рН і окисно-відновного потенціалу, аналоговий вихід [6]	рН-101П	<u>Dilis</u>
4а, 15а	рO ₂	В агрегаті	Вихід сигналу 285 - 590 мкА Діапазон вимірювання 0 - 10 PPM (мінімум) 0 - 10000 PPM (макс.) Час відгуку Т90 13 с. Повна шкала точності 2 ± 1% Температурний коефіцієнт 2,54%/°С Робоча температура від 0 - 50 °С [7]	ТO2-1х	SOUTHLAND SENSING
5а, 8а, 16а	Частота обертів мішалки	На щиті	Частотний перетворювач для двигунів середньої потужності. Потужність 0.75кВт 1-ф/220 В, номінальний струм 4,2 В [8]	VFD007E L21A	Delta Electronics

ба	Об'єм води	На агрегаті	Дозатор ,Діапазон: 8–50 л, час дозування, не більше 45 с, похибка $\pm 0,5\%$, робочий тиск 0,4-0,5 МПа [9]	АД-200-2БЖ	«Дозавтомати»
12а	Тиск	В агрегаті	Датчик тиску Діапазон тиску: 0-40 Бар Вихідний сигнал 4-20 мА [10]	DMP 331PI	BD SENSORS
КМ1, КМ2, КМ3	Магнітний пускач	На щиті	Магнітний пускач, робочий струм 7А, потужність двигуна 3кВт, управляючий сигнал 220В [11]	3RT2015-1AP01	SIEMENS
SA1	-	На щиті	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний-ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією [12]	3SB3210-2DA11	SIEMENS
SB1, SB2, SB3	-	По місцю	Двоклавішна кнопка станція «Пуск-стоп», номінальна напруга 400 В [13]	8LP2T B7113	Lovato

Пошук та підбір приладів здійснювався за допомогою таких електронних джерел:

1. <https://www.kobold.com/Магнитострикционный-уровнемер-NMT>
2. <https://www.kobold.com/Пневматический-привод-KUP>
3. <http://standart-m.com.ua/kipia/termopreobrazovateli/termopreobrazovateli-soprotivleniya/termopreobrazovateli-soprotivleniya--tspm-1187/?mova=uk/Термопреобразователь>
4. <https://www.svaltera.ua/Электропневмопреобразитель-Dwyer>
5. <https://dilis.ua/p35746-datchik-steriliziruemyj-zahisnij.html>
6. <https://dilis.ua/p35735-promyshlennyj-metr-101p.html>
7. <https://vilitex.ru/products/gazoanalizatory-kislорода/chuvstvitelnye-elementy-datchiki-dlya-gazoanalizatorov-kislорода/>
8. <https://chastotnik.com.ua/Delta+Electronics-r-VFD007EL21A/Частотный-перетворювач>
9. <https://www.dozator.com.ua/products/dozator-vesovoj-avtomaticheskij-dlya-dozirovaniya-zhidkih>
10. http://knowkip.ucoz.ru/news/datchik_davlenija_bd_sensors_rus_dmp_331_pi_dlja_vjazkikh_i_v_ysokotemperaturnykh_sred/2013-12-04-108
11. <https://www.siemens-pro.ru/3rt20/3rt2015/3RT2015-1AP01.html/Магнитный-пускатель>
12. <https://www.tme.eu/ua/details/3sb3210-2da11/peremikachi-panelni-standartni-22mm/siemens/Перемикач>
13. <https://svalterakr.prom.ua/p356995547-knopki-lovato-electric.html/>

РОЗДІЛ 6. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

6.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.

Технологія синтезу комплексного мікробного препарату основі бактерій *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 включає в себе доферментаційні допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація титрувальних агентів, підготовку і стерилізацію поживних середовищ для одержання посівного матеріалу та приготування і стерилізацію поживного середовища для виробничого біосинтезу) та ферментаційні технологічні процеси (отримання посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

1. Санітарна підготовка виробництва.

Розрахунок загальної площі миття та дезінфекції проводять з врахуванням того, що отримання вторинних метаболітів штаму ІМВ В-7241 здійснюється протягом 30 робочих днів:

- підлогу миють кожного робочого дня (30 разів)
- апарати та комунікації перед кожним виробничим циклом та після останнього (всього – 7 циклів, разом 8 разів);
- стіни миють при генеральному прибиранні (перед початком виробництва) –1 раз.

Для миття апаратів передбачене використання каустичної соди, після миття миття розчин зливається до каналізації.

Для миття та дезінфекції поверхонь застосовується засіб «Славін», який теж подається до каналізації. *Даний етап підготовки виробництва є джерелом емісії рідких відходів.*

					НУХТ БТЕК 04.01.03 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Жданюк В.І.			Літ.	Арк.	Акрівців
Перевір.		Пирог Т.П.				136	169
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					
РОЗДІЛ 6. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ							

2. Приготування і стерилізація розчинів для титрування.

Слід приготувати 6% розчин хлоридної кислоти, який використовують для зниження рН до позначки 4,5 з метою уникнення випадання в осад солей фосфору.

А також слід передбачити приготування та стерилізацію 6% розчинів натрію гідроксиду для доведення рН до рівня 6,8-7, після стерилізації у посівних апаратах. Рідкі відходи можуть бути на даному етапі лише, якщо розчини не відповідають вимогам (а саме їх концентрації та мікробіологічна чистота). *Оскільки їх об'ємі є малими, такі титрувальні агенти можна не враховувати у об'ємі всіх рідких відходів.*

3. Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу.

У разі невідповідності сировини вимогам, вона має бути повернута постачальнику. На даному етапі твердими відходами є пакувальні матеріали від сировини, яку використовують для приготування поживного середовища. *Даний етап може бути місцем емісії твердих відходів.*

4. Підготовка посівного матеріалу.

Підготовка посівного матеріалу відбувається в кілька етапів, в колбах на качалках, в інокуляторі на 10 л, та інокуляторі на 100 л, після чого йде для засіву виробничого ферментера. Тому відходів на цих етапах немає. *A. calcoaceticus* є облигатним аеробом, тобто під час культивування слід передбачити безперервну подачу аераційного повітря, під час процесу культивування утворюються великі об'єми відпрацьованого повітря, що містить аерозолі із вмістом культуральної рідини, а також . *Даний етап є місцем емісії значних об'ємів газоповітряних відходів.*

5. Виробничий біосинтез.

Оскільки комплексний мікробний препарат використовують у вигляді культуральної рідини, рідких відходів на даному етапі немає. Відпрацьоване

повітря після виробничого ферментера також містить аерозолі культуральної рідини *A. calcoaceticus* та CO₂. *Даний етап теж є місцем емісії газоповітряних відходів.*

6.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

Розвиток економіки породжує екологічні проблеми: виснаження озонового шару Землі, глобальна зміна клімату внаслідок «парникового ефекту», забруднення атмосферного повітря та водойм.

Сучасна техніко-технологічна база промисловості не дозволяє здійснити на промислових підприємствах глибоке очищення повітря і води. Розробка нових технологічних процесів, на основі яких може бути створена безвідходне виробництво, забезпечить не тільки високі техніко-економічні показники, а й комплексне використання природних ресурсів. Однак, за технічних і економічних причин перехід до безвідходної технології відразу здійснити неможливо. Реальний шлях екологізації технології - це поступовий перехід спочатку до маловідходних, а потім - до «безвідходних» замкнутих циклів. Тим самим можуть бути досягнуті раціональне природокористування та охорона навколишнього середовища.

Поняття «повністю безвідходна технологія» умовне, оскільки жодне виробництво неможливе без відходів. Навіть природні кругові процеси супроводжуються утворенням відходів. Маловідходні та безвідходні технологічні процеси і системи повинні функціонувати таким чином, щоб не порушувати ходу процесів, що протікають в природі [161].

6.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.

Розрахунок загальної площі миття та дезінфекції проводять з врахуванням того, що отримання вторинних метаболітів штаму ІМВ В-7241 здійснюється протягом 30 робочих днів:

- підлогу миють кожного робочого дня (30 разів)
- апарати та комунікації перед кожним виробничим циклом та після останнього (всього – 7 циклів, разом 8 разів);

- стіни миють при генеральному прибиранні (перед початком виробництва) –1 раз.

При щоденному використанні протягом 30 днів 1 % розчину для дезінфекції та миття поверхонь під назвою «Славін», його витрати становлять 300,12 л, після миття розчин зливають до каналізації. За параметрами гострої токсичності по ГОСТ 12.1.007-76 належить до 3 класу помірно небезпечних сполук при введенні в шлунок і до 4 класу малонебезпечних - при нанесенні на шкіру; за ступенем летючості (пари) малонебезпечний. Протягом 30 трудоднів проводять одне генеральне прибирання.

Таблиця 6.1.

Характеристика рідких відходів у виробництві комплексного мікробного препарату

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм (м³) відходів на 1 цикл виробництва	Клас безпеки
1% Каустична сода	Гідроксид натрію	0,7	II
1% «Славін»	Глутаровий альдегід – 3%, ПГМГ гідрохлорид - 2,5%, алкілдиметилбензиламмоний хлорид - 2,5%, органічні кислоти, інгібітор корозії, стабілізатор, неіоногенні ПАВ	0,043	IV
	Усього:	0,743	

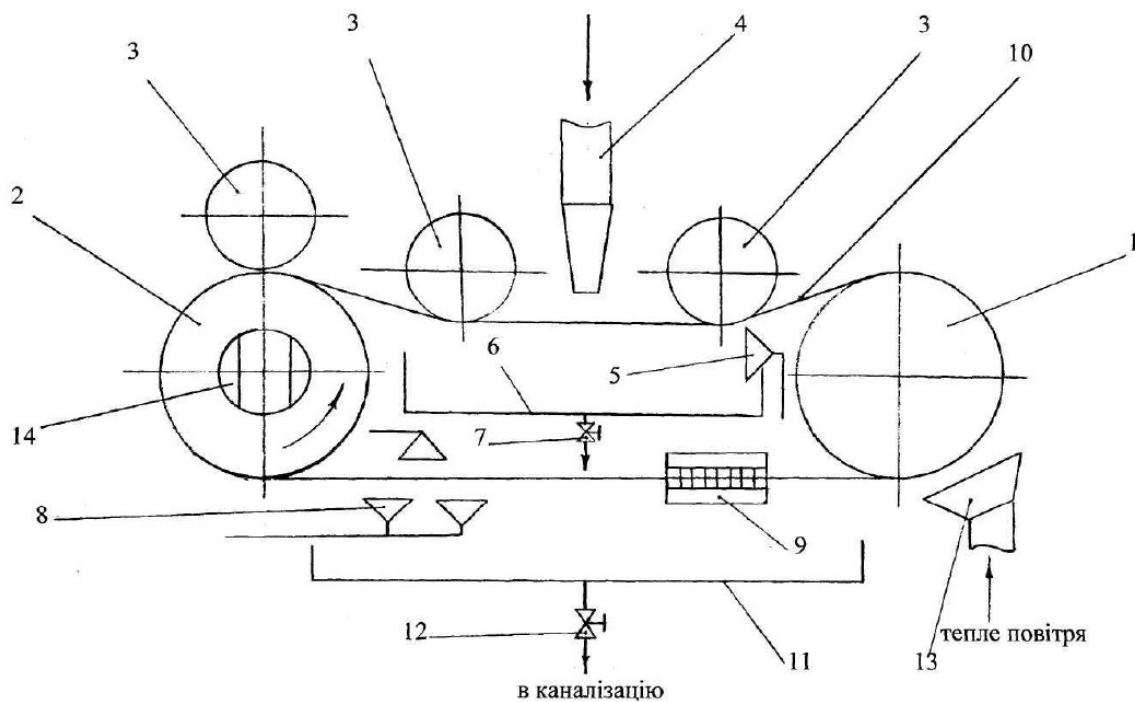


Рис. 6.1. Пристрій для очищення миючих та дезінфікуючих розчинів

Розроблений пристрій для очищення миючих та дезінфікуючих розчинів дозволяє проводити очищення як від механічних так і від домішок біологічного походження, значно підвищує ефективність очищення рідин а також виключає процес їх охолодження [163].

Пристрій працює наступним чином: відпрацьований розчин по патрубку 4 потрапляє на фільтрувальну стрічку 10, яка повільно рухається. Після проходження через фільтрувальну стрічку 10 очищена рідина потрапляє до лотка 6, де опромінюється ультрафіолетовою лампою, після чого відводиться по патрубку 7. Забруднена частина фільтрувальної стрічки 10 при надходженні до нижньої частини пристрою очищується за допомогою води, яка розпилюється на неї з форсунок 8 та щіток 9, які контактують з її поверхнею. При надходженні до барабану 1 стрічка потрапляє під струмінь гарячого повітря, яке надходить з розсіювача тепла 13. Забруднена вода, яка утворюється від чищення фільтрувальної стрічки, потрапляє до лотка 11 5 та по патрубку 12 відводиться з пристрою.

Перевагами запропонованого пристрою: простий у використанні; не потребує значних матеріальних затрат. За допомогою даного пристрою забезпечується якісне очищення рідин від домішок механічного та біологічного походження. Очищену рідину, отриману за допомогою розробленого пристрою, можна використовувати на різноманітні технічні потреби.

Даний пристрій було застосовано у дослідному господарстві ДПДГ "Кутузівка" Інституту тваринництва НААН Харківського району Харківської області для очищення миючих та дезінфікуючих розчинів [163].

6.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.

У вигляді твердих відходів представлені пакувальні матеріали і тара, від сировини, компонентів поживних середовищ, а також від миючих та дезінфікуючих розчинів, після етапів санітарної підготовки і підготовки поживних середовищ.

Оскільки кінцевим продуктом біосинтезу є безпосередньо культуральна рідина, то твердих відходів у вигляді біомаси продуцента не передбачається.

Таблиця 6.2.

Характеристика твердих відходів у виробництві комплексного мікробного препарату

Назва складової твердих відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм (кг) відходів на 1 цикл виробництва	Клас небезпеки
Пластик	Поліетилентерeftалат	1	II
Матеріал упакування компонентів поживного середовища	Поліетилен	0,25	III
	Картон	0,25	IV
	Усього:	1,5	

Утилізація твердих відходів.

Тару із поліетилентерефталату (ПЕТ) та поліетилен віддають на переробку однорідних за складом відходів, що передбачає збір, сортування і миття ПЕТ-ємностей, які після подрібнення, гранулювання, кристалізації і сушки можуть використовуватися для повторної переробки. Картон теж передається на повторну переробку до відповідних пунктів здачі [164].

6.2.3. Система знешкодження та утилізації газоповітряних відходів.

Розрахунок об'ємів відходів.

До газоподібних відходів, що утворюються на етапі отримання посівного матеріалу, виробничого біосинтезу відносять відпрацьоване аераційне повітря.

Тривалість вирощування посівного матеріалу (у двох інокуляторах) триває 48 год, а безпосередньо за виробничого біосинтезу – 96 год. При цьому аерація становить – $1 \frac{\text{л}}{(\text{л} \times \text{хв})}$. На виробництві використовують 3 ферментаційні апарати, тому об'єм відпрацьованого повітря становить:

$$2 \times (60 \times 55 \times 48) + 1 \times (60 \times 400 \times 96) = 2\,620\,800 \text{ л або } 2620,8 \text{ м}^3.$$

Таблиця 6.3

Характеристика газових відходів у виробництві комплексного мікробного препарату

Назва складової зазових відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм (м ³) відходів на 1 цикл виробництва	Клас небезпеки
Відпрацьоване повітря після ферментаційних процесів	Вуглекислий газ, аерозолі, що містять частку культуральної рідини	2620,8	IV
	Усього:	2620,8	

Утилізація газоповітряних відходів

Для знешкодження газоповітряних відходів може бути використана система очищення повітря для очищення промислових підприємств від аерозолів шкідливих домішок, перед викидом повітря у атмосферу.

Відома система фільтрації повітря, що містить послідовно установлені циклон і вугільний адсорбер. В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення системи фільтрації повітря шляхом того, що вугільний адсорбер розміщено безпосередньо у випускному патрубку циклона. Це забезпечує суттєве зменшення площини установки, металоємкості за рахунок використання корпусу випускного патрубку для установки вугільного адсорбера, усуває втрати тиску через відсутність каналу, що з'єднує циклон і вугільний адсорбер, і знижує вартість і ефективність роботи системи [165].

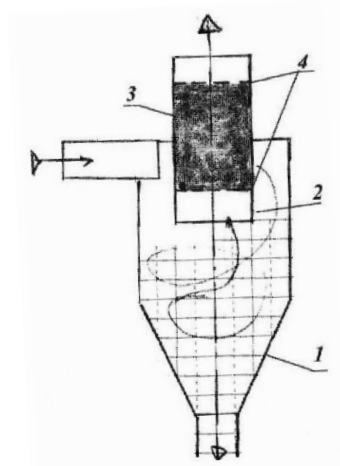


Рис . 6.2. Система фільтрації повітря

Система фільтрації повітря функціонує наступним чином: повітря, що фільтрується, надходить до циклону 1, де аерозолі (або шкідливі домішки) осаджуються на його бокові стінки під дією відцентрової сили. Потім потік повітря без додаткових втрат тиску направляється в вугільний адсорбер 3, який розташований безпосередньо в випускному патрубку 2, в якому завдяки сорбуючій здатності адсорберу, розташованого між обмежувачами сітками 4, очищується від залишків аерозолів (або шкідливих домішок). Таким чином, в

системі фільтрації зменшується площа установки, її металоемкість, втрати тиску і, тим самим, зменшується вартість системи і підвищується ефективність [165].

Отже, слід зробити висновок, що виробництво комплексного мікробного препарату з антимікробними і рістстимулювальними властивостями є безпечним для навколишнього середовища, адже не характеризується великими і токсичними викидами, за умови використання перелічених методів та присторої для утилізації усіх відходів.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що незалежно від концентрації і моменту внесення триптофану в середовище культивування як *R. erythropolis* IMB Ac-5017 та *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на усіх субстратах спостерігали значне підвищення (на два-три порядки) кількості синтезованих ауксинів порівняно з показниками на середовищі без попередника. Серед ауксинів виявлені індол-3-оцтова кислота (ІОК), індол-3-карбонова кислота, індол-3-масляна кислота, абсцизова кислота, проте найбільша кількість припадала на ІОК, попередником якої і є триптофан.

2. Найвища концентрація ауксинів досягалася при додаванні 300 мг/л триптофану у середовище культивування. Так, для *R. erythropolis* IMB Ac-5017 з етанолом концентрації були 5551.93– 5634.22 мкг/л, у той час як без попередника їх кількість становила всього 143.17 мкг/л. На відміну від культивування штаму IMB Ac-5017 на етанолі, де рівень синтезу ауксинів не залежав від моменту внесення триптофану, на відпрацьованій олії *R. erythropolis* IMB Ac-5017 утворював максимальну кількість ауксинів у разі внесення 300 мг/л триптофану саме в кінці експоненційної фази росту (2398.14 мкг/л порівняно з 9.85 мкг/л на середовищі без попередника).

Для *A. calcoaceticus* IMB B-7241 найвищі концентрації було досягнуто на середовищі з обома субстратами, штам синтезував 1404,73, 1295,04 та 4850,98 мкг/л ауксинів на гліцериновому середовищі за внесення 100, 200 та 300 мг/л триптофану в кінці експоненційної фази росту (а без попередника концентрація ауксинів становила всього 175,4 мкг/л).

3. Підвищений синтез ауксинів обох штамів корелював з активністю триптофантрансамінази.

					НУХТ БТЕК 04.01.03 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Жданюк В.І.			Літ.		Арк.	Акрівшів	
Перевір.		Пирог Т.П.			145	169			
Реценз.					РОЗДІЛ 6. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ Кафедра БТМ				
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

При культивуванні *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на технічному гліцерині без попередника вона становила $163 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білку, в той час як за наявності 300 мг/л триптофану, доданого в кінці експоненційної фази росту, підвищувалася у 3,2 рази (до $526 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білку).

Для *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 активність ферменту при культивуванні на етанолі без триптофану становила $138 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка, у той час як за наявності попередника підвищувалася у в 5,2 рази (до $714 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка). Одержані результати дають змогу припустити, що біосинтез ІОК у штаму ІМВ Ас-5017 відбувається через утворення індол-3-пірувату.

4. Результати досліджень вказують на можливість створення комплексного мікробного препарату з антимікробними і яскравими рістстимулювальними властивостями на основі *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

5. Опираючись на дані отримані експериментальним шляхом та техніко-економічний розрахунок, для забезпечення обробки комплексним мікробним препаратом засаджень перцю солодкого площею 79 га, річна потужність виробництва становить $2,26 \text{ м}^3$ культуральної рідини *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 упродовж 30 трудоднів.

6. Розроблено схему автоматизації ділянки підготовки та стерилізації поживного середовища, вирощування інокуляту. Збірник для приготування розчину солей обладнаний датчиком температури, рівня. Інокулятори, окрім датчиків рівня та тиску, температури, обладнані датчиками регуляції рН та розчиненого в середовищі кисню.

7. При виробництві комплексного мікробного препарату на основі *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 утворюються невеликі кількості відходів за 1 цикл виробництва. Рідкі відходи утворюються лише на етапі доферментаційних процесів, під час підготовки обладнання (розчини миючих та дезінфікуючих засобів), їх знешкодження відбувається завдяки фільтруванню та опроміненню УФ-променями. Тверді відходи виникають на етапі підготовки поживного середовища (пакувальний матеріал і тара), ПЕТ, поліетилен та картон слід

здавати на переробку. Очищення газових викидів відбувається фізичним методам очистки, повітря проходить через вугільний фільтр, що розміщений у циклоні.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Шевченко Л.А. Особливості застосування мікробного препарату поліміксобактерину в технології вирощування кукурудзи для оптимізації продукційного процесу культури. Рукопис дис. канд. сільськогосп. наук. Чернігів, 2019. 204 с.
2. Кириченко Е. В. Анализ рынка и создание микробных биопрепаратов для растениеводства в Украине. *Biotechnologia Acta*, 2015, 8(4): 40-52. <https://doi.org/10.15407/biotech8.04.040>.
3. Пирог Т.П., Леонова Н.О., Шевчук Т.А., Савенко И.В., Иутинкая Г.А. Синтез фитогормонов *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 – продуцентами поверхностно-активных веществ. *Известия Нац. акад. наук Беларуси*. 2016, 1:111-116.
4. Пирог Т.П., Гаврилкіна Д.В., Леонова Н.О., Іутинська Г.О., Шевчук Т.А. Синтез біологічно активних гіберелінів ГК4 і ГК7 мікроорганізмами. *Мікробіол. журн.* 2019; 81(2): 90-109. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.02.090>.
5. Havrylkina D.V., Leonova N.O., Pirog T.P. The influence of exometabolites *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 on yields of tomatoes and barley. *JAES*. 2019, 1(9): 1–8. doi: 10.23649/jae.2019.1.9.2.
6. Piatetska D.V., Leonova N.O., Pirog T.P., Klymenko N.O., Yield of tomatoes and peppers under the influence of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017. *JAES*, 2019, 3(11): 1–8. doi: 10.23649/jae.2019.3.11.4.
7. Pirog T.P., Iutynska G.O., Leonova N.O., Beregova K.A., Shevchuk T.A. Microbial synthesis of phytohormones. *Biotechnol. Acta*. 2018, 11(1): 5–24.
8. Пирог Т.П., Леонова Н.О., Шевчук Т.А., Савенко И.В., Иутинская Г.А. Вплив умов культивування продуцентів поверхнево активних речовин

- Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на синтез фітогормонів, *Наукові праці НУХТ*. 2017, 23(5): 15–22. doi: 10.24263/2225-2924-2017-23-5-1-4.
9. Naughton P.J., Marchant R., Naughton V., Banat I.M. Microbial Biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *J. Appl. Microbiol.* 2019, 127:12-28. doi:10.1111/jam.14243.
 - 10.Корецька Н.І. Біотехнологія поверхнево-активних продуктів штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1, властивості та застосування: дис. канд. техн. наук. Львів, 2020. 159 с.
 - 11.Rani M., Weadge J.T., Jabaji, S. Isolation and Characterization of Biosurfactant-Producing Bacteria From Oil Well Batteries With Antimicrobial Activities Against Food-Borne and Plant Pathogens. *Front. microbiol.* 2020, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.00064.
 - 12.Патика М. В., Колодяжний О.Ю. Формування мікробного комплексу чорнозему типового в агроценозі пшениці озимої за різних систем землеробства. *Вісн. Полтав. держ. аграр.акад.* 2014, 2: 24-33.
 - 13.Huiqing C., Qingxin L. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial Cell Fact.* 2017, 16:137. doi:10.1186/s12934-017-0753-2.
 - 14.David N. Dowling Fergal O'Gara. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* 1994, 12(4): 133-141. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90091-4).
 - 15.Perneel M., D'hondt L., De Maeyer K., Adiobo A., Rabaey K., Höfte M. Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp. *Environ. Microbiol.*, 2008, 10(3): 778–788. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01501.x.
 - 16.Choudhary K., Prakash A. Wray V. Johri B.N. Insights of the fluorescent *Pseudomonads* in plant growth regulation. *Curr. Sci.* 2009, 97(2): 170-179 p. <https://www.jstor.org/stable/24111913>.

17. Adetunji C. O., Oloke J., Mishra P. Ravinder Singh J., Kumar Singh A., Singh Cameotra S., Oluwasesan M.B. Characterization and optimization of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* C1501 with novel biosurfactant activities. *Sustain Chem. Pharm.* 2017, 6: 26–36. doi:10.1016/j.scp.2017.07.001.
18. Khare E, Arora NK. Biosurfactant based formulation of *Pseudomonas guariconensis* LE3 with multifarious plant growth promoting traits controls charcoal rot disease in *Helianthus annuus*. *World J. Microbiol Biotechnol.* 2021, 37(4):55. doi: 10.1007/s11274-021-03015-4.
19. Arifiyanto A., Surtiningsih T., Ni'matuzahroh F., Agustina D., Alami N.H. Antimicrobial activity of biosurfactants produced by actinomycetes isolated from rhizosphere of Sidoarjo mud region. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2020, 24. 101513. doi:10.1016/j.bcab.2020.101513.
20. Isha M., Tahmish F., Egamberdieva D., Egamberdieva D., Arora N. K. Novel Bioformulations Developed from *Pseudomonas putida* BSP9 and its Biosurfactant for Growth Promotion of *Brassica juncea* (L.). *Plants.* 2020, 9(10): 1349. DOI: 10.3390/plants9101349.
21. Sood U., Singh D. N., Hira P., Lee J.K., Kalia V. C., Lal R., Shakarad M. Rapid and solitary production of mono-rhamnolipid biosurfactant and biofilm inhibiting pyocyanin by a taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* strain CR1. *J. Biotechnol.* 2019, 307: 98-106. doi:10.1016/j.jbiotec.2019.11.004.
22. Chopra A., Bobate S., Rahi P., Banpurkar A., Mazumder P. B., Satpute S. *Pseudomonas aeruginosa* RTE4.: A Tea *Rhizobacterium* With Potential for Plant Growth Promotion and Biosurfactant Production. *Front. bioeng. biotechnol.* 2020, 8(861). doi: 10.3389/fbioe.2020.00861.
23. Deepika K.V., Ramu Sridhar P., Bramhachari P. Characterization and antifungal properties of rhamnolipids produced by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain KVD-HM52. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2015, 4(4): 608–615. doi:10.1016/j.bcab.2015.09.009.

24. Aleksic I., Petkovic M., Jovanovic M., Milivojevic D., Vasiljevic B., Nikodinovic-Runic J., Senerovic L. Anti-biofilm Properties of Bacterial Di-Rhamnolipids and Their Semi-Synthetic Amide Derivatives. *Front. microbiol.* 2017, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02454.
25. Aguirre-Noyola J.L, Romero Ramírez Y., Ruvalcaba Ledezma J. C., Forero Forero A. V, Rodríguez L.R., Toribio Jiménez J. Biosurfactants produced by metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from *Zea mays* rhizosphere and compost. *RIAA.* 2021, 12(1): 2145-6453. DOI: <https://doi.org/10.22490/21456453.3849>.
26. Chen J., Sun, J., Deering R. W., DaSilva N., Seeram N. P., Wang H., Rowley D. C. *Rhizoleucinoside*, a Rhamnolipid–Amino Alcohol Hybrid from the Rhizobial Symbiont *Bradyrhizobium* sp. BTAi1. *Org. Lett.* 2016, 18(6), 1490–1493. doi:10.1021/acs.orglett.6b00461.
27. Hildebrand P. D. Surfactant-like characteristics and identity of bacteria associated with broccoli head rot in Atlantic Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 1989, 11(3): 205–214. doi:10.1080/07060668909501101.
28. Osburn R. M., Schroth M. N., Hancock G., Hendson M. Dynamics of sugar beet seed colonization by *Pythium ultimum* and *Pseudomonas* species: effects on seed rot and damping-off. *Phytopathology.* 1989, 79:709– 716.
29. Nielsen T.H., Sorensen J. Production of Cyclic Lipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* Strains in Bulk Soil and in the Sugar Beet *Rhizosphere*. *AEM.* 2003, 69(2): 861–868. doi:10.1128/aem.69.2.861-868.2003.
30. Kuiper I., Lagendijk E.L., Jeremy R.P., Derrick Gerda E., M. Lamers Jane E., Thomas-Oates Ben J.J., Lugtenberg Guido V. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol.* 2004, 51(1): 97-113. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03751.x.
31. Rokni-Zadeh H., Li W., Sanchez-Rodriguez A., Sinnaeve D., Rozenski J., Martins J. C., Mot R. Genetic and Functional Characterization of Cyclic

- Lipopeptide White-Line-Inducing Principle (WLIP) Production by Rice Rhizosphere Isolate *Pseudomonas putida* RW10S2. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78(14): 4826-34. doi: 10.1128/AEM.00335-12.
32. Tran H., Kruijt M., Raaijmakers J.M. Diversity and activity of biosurfactant-producing *Pseudomonas* in the rhizosphere of black pepper in Vietnam. *J. Appl. Microbiol.* 2008, 104(3): 839-51. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03618.x.
33. Kruijt M, Tran H, Raaijmakers JM. Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *J. Appl. Microbiol.* 2009, 107(2): 546-56. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04244.x.
34. Perneel M., Heyrman J., Adiobo A., De Maeyer K., Raaijmakers J.M., De Vos P., Höfte M. Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent *Pseudomonas* strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity *J. Appl Microbiol.* 2007, 103(4): 1007-20. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03345.x.
35. Oni F.E., Geudens, N., Omoboye O.O., Bertier L., Hua H.G.K., Adiobo A. Höfte M. Fluorescent *Pseudomonas* and cyclic lipopeptide diversity in the rhizosphere of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*). *Appl. Environ. Microbiol.* 2019, doi:10.1111/1462-2920.14520 d.
36. Mohammadipour M., Mousivand M., Jouzani G.S. Abbasalizadeh S. Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Can. J. Microbiol.* 2009, 55(4): 395–404. doi:10.1139/w08-141.
37. Chen Q., Liu B., Wang J., Ch J., Liu G., Guan X. Antifungal Lipopeptides Produced by *Bacillus* sp. FJAT-14262 Isolated from Rhizosphere Soil of the Medicinal Plant *Anoectochilus roxburghii* . *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016, 182(1): 155–167. doi:10.1007/s12010-016-2317-z.

38. Abdallah D. B., Krier F., Jacques P., Tounsi S., Frikha-Gargouri O. *Agrobacterium tumefaciens* C58 presence affects *Bacillus velezensis* 32a ecological fitness in the tomato rhizosphere. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020, 27: 28429-28437. doi:10.1007/s11356-020-09124-1.
39. Singh A. K., Sharma, P. Disinfectant-Like Activity of Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Bacillus tequilensis* strain SDS21. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2020, 185 (110514) doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110514.
40. Madhurankhi G, Suresh D. Biosurfactant production by a rhizosphere bacteria *Bacillus altitudinis* MS16 and its promising emulsification and antifungal activity. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2019. 178: 285-296. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.03.003
41. Cao Y., Pi H., Chandransu P., Li Y., Wang Y., Zhou H. Cai Y. Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Sci. Rep*, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-22782-z.
42. Al-Ali A., Deravel J., Krier F., Béchet M., Ongena M., Jacques P. Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environ. Sci. Pollut. Res.* doi:10.1007/s11356-017-0469-1.
43. Kumar N., P., Swapna T. H., Sathi Reddy K., Archana K., Nageshwar L., Nalini S., Hameeda B. Draft Genome Sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* Strain RHNK22, Isolated from Rhizosphere with Biosurfactant (Surfactin, Iturin, and Fengycin) and Antifungal Activity. *Genome Announc.* 2016, 4(1): e01682-15. doi:10.1128/genomea.01682-15.
44. Franco-Sierra N. D., Posada L. F., Santa-María G., Romero-Tabarez M., Villegas-Escobar V., Álvarez J. C. *Bacillus subtilis* EA-CB0575 genome reveals clues for plant growth promotion and potential for sustainable agriculture. *Funct. Integr. Genomics.* 2020, 20(4): 575–589. doi:10.1007/s10142-020-00736-x.

45. Abdellaziz L., Chollet M., Abderrahmani A., Béchet M., Yaici L., Chataigné G., Jacques P. Lipopeptide biodiversity in antifungal *Bacillus* strains isolated from Algeria. *Arch. Microbiol.* 2018. 200: 1205–1216 doi:10.1007/s00203-018-1537-8.
46. Fan B., Wang C., Song X., Ding X., Wu L., Wu H., Borriss R. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-Positive Model Strain for Plant Growth Promotion and Biocontrol. *Front. Microbiol.* 2018, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.02491.
47. Chen Q., Liu B., Wan J., Che J., Liu G., Guan X. Antifungal Lipopeptides Produced by *Bacillus* sp. FJAT-14262 Isolated from Rhizosphere Soil of the Medicinal Plant *Anoectochilus roxburghii*. *Appl. Biochem. Biotech.* 2017, 182(1): 155–167. doi:10.1007/s12010-016-2317-z .
48. Kwon J.W., Kim S.D. Characterization of an Antibiotic Produced by *Bacillus subtilis* JW-1 that Suppresses *Ralstonia solanacearum* *J. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 24(1): 13–18. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1308.08060>.
49. Xiong H., Li Y., Cai Y., Cao Y., Wang Y. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* JK6 and identification of its lipopeptides surfactin for suppressing tomato bacterial wilt. *RSC Advances.* 2015, 5: 82042–82049. DOI: 10.1039/c5ra13142a.
50. Голобородько С.П., Іути́нська Г.О., Тітова Л.В. Продуктивність сортів сої за інокуляції насіння бульбочковими і ендоефітними бактеріями в умовах зрошення півдня України. *Меліорація і водне господарство.* 2020, 1. doi.org/10.1073/mivg2020001-221.
51. Ashitha A., Radhakrishnan E.K, Jyothis M. Characterization of biosurfactant produced by the endophyte *Burkholderia* sp. WYAT7 and evaluation of its antibacterial and antibiofilm potentials. 2020. 313:1-10. *J. Biotechnol.* doi:10.1016/j.jbiotec.2020.03.005
52. Kumar A., Munder A., Aravind R., Eapen S. J., Tümmler B., Raaijmakers, J.M. Friend or foe: genetic and functional characterization of plant endophytic

- Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 2013. 15(3): 764–779. doi:10.1111/1462-2920.12031.
53. Zhang X., Liu X., Wang Q., Chen X., Li H., Wei J., Xu G. Diesel degradation potential of endophytic bacteria isolated from *Scirpus triqueter*. *Int. Biodeter. Biodegr.* 2014, 87, 99–105. doi:10.1016/j.ibiod.2013.11.007
54. Karnwal A. Use of Bio-Chemical Surfactant Producing Endophytic Bacteria Isolated from Rice Root for Heavy Metal Bioremediation. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 2018, 41 (2): 699 – 714.
55. Ma Z., Liu J., Dick R.P., Li H., Shen D., Gao Y., Ling W. Rhamnolipid influences biosorption and biodegradation of phenanthrene by phenanthrene-degrading strain *Pseudomonas* sp. Ph6. *Environ. Pollut.* 240: 359–367. doi:10.1016/j.envpol.2018.04.125
56. Bechard J., Eastwell K. C., Sholberg, G., Skura M., Skura B. Isolation and Partial Chemical Characterization of an Antimicrobial Peptide Produced by a Strain of *Bacillus subtilis*. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46(12): 5355–5361. <https://doi.org/10.1021/jf9803987>
57. Soo J., Sang R., Min K., Woo J., Sung K., Chang L., Su Y., Young H., Seon G., Yong U. Endophytic *Bacillus* sp. Isolated from the Interior of Balloon Flower Root, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002, 66(6): 1270-1275, DOI: 10.1271/bbb.66.1270
58. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Rodriguez-Kabana R., Kloepper J.W. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil. Biol. Biochem.* 1998. 30: 925–937.
59. Asraful Islam S.M., Math R.K., Kim J.M., Yun M.G., Cho J.J., Kim E.J., Yun H.D. Effect of Plant Age on Endophytic Bacterial Diversity of Balloon Flower (*Platycodon grandiflorum*) Root and Their Antimicrobial Activities. *Curr. Microbiol.* 2010, 61(4): 346–356. doi:10.1007/s00284-010-9618-1.
60. Chlebek D, Pinski A, Żur J, Michalska J, Hupert-Kocurek K. Genome Mining and Evaluation of the Biocontrol Potential of *Pseudomonas*

- fluorescens* BRZ63, a New Endophyte of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) against Fungal Pathogens. *Int J. Mol. Sci.* 2020, 21(22):8740. doi: 10.3390/ijms21228740.
61. Akinsanya M.A., Goh Y.K., Ting A.S. UPLC-MS analysis of characterization of bioactive compounds produced by endophytic *Bacillus tequilensis* ALR-2 from *Aloe vera*. *BioRxiv.* 2020, 21768. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.23.217687>
62. Guo DL, Wan B, Xiao SJ, Allen S, Gu YC, Ding LS, Zhoua Y. Cyclic Lipopeptides with Herbicidal and Insecticidal Activities Produced by *Bacillus clausii* DTM1. *Nat. Prod. Commun.* 2015 (12): 2151-3.
63. Daungfu O., Youpensuk S., Lumyong S. Endophytic Bacteria Isolated from Citrus Plants for Biological Control of Citrus Canker in Lime Plants. *Trop. Life Sci. Res.* 2019 30(1), 73–88. doi:10.21315/tlsr2019.30.1.5.
64. Toral L., Rodríguez M., Béjar V., Sampedro I. Antifungal Activity of Lipopeptides From *Bacillus* XT1 CECT 8661 Against *Botrytis cinerea*. *Front. Microbiol.* 2018, doi:10.3389/fmicb.2018.01315.
65. Blacutt A. A., Mitchell T. R., Bacon C. W., Gold S. E. *Bacillus mojavensis* RRC101 Lipopeptides Provoke Physiological and Metabolic Changes During Antagonism Against *Fusarium verticillioides*. *Molec. Plant. Micr. Interact.* 2016, 29(9): 713–723. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-16-0093-R>
66. Soussi S., Essid R., Hardouin J., Gharbi D., Elkahoui S., Tabbene O., Limam F. Utilization of Grape Seed Flour for Antimicrobial Lipopeptide Production by *Bacillus amyloliquefaciens* C5 Strain. *Appl. Biochem. Biotech.* 2018, doi:10.1007/s12010018-2885-1.
67. Marchut-Mikołajczyk O., Drożdżyński P., Polewczyk A. Smulek, Antczak T. Biosurfactant from endophytic *Bacillus pumilus* 2A: physicochemical characterization, production and optimization and potential for plant growth promotion. *Microb. Cell Fact.* 2021, 20(40). doi.org/10.1186/s12934-021-01533-2.

68. Wu Xu J., Xie W., Yao Z., Yang H., Sun C., Li X. *Pseudomonas aeruginosa* L10: A Hydrocarbon-Degrading, Biosurfactant-Producing, and Plant-Growth-Promoting Endophytic Bacterium Isolated From a Reed (*Phragmites australis*). *Front. Microbiol.* 2018, 9:1087. doi: 10.3389/fmicb.2018.01087.
69. Мошинець О. В., Косаківська І. В. Екологія фітосфери: рослинно-мікробні взаємовідносини. Структурно-функціональна характеристика ризо-, ендо- та фітосфери. 2010, *Вісник ХНАУ*. 2010, 2 (20): 19-35.
70. Toure Y., Ongena M., Jacques P., Guiro A., Thonart P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.*, 96(5), 1151–1160. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x.
71. Sholberg P.L., Marchi A., Bechard J. Biocontrol of postharvest diseases of apple using *Bacillus* spp. isolated from stored apples. *Can. J. Plant Pathol.* 1995, 41(3), 247–252. doi:10.1139/m95-034.
72. Nihorimbere V., Ongena M., Smargiassi M., Thonart P. Focus on: Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2011.15(2): 327-337.
73. Mora I., Cabrefiga J., Montesinos E. Cyclic Lipopeptide Biosynthetic Genes and Products, and Inhibitory Activity of Plant-Associated *Bacillus* against Phytopathogenic Bacteria. *PLOS ONE*. 2015, 10(5). doi:10.1371/journal.pone.0127738 .
74. Dimkić I., Živković S., Berić T., Ivanović Ž., Gavrilović V., Stanković S., Fira D. Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biol. Conserv.* 2013. 65(3), 312–321. doi:10.1016/j.biocontrol.2013.03.012 .
75. Grady E.N., MacDonald J., Ho M.T. Weselowski B., McDowell T., Solomon O., Renaud J., Yuan Z.-C. Characterization and complete genome analysis of

- the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiol.* 2019, 19(5). <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8>.
76. Andric S., Meyer T., Rigolet A., Arias A.A., Steels S., Hoff G., Höfte, René De Mot M., McCann A., De Pauw E., Ongena M. Chelator sensing and lipopeptide interplay mediates molecular interspecies interactions between soil Bacilli and Pseudomonads. *Bio. Rxiv.* 2021, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.22.432387>
77. Abdallah Y., Yang, M., Zhang M., Masum M.M. I., Ogunyemi S.O., Hossain, A., Bin, L. Plant growth promotion and suppression of bacterial leaf blight in rice by *Paenibacillus polymyxa* Sx3. *Lett. Appl. Microbiol.* 2019, 68(5). doi:10.1111/lam.13117.
78. Zihalirwa Kulimushi P, Argüelles Arias A, Franzil L, Steels S and Ongena M. Stimulation of Fengycin-Type Antifungal Lipopeptides in *Bacillus amyiloliquefaciens* in the Presence of the Maize Fungal Pathogen *Rhizomucor variabilis*. *Front. Microbiol.* 2017, 8: 850. doi: 10.3389/fmicb.2017.00850.
79. Penha R.O., Vandenberghe L.P.S., Faulds C., Socol V.T., Socol C.R. *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. *Planta.* 2020. 251:70 <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03357-7>.
80. Beiranvand M., Amin M., Hashemi-Shahraki A., Romani, B., Yaghoobi S., Sadeghi P. Antimicrobial activity of endophytic bacterial populations isolated from medical plants of Iran. *Iran. J. Microbiol.* 2017. 9(1): 11–18.
81. Hazarika D. J., Goswami G., Gautam, T., Parveen A., Das P., Barooah M., Boro R.C. Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. *BMC Microbiol.* 2019. 19(1). doi:10.1186/s12866-019-1440-8 .
82. Kushwaha P., Kashyap P. L., Srivastava A. K., Tiwari R. K. Plant growth promoting and antifungal activity in endophytic *Bacillus* strains from pearl

- millet (*Pennisetum glaucum*). *Braz. J. Microbiol.* 2019, doi:10.1007/s42770-019-00172-5.
83. Shalini D., Benson A., Gomathi R., John Henry A., Jerritt S., Melvin Joe M. Isolation, characterization of glycolipid type biosurfactant from endophytic *Acinetobacter* sp. ACMS25 and evaluation of its biocontrol efficiency against *Xanthomonas oryzae*. *ISBAB.* 2017,11, 252–258. doi:10.1016/j.bcab.2017.07.013
84. Li F.-Z., Zeng Y.-J., Zong M.-H., Yang J.-G., Lou W.-Y. Bioprospecting of a novel endophytic *Bacillus velezensis* FZ06 from leaves of *Camellia assamica*: production of three groups of lipopeptides and the inhibition against food spoilage microorganisms. *Biotechnol. J.* 2020, doi:10.1016/j.jbiotec.2020.07.021.
85. Singh A. K., Sharma P. Disinfectant-Like Activity of Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Bacillus tequilensis* strain SDS21. *Colloids Surf. B:* 2019. 110514. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110514.
86. Arifiyanto A., Surtiningsih T., Ni'matuzahroh F., Agustina D., Alami N.H. Antimicrobial activity of biosurfactants produced by actinomycetes isolated from rhizosphere of Sidoarjo mud region. *ISBAB*, 2020. 101513. doi:10.1016/j.bcab.2020.101513.
87. Chen L., Shi H., Heng J., Wang D., Bian K. Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. *Microbiol. Res.* 2019. 218: 41–48. doi:10.1016/j.micres.2018.10.002.
88. Жатова Г. О. Особливості ризосферної мікробіоти лікарських рослин *Вісник CHAU.* 2019, 4(38): 62-66. <http://repo.snau.edu.ua:8080/xmlui/handle/123456789/8566>
89. Парфенюк А.І., Волощук Н.М. Формування фітопатогенного фону в агрофітоценозах. *Агроекологічний журнал.* 2016. 4: 106-112.
90. Guevara-Avenidaño E., Carrillo J. D., Ndinga-Muniania C., Moreno K., Méndez-Bravo A., Guerrero-Analco J. A., Reverchon, F. Antifungal activity

- of FJado rhizobacteria against *Fusarium euwallaceae* and *Graphium* spp., associated with *Euwallacea* spp. nr. *forficatus*, and *Phytophthora cinnamomic*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2017, 111(4): 563–572. doi:10.1007/s10482-017-0977-5.
91. Fan H., Ru J., Zhan Y., Wang Q., Li Y. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiol. Res.* 2017, 199, 89–97. doi:10.1016/j.micres.2017.03.004.
92. Castro D., Torres M., Sampedro I., Martínez-Checa F., Torres B., Béjar, V. Biological Control of *Verticillium* Wilt on Olive Trees by the Salt-Tolerant Strain *Bacillus velezensis* XT1. *Microorganisms*. 2020, 8(7): 1080. doi:10.3390/microorganisms8071080.
93. Ravi A., Thazhe Nandayipurath V. V., Rajan S., Asma Salim S., Khalid N. K., Aravindakumar C. T., Edayileveetil Krishnankutty R. Effect of zinc oxide nanoparticle supplementation on the enhanced production of surfactin and iturin lipopeptides of endophytic *Bacillus* sp. Fcl1 and its ameliorated antifungal activity. *Pest Manag. Sci.* 2020, 77(2): 1035-1041 doi:10.1002/ps.6118 /
94. Nigris S., Baldan E., Tondello A. Biocontrol traits of *Bacillus licheniformis* GL174, a culturable endophyte of *Vitis vinifera* cv. Glera. *BMC Microbiol* 2018. 18:133. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1306-5>.
95. Chen L., Wu Y., Chong X., Xin Q., Wang D., Bian, K. Seed-borne endophytic *Bacillus velezensis* LHSB1 mediate the biocontrol of peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*. *J. App. Microbiol.* doi:10.1111/jam.14508.
96. Malviya D., Sahu, P. K., Singh U. B., Paul S., Gupta A., Gupta A.R., Brahmaprakash G. P. Lesson from Ecotoxicity: Revisiting the Microbial Lipopeptides for the Management of Emerging Diseases for Crop Protection. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2020, 17(4): 1434. doi:10.3390/ijerph17041434.

97. Saleh D., Jarry J., Rani M., Aliferis K.A., Seguin P., Jabaji S.H. Diversity, distribution and multi-functional attributes of bacterial communities associated with the rhizosphere and endosphere of timothy (*Phleum pratense L.*). *J Appl Microbiol.* 2019, 127(3): 794-811. doi: 10.1111/jam.14334.
98. Hallmann V., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F., Kloepper J.W. Endophytic Bacteria in Agricultural. *Can. J. Microbiol.* 2011, 43(10): 895-914 DOI:10.1139/m97-131.
99. Kurth C., Schieferdecker S., Athanasopoulou K., Seccareccia I., Nett M. Variochelins. Lipopeptide Siderophores from *Variovorax boronicumulans* Discovered by Genome Mining. *J Nat. Prod.* 2016, 79(4):865-72. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00932.
100. Gond, S.K.; Bergen, M.S.; Torres, M.S.; White, J.F., Jr. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiol. Res.* 2015, 172, 79–87.
101. Sabaté D.C., Brandan C.P, Petroselli G., Erra-Balsells R., Audisio M.C. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. *Microbiol Res.* 2018, 211: 21-30. doi: 10.1016/j.micres.2018.04.003.
102. Chandra S, Askari K, Kumari M. Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *J Genet Eng Biotechnol* . 2018, 16(2):581–6.
103. Hasuty A, Choliq A, Hidayat I. Production of Indole Acetic Acid (IAA) by *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* and *Rhodococcus aff. qingshengii*. *IJAT.* 2018, 14(3): 299–312.
104. Liu WH, Chen FF, Wang CE, Fu HH, Fang XQ, Ye JR, et al. Indole-3-Acetic Acid in *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007: Enzymatic Identification of the Indole-3-Acetamide Synthesis Pathway. *Front Microbiol.* 2019, 10:2559.

105. McClerklin SA, Lee SG, Harper CP, Nwumeh R, Jez JM, Kunkel BN. Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase-dependent auxin synthesis contributes to virulence of *Pseudomonas syringae* strain DC3000. *PLoS Pathog.* 2018, 14(1):e1006811.
106. Shim J, Kim J., Shea PJ, Oh BT. IAA production by *Bacillus* sp. JH 2-2 promotes Indian mustard growth in the presence of hexavalent chromium. *J. Basic Microb.* 2015, 55(5): 652-8.
107. Dasri K, Kaewharn J, Kanso S, Sangchanjirader S. Optimization of indole-3-acetic acid (IAA) production by rhizobacteria isolated from epiphytic orchids. *APST.* 2014, 19: 268–75.
108. Kumari S, Prabha C, Singh A, Kumari S, Kiran S. Optimization of indole-3-acetic acid production by diazotrophic *B. subtilis* DR2 (KP455653), isolated from rhizosphere of *Eragrostis cynosuroides*. *Int J Pharm Med Bio Sci.* 2018, 7(2): 20–7.
109. Tsavkelova E, Oeser B, Oren-Young L, Israeli M, Sasson Y, Tudzynski B, et al. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. *Fungal Genet Biol.* 2012, 49(1): 48–57.
110. Gang S, Sharma S, Saraf M, Buck M, Schumacher J. Analysis of Indole-3-acetic Acid (IAA) Production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski Method. *Bio-protocol.* 2019, 9(09):e3230.
111. Gang S, Saraf M, Waite CJ, Buck M, Schumacher J. Mutualism between *Klebsiella* SGM 81 and *Dianthus caryophyllus* in modulating root plasticity and rhizospheric bacterial density. *Plant and soil.* 2018, 424(1–2): 273–88.
112. Guo D, Kong S, Chu X, Li X, Pan H. De novo Biosynthesis of Indole-3-acetic acid in Engineered *Escherichia coli*. *J Agr Food Chem.* 2019, 67(29): 8186–90.

113. Nutaratat P, Monprasit A, Srisuk N. High-yield production of indole-3-acetic acid by *Enterobacter* sp. DMKU-RP206, a rice phyllosphere bacterium that possesses plant growth-promoting traits. *Biotechnol.J.* 2017, 7(5):305.
114. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. (2010), *Інтенсифікація технологій мікробного синтезу*. Київ. 327 с.
115. Pirog T, Leonova N, Shevchuk T, Savenko I, Iutinska G, [Synthesis of phytohormones bacteria of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 – producers of surface-active substances]. In: Proceedings of National Academy of Sciences of Belarus. Biological series, 1, 2016, p. 90–5. Russian.
116. Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T. Intensification of surfactants synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium. *Food Bioprod. Process.* 2013, 91(2): 149-157.
117. Collier RH, Kohlhaw G. Nonidentity of the aspartate and the aromatic aminotransferase components of transaminase A in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol. Res.* 1972, 112(1): 365–71.
118. Zhou J. J., Shen J. T., Jiang L. L., Sun Y. Q., Mu Y., Xiu Z. L. (2017), Selection and characterization of an anaerobic microbial consortium with high adaptation to crude glycerol for 1,3-propanediol production, *Applied Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101: 5985–5996. doi: 10.1007/s00253-017-8311-8
119. Пирог Т.П., Савенко І.В., Шевчук Т.А. Антимікробні властивості поверхнево-активних речовин, синтезованих в різних умовах культивування *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, *Мікробіол. журн.* 2016, 78(3): 2–12.
120. Pirog TP, Konon AD, Sofilkanich AP, Iutinskaia GA. Effect of surface-active substances of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus*

- erythropolis* IMV Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* K-8 on phytopathogenic bacteria. *Appl Biochem Microbiol.* 2013, 49(4): 360–7.
121. Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, Varshney RK, Gowda CL, Krishnamurthy L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *Biotechnol. J.* 2015, 5(4): 355–77.
122. Пирог Т.П., Леонова Н.О, Шевчук Т.А., Панасюк Е.В., Берегова Х.А, Іутинська Г.А. Синтез фітогормонів продуцентом поверхностно-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMV В-7405. *Мікробіол. журн.* 2015, 77(6): 21–30.
123. Paswa-Płociniczak M, Płociniczak T, Iwan J, Żarska M, Chorążewski M, Dzida M, Piotrowska-Seget Z. Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits. *J. Environ Manag.* 2016, 168: 175–84.
124. Пирог Т.П., Софилканич Л.П., Покора К.А, Шевчук Т.А. Іутинська Г.О. Синтез поверхностно-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 на промислових відходах. *Мікробіол., журн.* 2014, 76(2): 17-23
125. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Іутинська Г.О. Синтез поверхностно-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* IMB AC-5017 в середі з глицерином. *Мікробіол. журн.*, 2012, 74(1) с. 20-27.
126. Пирог Т.П., Антонюк, С.І. Шулякова, М.О. Мучник, Ф.В. Гліцерин як субстрат для синтезу ПАВ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241. *Наукові праці НУХТ.* 2012, 45: 17-21.
127. Feng Z., Hao J., Huichun S., Chang L., Siqin H., Ying Z. Production of rhamnolipids with different proportions of mono-rhamnolipids using crude glycerol and a comparison of their application potential for oil recovery from oily sludge. *J. RSC Adv.*, 2019, 9: 2885-2891. DOI: 10.1039/C8RA09351B.

128. Salazar-Bryama A.M., Lovagliob R.B, Contiero J. Biodiesel byproduct bioconversion to rhamnolipids: Upstream aspects. *J. Heliyon*, 2017, 3(6): e00337. doi:10.1016/j.heliyon.2017.e00337.
129. Das A.J., Kumar R. Bioremediation of petroleum contaminated soil to combat toxicity on *Withania somnifera* through seed priming with biosurfactant producing plant growth promoting rhizobacteria. *J. Environ. Manage.* 2016, 174(1):79-86. doi:10.1016/j.jenvman.2016.01.031.
130. Das A.J., Kumar R. Utilization of Agro-industrial Waste for Biosurfactant Production under Submerged Fermentation and its Application in Oil Recovery from Sand Matrix. *Bioresour. Technol.* 2018. 260: 233-240. doi:10.1016/j.biortech.2018.03.093.
131. Mogilnaya O., Rud, V., Khareba, O., Horova, T., Kuts, O., Terokhina, L. Priority of scientific directions of software manufacturing of small views of vegetable plants in Ukraine. *Vegetable and Melon Growing*, 2018, 64, 75-88. <https://doi.org/10.32717/0131-0062-2018-64-75-88>.
132. Прокопенко О. Рослинництво України 2018. Статистичний збірник. Державна служба статистики України. Київ, 2019, 220 ст. <http://www.ukrstat.gov.ua/>
133. Ніколаєва А. М. Вплив погодних умов на формування врожайності солодкого перцю в степовій зоні України. Матеріали III Міжнародної науково-практична конференція «Наукові засади підвищення ефективності сільськогосподарського виробництва» (Харків, ХНАУ ім. В.В. Докучаєва, 23-24 жовтня 2017) С. 104-106.
134. Укрінформ. Електронний ресурс // Режим доступу : <https://www.ukrinform.ua/rubric-regions/2519131-na-hersonsini-virostili-rekordnu-plantaciu-solodkogo-percu.html>.
135. Калайда К., Заболотна О., Пиркало В. Господарсько-товарознавча оцінка сортів перцю солодкого, районованих в Україні. Дослідження якості харчових продуктів. *Міжнародний науково-практичний журнал*

- "Товари і ринки" з технічних та економічних наук . 2018, 2: 110-120.
doi: [https://doi.org/10.31617/tr.knute.2018\(26\)11](https://doi.org/10.31617/tr.knute.2018(26)11).
136. Дубініна А.А., Летута Т.М., Фролова Т.В., Сібірякова К.С. Обґрунтування застосування екстрактів із рослинної сировини під час зберігання плодів перцю. *Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі, ХДУХТ*. 2018, 2(28): 238-261.
137. Патица В. П., Пасічник Л. А. Фітопатогенні бактерії: фундаментальні і прикладні аспекти. *Вісник Уманського національного університету садівництва*. 2014, 2: 7-11.
138. Берегова Х.А., Сидор І.В., Никитюк Л.В., Пирог Т.П. Порівняльна характеристика поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 і препарату Фітолавін як засобів від бактеріозів. *Наукові праці НУХТ*. 2018, (24)2: 26-33. DOI: 10.24263/2225-2924-2018-24-2-5
139. Поспєлова Г.Д. Системні підходи до біозахисту лікарських рослин від фітофагів та їх забезпечення. Лікарське рослинництво: від досвіду минулого до новітніх технологій: матеріали шостої міжнародної науково-практичної конференції, (26-27 грудня 2017 р., м. Полтава - Лубни: Комунальне видавництво «Лубни», 2018 р.) С.89-94.
140. Штомпель О.І. Пошук регуляторів росту рослин серед похідних п'яти-та шестичленних азагетероциклів. Автореферат дисертації канд. біол. наук. Київ, 2019. с.162.
141. Перерва В.В., Шкабара А. Вивчення впливу концентрацій β -індолілоцтової кислоти за допомогою рослинних тест-об'єктів *Zbiór raportów naukowych*. „Nauka dziś: teoria, metodologia, praktyka, problematyka„. (Warszawa, 30.07.2014 - 31.07.2014 р.) Wydawca: Sp. z o.o. «Diamond trading tour», 2014. С. 21-22.
142. [Електронний ресурс] Густота посадки перцю солодкого // Режим доступу: <https://ukrsemena.com/ua/articles/sladkiy-perets->

[44994/#:~:text=її%20висаджують%20у%20фазі%205,на%20га.](#)

143. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Мащенко О.Ю. Пути повышения биоконверсии технического глицерина в поверхностно-активные вещества *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Мікробіол. журн.*, 2015, 77(1): 8-14.
144. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. К.: НУХТ, 2010. 623 с.
145. Данилов І. П. Апарати мікробіологічної промисловості. Харків : НТУ "ХПІ", 2008. с. 99-101.
146. Пирог, Т.П. Загальна біотехнологія: підручник / К. :НУХТ.2009. 336 с.
147. Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001 №502.
148. Каустична сода. Інструкція [Електронний ресурс]: <https://www.systopt.com.ua/ru/article-kaustycheskaya-soda-dlya-dezynfekcyu>;
149. Еклін-Софт Інструкція [Електронний ресурс]: https://www.mpi-dpr.com.ua/ru/blog/16_eklin-soft-metodichni-vkazivki.html#.X7AAqRZR2Mr
150. Славін. Методичні рекомендації [Електронний ресурс]: <https://sigma-med.ru/images/manuals/slavin>
151. Фамідез комбі. Методичні рекомендації [Електронний ресурс]: <https://desomark.com.ua>
152. [Електронний ресурс] Державна митна служба України. Про класифікацію гліцерину сирого технічного рослинного походження, гліцерину сирого // Режим доступу : https://www.ts.lica.com.ua/b_text.php?type=3&id=515908&base=1.
153. [Електронний ресурс] ГОСТ 6823-2017. Глицерин натуральний

- сырой. Общие технические условия. 2018. // Режим доступа : <http://docs.cntd.ru/document/1200146147>.
154. [Электронный ресурс] Tryptophan. Химия и токсикология // Режим доступа : <http://chemister.ru/Database/properties.php?dbid=1&id=30>.
155. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. К.: НУХТ, 2019. с. 144, 157-158.
156. Красінько В.О., Белемець Т.О. Біологія клітин [Електронний ресурс]. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навчання К.: НУХТ, 2018. с. 50, 51,
157. Encyclopedia, Regnum prokaryotae [Електронний ресурс]. Режим доступа: <https://tgw1916.net/Acinetobacter/calcoaceticus.html>
158. Hosková M., Jezdík R., Schreiberová O., Chudobab J., Chudoba J., Šír M., Čejková A., Masák J., Jirků V., Řezanka T. Structural and physiochemical characterization of rhamnolipids produced by *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae* and *Pseudomonas aeruginosa* in single strain and mixed cultures, *J. Biotechnol.* 2015, 193: 45–51. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.11.014.
159. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ. *Приклад. биох. микробиол.* 2009, 45(3):304-310.
160. Lopar M, Špoljarić IV, Cepanec N, Koller M, Braunegg G, Horvat P. Study of metabolic network of *Cupriavidus necator* DSM 545 growing on **glycerol** by applying elementary flux modes and yield space analysis. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 2014, 41(6): 913–930. DOI: 10.1007/s10295-014-1439-y
161. Yang H., He O., Hu C. Feasibility of biodiesel production and CO₂

- emission reduction by *Monoraphidium dybowskii* LB50 under semi-continuous culture with open raceway ponds in the desert area. *Biotechnol Biofuels*. 2018; 11: 82. doi: 10.1186/s13068-018-1068-1.
162. Пашкевич М. С., Паламарчук Т. О. Екологізація виробництва підприємств України . Ефективна економіка, 2012. 12.
163. Патент України на винахід № 70830. Пристрій для очищення миючих та дезінфікуючих розчинів / Палій А.П., Палій А.П. Опубл. 25.06.2012. Бюл. № 12. <https://uapatents.com/4-70830-pristriij-dlya-ochishhennya-miyuchikh-ta-dezinfikuyuchikh-rozchiniv.html>.
164. Сирохман І.В. Товарознавство пакувальних товарів і тари— К.: Центр учбової літератури, 2009. — 616 с.
165. Патент України на винахід №: 46063. Система фільтрації повітря/ Коваленко А.О., Андрійчук Г.В., Криниця В.І., Гусенцова Є.С., Дейнека І.Г., Соколов В.І. Опубліковано:10.12.2009. Бюл. № 23. <https://uapatents.com/4-70830-pristriij-dlya-ochishhennya-miyuchikh-ta-dezinfikuyuchikh-rozchiniv.html>

ДОДАТКИ

Апробація результатів науково-дослідної роботи

Статті у журналах:

1. Пирог Т.П., Леонова Н.О., П'ятецька Д.В., Клименко Н.О., Жданюк В.І., Шевчук Т.А. Індукція синтезу ауксинів *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 при додаванні триптофану в середовище культивування // *Mikrobiol. Z.* 2020, 82(6): 3-12.

Тези у збірниках міжнародних та всеукраїнських конференцій:

1. Жданюк В.І., Пятецкая Д.В., Пирог Т.П., Леонова Н.О. Образование ауксинов штаммами *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 на среде с пищевыми отходами // «85 научно-техническая конференция профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов Белорусского государственного технологического университета (с международным участием)»(г. Минск, 1-13 февраля 2021 г.) С.305-307.
2. Пятецкая Д.В., Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Жданюк В.І., Леонова Н.О. Роль индол-3-пируватного пути в биосинтезе ауксинов у *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405. XXIV международная научно-практическая конференция, посвященная 70-летию образования университета «Современные технологии сельскохозяйственного производства» (г. Гродно Республика Беларусь, 23 марта, 2021 г.) С.188-190
3. Piatetska D., Zhdanyuk V., Pirog T. Activity of tryptophan transaminase of *Rhodococcus erythropolis* IMV AC-5017 under the influence of tryptophan // Збірник тез доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, 19-21 квітня 2021 р.) С. 121-122.
4. Zhdaniuk V., Piatetska D., Klymenko N., Pirog T. Synthesis of auxins by strains *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 and *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 in the presence of

tryptophan in the culture medium (Minsk, Republic of Belarus, November 19-20, 2020) P. 215-217.

5. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П. Вплив триптофану на активність триптофантрансамінази штаму *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 / «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості» (м. Харків, 26 листопада 2020 р.) С. 227.

6. Piatetska D., Zhdanyuk V., Pirog T. Involvement of exogenous tryptophan in the biosynthesis of auxins by *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 / Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті"(м. Київ: НУХТ, 15–16 квітня 2021р.) С. 384.

7. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П. / Вплив попередника синтезу ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017. «Майбутній науковець - 2020» (м. Сєвєродонецьк, 4 грудня 2020 р.) С. 124-125.

8. Pirog T.P., Leonova N.O., Klymenko N.O., Zhdanyuk V.I., Piatetska D.V. Shevchuk T.A. / Influence of tryptophan on auxin-synthesizing ability of surfactant producer *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 / ІХ Міжнародна науково-технічна конференція «Наукові проблеми технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (Київ, 10-11 листопада 2020 р.) С. 19-20.

9. Пирог Т. П.1, Леонова Н.О., Шевчук Т.А., Клименко Н.О., Жданюк, Шевчук Т.А., П'ятецька Д.В. / ІХ Міжнародна науково-технічна конференція «Наукові проблеми технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (Київ, 10-11 листопада 2020 р.) С. 23-24.

10. Клименко Н., Жданюк В., Пирог Т. Вплив триптофану на активність триптофантрансамінази штаму *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 / Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті"(м. Київ: НУХТ, 15–16 квітня 2021р.) С. 392.

УДК 759.873.088.5:661.185

Т. П. ПИРОГ^{1,2}, Н. О. ЛЕОНОВА¹, Т. А. ШЕВЧУК¹,
И. В. САВЕНКО², Г. А. ИУТИНСКАЯ¹

**СИНТЕЗ ФИТОГОРМОНОВ БАКТЕРИЯМИ
ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241,
RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS IMB AC-5017 И NOCARDIA VACCINII IMB B-7405 –
ПРОДУЦЕНТАМИ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина,
e-mail: tapirog@mift.edu.ua,

²Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина

Установлена способность продуцентов поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 и *Nocardia vaccini* IMB B-7405 синтезировать внеклеточные фитогормоны при культивировании на глицерине и этаноле. Концентрация ауксинов (84–140 мкг/л), цитокининов (3,5–364 мкг/л) и абсцизовой кислоты (0,9–3,6 мкг/л) зависела от природы источника углерода в среде культивирования штаммов и способа выделения (до или после экстракции ПАВ).

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Nocardia vaccini* IMB B-7405, поверхностно-активные вещества, фитогормоны, биосинтез.

T. P. PIROG, N. O. LEONOVA, T. A. SHEVCHUK, I. V. SAVENKO, G. A. IUTINSKAYA

**SYNTHESIS OF PHYTOHORMONES BACTERIA OF ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB V-7241,
RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS IMV AS-5017 AND NOCARDIA VACCINII IMV V-7405 –
PRODUCERS OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES**

The capacity of surfactants producers *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Nocardia vaccini* IMV B-7405 to synthesize exocellular phytohormones was established. The concentration of auxin (84–140 μ/l), cytokinins (3.5–364 μ/l) and abscisic acid (0.9–3.6 μ/l) depend on the nature of carbon source in the cultivation medium of strains and method of isolation (before or after extraction of the surfactant).

Keywords: *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Nocardia vaccini* IMV B-7405, surfactants, phytohormones, biosynthesis.

Введение. Поверхностно-активные вещества (ПАВ) широко используются в различных отраслях промышленности, в связи с чем спрос на синтетические ПАВ постоянно растет. Вместе с тем темпы развития биотехнологии на современном этапе и повышение внимания к сохранению окружающей среды обусловили большой интерес исследователей к микробным ПАВ как альтернативе химическим аналогам [1]. ПАВ микробного происхождения имеют ряд преимуществ перед синтетическими соединениями: биodeградельность, стабильность свойств в широком диапазоне pH и температуры, нетоксичность.

В последнее время в литературе стали появляться отдельные сообщения о том, что некоторые микроорганизмы в определенных условиях культивирования одновременно с ПАВ синтезируют и другие метаболиты (ферменты, бактериоцины, полисахариды, полигидроксиалканоаты) [2–6]. Так, в работе [2] авторы установили, что *Bacillus subtilis* SK.DU.4 образует два антимикробных пептида – бактериоциноподобный пептид и итуриноподобный липопептид. Комплекс ПАВ и бактериоцина характеризовался более высокой антибактериальной и антифунгальной активностью, чем

R. erythropolis IMB Ac-5017 выращивали в жидкой минеральной среде (г/л): NaNO_3 – 1,3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, NaCl – 1,0, Na_2HPO_4 – 0,6, KH_2PO_4 – 0,14, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01, pH 6,8–7,0. В качестве субстрата использовали этанол в концентрации 1 % (по объему).

Для культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 использовали питательную среду следующего состава (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,35, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, NaCl – 1,0, Na_2HPO_4 – 0,6, KH_2PO_4 – 0,14, pH 6,8–7,0. В среду дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему) и раствор микроэлементов – 0,1 % (по объему) [9]. Источник углерода – этанол и глицерин в концентрации 1 % (по объему).

Штамм *N. vaccinii* IMB B-7405 выращивали на синтетической питательной среде (г/л): NaNO_3 – 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, KH_2PO_4 – 0,1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему). Источник углерода и энергии – глицерин в концентрации 1,0 % (по объему).

В качестве инокулята использовали культуры в экспоненциальной фазе роста, выращенные на соответствующих жидких средах, содержащих 0,5 % (по объему) субстрата. Количество посевого материала (10^4 – 10^5 кл/мл) составляло 5–10 % от объема питательной среды. Культивирование бактерий осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 28–30 °C в течение 120 ч.

Фитогормоны определяли в супернатанте культуральной жидкости, а также в водной фазе, оставшейся после экстракции из супернатанта внеклеточных ПАВ смесью хлороформа и метанола в соотношении 2:1 (смесь Фолча). Выделение ПАВ и определение их концентрации осуществляли, как описано нами ранее [7–10]. Супернатант получали путем центрифугирования культуральной жидкости (5000 g) в течение 25 мин.

Внеклеточные фитогормоны ауксины, цитокинины и абсцизовую кислоту (АБК) выделяли методом перераспределения фитогормонов в двух фазах растворителей, не смешивающихся между собой: этилацетате (для ауксинов и АБК), pH 3,0; н-бутаноле (для цитокининов), pH 8,0 [11]. Полученные экстракты упаривали под вакуумом при 40–45 °C, сухой остаток растворяли в этаноле и использовали для физико-химического анализа фитогормонов.

Предварительную очистку и концентрирование фитогормонов проводили на пластинках с силикагелем марки Silufol UV₂₅₄ (Chemapol, Чехия) в смеси растворителей, применяемых последовательно: хлороформ, 12,5 %-ный водный аммиак, этилацетат:уксусная кислота (20:1). Очищенные таким образом экстракты цитокининов, АБК и индольных соединений разделяли на пластинках с оксидом алюминия и кремния (Merck, Германия), как описано в работе [12]. Количественное

112

определение фитогормонов осуществляли с помощью сканирующего спектроденситометра «Сорбфил» (Россия), в качестве стандартов использовали синтетические фитогормоны фирм Sigma-Aldrich (Германия) и Acros Organics (Бельгия). Количество внеклеточных фитогормонов рассчитывали в мкг/л супернатанта.

Все опыты проводили в трех повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [7–10]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Известно, что фитогормоны являются важными регуляторами

определение фитогормонов осуществляли с помощью сканирующего спектроденситометра «Сорбфил» (Россия), в качестве стандартов использовали синтетические фитогормоны фирм Sigma-Aldrich (Германия) и Acros Organics (Бельгия). Количество внеклеточных фитогормонов рассчитывали в мкг/л супернатанта.

Все опыты проводили в трех повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [7–10]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Известно, что фитогормоны являются важными регуляторами роста и развития растений [13–15]. Однако некоторые из них (например, представитель ауксинов – индолил-3-уксусная кислота, ИУК) были впервые выделены не из растений, а из мочи человека, а также дрожжей и грибов (цит. по [15]).

Образование фитогормонов является неотъемлемой составляющей взаимодействия между растениями и ассоциированными с ними микроорганизмами (симбионты, эпифиты, обитатели ризосферы и ризопланы) [16–18]. Так, например, *Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* образуют цитокинины, а большинство представителей рода *Rhizobium* синтезируют ИУК [19]. Образование ауксинов распространено у представителей свободноживущих и симбиотических цианобактерий [20]. Кроме того, синтез микроорганизмами гормонов-стимуляторов и ингибиторов может рассматриваться как фактор патогенности, поскольку фитопатогены способны образовывать эти соединения в сверхвысоких количествах, что приводит к нарушению гормонального статуса растения и возникновению ряда заболеваний [13, 21, 22]. Работа [23] является одной из первых, в которых исследовали роль и пути биосинтеза ауксинов у грамположительных фитопатогенных бактерий *Rhodococcus fascians*. Кроме ауксинов *R. fascians* синтезирует также и цитокинины [24]. Если синтез фитогормонов у фитопатогенных микроорганизмов, а также у стимулирующих рост растений бактерий объясняется их участием во взаимодействии с растениями [16–23], то физиологическая роль таких соединений у метанотрофов, дрожжей-сахаромицетов, непатогенных микромицетов до конца не выяснена [20]. Кроме того, в доступной литературе нам не удалось обнаружить информации об образовании фитогормонов продуцентами ПАВ.

Состав внеклеточных фитогормонов, синтезированных *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на гидрофильных субстратах представлен в табл. 1, 2.

Т а б л и ц а 1. Синтез фитогормонов при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на этаноле

Фитогормоны	Концентрация, мкг/л	
	IMB B-7241	IMB Ac-5017
Ауксины:		
индолил-3-уксусная кислота	24,9	81,1
индол-3-карбоксилловая кислота	24,9	–
индол-3-масляная кислота	51,0	–
индол-3-уксусной кислоты гидразид	3,4	3,1
индол-3-карбоксальдегид	–	–
Общее количество ауксинов	104,2	84,2
Цитокинины:		
кинетин	–	–
зеатин	3,5	–
зеатин-рибозид	–	–
изопентенил-аденин	–	–
изопентенил-аденозин	–	–
Общее количество цитокининов	3,5	–
Абсцизовая кислота	1,3	3,6

Т а б л и ц а 2. Образование фитогормонов при выращивании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на глицерине

Фитогормоны	Концентрация, мкг/л	
	IMB B-7241	IMB B-7405
Ауксины:		
индолил-3-уксусная кислота	14,3	–
индол-3-карбоксилловая кислота	12,1	–
индол-3-масляная кислота	95,6	139,9
индол-3-уксусной кислоты	–	–
гидразид индол-3-карбоксальдегид	–	–
Общее количество ауксинов	122,0	139,9
Цитокинины:		
кинетин	214,0	–
зеатин	42,2	–
зеатин-рибозид	96,3	–
изопентенил-аденин	–	–
изопентенил-аденозин	11,4	–
Общее количество цитокининов	363,9	–
Абсцизовая кислота	0,9	3,1

Примечание. «–» – не обнаружено. То же в табл. 2, 3.

Т.П. Пирог^{1,2}, Т.А. Шевчук², О.Ю. Мащенко¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ДСП, Д03680, Украина**ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ БИОКОНВЕРСИИ ТЕХНИЧЕСКОГО
ГЛИЦЕРИНА В ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА
RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS IMB Ac-5017, *ACINETOBACTER
CALCOACETICUS* IMB B-7241 И *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405**

Исследована возможность синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 в среде с высокой (до 8 % по объему) концентрацией технического глицерина – отхода производства биодизеля.

Установлено, что увеличение концентрации инокулята до 10–15 % и повышение в два раза (по сравнению с базовой средой) содержания источника азотного питания позволяет реализовать процесс синтеза ПАВ штаммами IMB Ac-5017, IMB B-7241 и IMB B-7405 на среде, содержащей 7–8 % (по объему) технического глицерина. В таких условиях культивирования концентрация синтезированных исследуемыми штаммами внеклеточных ПАВ составляла 3,4–5,3 г/л, что в 1,4–3 раза выше, чем на базовой среде с аналогичной концентрацией субстрата.

Исследование потребности *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в факторах роста для синтеза ПАВ на техническом глицерине (2 % по объему) позволило исключить из состава среды дрожжевую автолизат и смесь микроэлементов, заменив их сульфатом меди (0,16 мкмоль/л) и сульфатом цинка (38 мкмоль/л), что упрощает и удешевляет процесс биосинтеза целевого продукта.

Ключевые слова: *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, интенсификация биосинтеза, поверхностно-активные вещества, технический глицерин.

В предыдущих исследованиях [2, 3] нами была показана возможность синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании штаммов *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и *Nocardia vaccinii* K-8 (IMB B-7405) в среде с очищенным глицерином. Позже [4] при исследовании влияния компонентов технического глицерина (соли калия и натрия, этанол, метанол) – побочного продукта производства биодизеля на образование ПАВ *N. vaccinii* K-8 было установлено, что внесение в среду с очищенным глицерином (1 %) хлорида калия (натрия) в концентрации 2,5 % и этанола (метанола) в концентрации 0,3 % сопровождалось повышением условной концентрации ПАВ в 1,4–1,7 раза по сравнению с показателями на среде без добавления солей и спиртов. Максимальная концентрация внеклеточных ПАВ (4,78 г/л) была достигнута при 4 % технического глицерина в среде культивирования *N. vaccinii* K-8, а дальнейшее увеличение содержания субстрата сопровождалось снижением показателей синтеза ПАВ. В работе [6] мы установили возможность использования технического глицерина и для синтеза ПАВ штаммами IMB Ac-5017 и IMB B-7241, причем на отходах производства биодизеля концентрация ПАВ была в два раза выше, чем на эквимолярной по углероду концентрации очищенного субстрата. В этих исследованиях содержание технического глицерина в среде не превышало 2 % (по объему) [6].

В то же время, учитывая объемы производства биодизеля в мире – более 11 млн т в 2008 году с ежегодным последующим увеличением на 8–10 % [15], а также количество образующегося в качестве отходов технического глицерина – 10 % от получаемого биодизеля [13], становится понятно, что для эффективного использования такого отхода в качестве субстрата в биотехнологических процессах его содержание в среде культивирования продуцентов практически ценных микробных метаболитов должно быть как можно выше.

В связи с изложенным целью работы – установление условий культивирования штаммов *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на среде с максимально возможной концентрацией технического глицерина, обеспечивающих высокие показатели синтеза поверхностно-активных веществ.

© Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, О.Ю. Мащенко, 2015

Материалы и методы. Объекты исследования – штаммы *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405, зарегистрированные в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины.

R. erythropolis IMB Ac-5017 выращивали на жидкой минеральной среде (г/л): NaNO_3 – 1,3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, NaCl – 1,0, Na_2HPO_4 – 0,6, KH_2PO_4 – 0,14, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01, pH 6,8–7,0.

Для культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 использовали среду следующего состава (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,35, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, NaCl – 1,0, Na_2HPO_4 – 0,6, KH_2PO_4 – 0,14, дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему), раствор микроэлементов [14], pH 6,8–7,0. В одном из вариантов в среду вместо дрожжевого автолизата и микроэлементов вносили (в различных комбинациях) сульфат цинка и сульфат меди в концентрации 38 и 0,16 мкмоль/л соответственно, а также хлорид калия (0,21 ммоль/л).

Штамм *N. vaccinii* IMB B-7405 выращивали на жидкой минеральной среде (г/л): NaNO_3 – 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, KH_2PO_4 – 0,1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01, дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему), pH 6,8–7,0.

В качестве источника углерода использовали технический глицерин, являющийся отходом производства биодизеля (Запорожский биотопливный завод). Концентрация технического глицерина в среде культивирования составляла 2–10 % (по объему).

В одном из вариантов содержание источника азота в среде для культивирования всех исследуемых штаммов увеличивали в 2 раза.

В качестве посевного материала использовали культуры из экспоненциальной фазы роста, выращенные на средах указанного выше состава с 0,5 % технического глицерина. Количество инокулята (10^4 – 10^5 клеток/мл) – 5–20 % от объема засеваемой среды.

Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (220 об/мин) при 30 °C в течение 120–168 ч.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на сухую биомассу по калибровочному графику. Способность к синтезу ПАВ оценивали по таким показателям: условная концентрация ПАВ (ПАВ*, безразмерная величина), а также количество синтезированных ПАВ (г/л), которые определяли, как описано нами ранее [14].

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных

Таблица 1

Влияние концентрации технического глицерина и длительности культивирования штаммов *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на синтез ПАВ

Штамм	Концентрация глицерина в среде, %	Концентрация ПАВ (г/л) при культивировании в течение, ч	
		120	168
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	2	5,6±0,28	5,6±0,28
	3	5,2±0,26	5,5±0,27
	4	5,0±0,25	5,2±0,26
	5	4,0±0,20	4,2±0,21
	6	3,9±0,19	4,0±0,20
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	2	0,95±0,05	1,0±0,05
	3	Н.о.	Н.о.
	4	1,7±0,08	1,8±0,09
	5	1,8±0,09	2,0±0,10
	6	2,4±0,12	3,2±0,16
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	2	3,3±0,17	3,4±0,17
	3	3,4±0,17	3,6±0,18
	4	4,2±0,21	4,8±0,24
	5	3,8±0,19	4,0±0,20
	6	2,9±0,15	3,0±0,15

Примечания. Концентрация биомассы во всех вариантах составляла 0,7–0,8 г/л. Н. о. – не определяли. Концентрация посевного материала для *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *R. erythropolis* IMB Ac-5017 – 5 %, *N. vaccinii* IMB B-7405 – 10 % (по объему).

Литературные данные свидетельствуют, что концентрация поверхностно-активных веществ, образуемых различными продуцентами на техническом глицерине, как правило, невысокая [9–12, 16]. Так, штамм *Bacillus subtilis* LSFM-05 при культивировании на среде с 5 % технического глицерина синтезировал 1,36 г/л сурфактина [10] и такое же количество гомологов фенгидина [9]. При выращивании *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 на среде с предварительно гидролизованным (обработка серной кислотой) техническим глицерином (5 % по объему) количество синтезируемых амфифильных соединений составляло 1,27 г/л, а на среде, содержащей

Received:
27 January 2017
Revised:
13 April 2017
Accepted:
21 June 2017

Cite as:
Ana Maria Salazar-Bryam,
Roberta Barros Lovaglio,
Jonas Contiero. Biodiesel
byproduct bioconversion to
rhamnolipids: Upstream
aspects.
Heliyon 3 (2017) e00337.
doi: 10.1016/j.heliyon.2017.
e00337



Biodiesel byproduct bioconversion to rhamnolipids: Upstream aspects

Ana Maria Salazar-Bryam^a, Roberta Barros Lovaglio^b, Jonas Contiero^{a,*}

^aSão Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Campus (Rio Claro), Department of Biochemistry and Microbiology, Laboratory of Industrial Microbiology, Rio Claro, SP, Brazil

^bNatural Science Center, Federal University of São Carlos – Lagoa do Sino – Buri, SP, Brazil

*Corresponding author.

E-mail address: jconti@unesp.com.br (J. Contiero).

Abstract

This study focused on two important aspects of the upstream process: the appropriate use of crude glycerol as a low-cost carbon source, and strain selection. The effect of different crude glycerol concentrations on rhamnolipid biosynthesis by two *Pseudomonas aeruginosa* strains (wild type LBI and mutant LBI 2A1) was studied. Finally, the synthesized rhamnolipids were characterized by mass spectrometry. When both strains were compared, 50 g/L was the most favorable concentration for both, but *P. aeruginosa* LBI 2A1 showed an increase in rhamnolipid production (2.55 g/L) of 192% over wild type (1.3 g/L). The higher rhamnolipid production could be related to a possible mechanism developed after the mutation process at high antibiotic concentrations. Mass spectrometry confirmed the glycolipid nature of the produced biosurfactant, and the homologue composition showed a wide mixture of mono and di-rhamnolipids. These results show that high glycerol concentrations can inhibit microbial metabolism, due to osmotic stress, leading to a better understanding of glycerol metabolism towards its optimization in fermentation media. Since *P. aeruginosa* LBI 2A1 showed higher conversion yields than *P. aeruginosa* LBI, the use of a mutant strain associated with a low cost carbon source might improve biosurfactant biosynthesis, therefore yielding an important upstream improvement.

Keywords: Biotechnology, Microbiology

<http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00337>

2405-8440/© 2017 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Another feasible strategy towards optimization of rhamnolipid production is the study of biosurfactant hyper-producer strains or mutants that can utilize raw materials, increase production yields and also, enhance biosurfactant characteristics (Dhanaraja and Sen, 2014). Hence, the aim of the present work was to evaluate the effect of varying the crude glycerol concentration on rhamnolipid production using *Pseudomonas aeruginosa* LBI strain in batch cultures, and to compare biosurfactant production between wild type *Pseudomonas aeruginosa* LBI and its mutant *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, using the most favorable glycerol concentration studied. Finally, the produced rhamnolipids were characterized.

2. Material and methods

2.1. Microorganisms

Pseudomonas aeruginosa LBI was isolated from petroleum-contaminated soil (Benicasa et al., 2002) and the mutant strain *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 was obtained by random transposon mutagenesis done a previous work from this lab, as a part of a doctoral thesis (Lovaglio, 2011). Each strain was maintained in nutrient broth plus 20% glycerol at -20°C .

2.2. Raw material

The glycerol used in this work is the byproduct of biodiesel production, resulting from the transesterification of oil by methanol in alkaline medium (NaOH). The carbon source was provided by Biocapital Consultoria Empresarial e Participações S.A. (São Paulo, Brazil).

2.3. Culture medium and conditions

2.3.1. Culture medium

Lysogeny Broth (LB) (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl) was used for the first pre-cultivation step. A Ca-free mineral salt solution (modified from Müller et al., 2011) with 1.5 g/L NaNO_3 , 0.05 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 0.1 g/L KCl, containing a 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 6.5 was used for the seed culture. A total of 1 mL/L of trace element solution (2.0 g/L sodium citrate $2\text{H}_2\text{O}$, 0.28 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.87 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.2 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.2 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, and 0.8 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) was added to both seed and production media. Rhamnolipid production Ca-free medium consisted of 0.3 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L KCl, 15 g/L NaNO_3 , with pH adjusted to 6.5. Crude glycerol was used as the carbon source and the concentration was half on the seed medium as was used for rhamnolipid production. This study was divided into three parts. First, the batch fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* LBI was

concentration was 2.60 ± 0.01 g/L (Fig. 2b). Furthermore, *P. aeruginosa* LBI had managed to consume the entire carbon source after 120 h, while *P. aeruginosa* LBI 2A1 had consumed only 66% of the carbon source (Fig. 2c).

In spite of the non-significant difference in biomass production ($p > 0.05$), rhamnolipid synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 was significantly higher ($p < 0.05$), with an increase of 192% (2.55 ± 0.01 g/L), over the wild type. In both cases, a decrease in rhamnolipid concentration was seen after 96 h, showing a possible use of the product as a carbon source (Fig. 2c).

3.3. Crude glycerol limiting concentrations on rhamnolipids production by mutant strain *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1

Five different concentrations of the target carbon source were studied to determine a limiting concentration on rhamnolipid production for *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 (Fig. 3). As the glycerol concentration decreased, *P. aeruginosa* LBI 2A1 showed an increase in carbon consumption. The carbon source was completely depleted at 5, 15 and 30 g/L, and with 70 g/L of crude glycerol, the microorganism showed a similar pattern as *P. aeruginosa* LBI with an inhibition of the consumption of the carbon source (Fig. 3c). Furthermore, *P. aeruginosa* LBI 2A1 presented the higher rhamnolipid production with 50 g/L of crude glycerol. As the concentration of the carbon source decreased, the rhamnolipid production did as well, but the rhamnolipid production was the lowest obtained with the higher glycerol concentration (70 g/L).

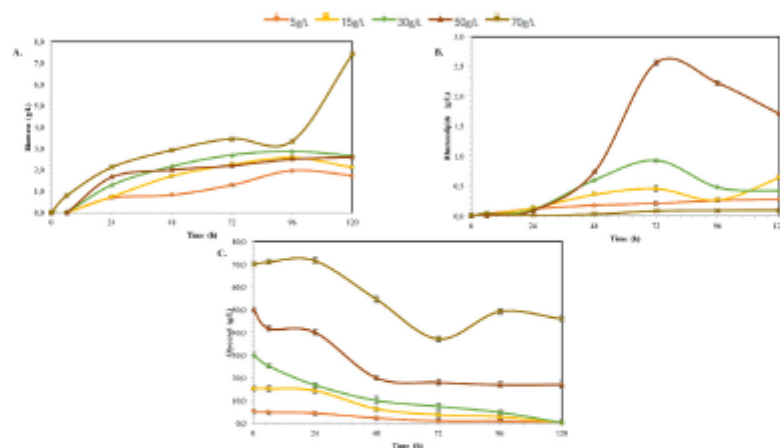


Fig. 3. Comparison on the effect of different crude glycerol concentrations (5 g/L – orange; 15 g/L – yellow; 30 g/L – green; 50 g/L – brown; 100 g/L – light brown) on the fermentation with *P. aeruginosa* LBI 2A1 (A) Biomass production; (B) Rhamnolipids production; (C) Glycerol consumption.

concentration was 2.60 ± 0.01 g/L (Fig. 2b). Furthermore, *P. aeruginosa* LBI had managed to consume the entire carbon source after 120 h, while *P. aeruginosa* LBI 2A1 had consumed only 66% of the carbon source (Fig. 2c).

In spite of the non-significant difference in biomass production ($p > 0.05$), rhamnolipid synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 was significantly higher ($p < 0.05$), with an increase of 192% (2.55 ± 0.01 g/L), over the wild type. In both cases, a decrease in rhamnolipid concentration was seen after 96 h, showing a possible use of the product as a carbon source (Fig. 2c).

3.3. Crude glycerol limiting concentrations on rhamnolipids production by mutant strain *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1

Five different concentrations of the target carbon source were studied to determine a limiting concentration on rhamnolipid production for *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 (Fig. 3). As the glycerol concentration decreased, *P. aeruginosa* LBI 2A1 showed an increase in carbon consumption. The carbon source was completely depleted at 5, 15 and 30 g/L, and with 70 g/L of crude glycerol, the microorganism showed a similar pattern as *P. aeruginosa* LBI with an inhibition of the consumption of the carbon source (Fig. 3c). Furthermore, *P. aeruginosa* LBI 2A1 presented the higher rhamnolipid production with 50 g/L of crude glycerol. As the concentration of the carbon source decreased, the rhamnolipid production did as well, but the rhamnolipid production was the lowest obtained with the higher glycerol concentration (70 g/L).

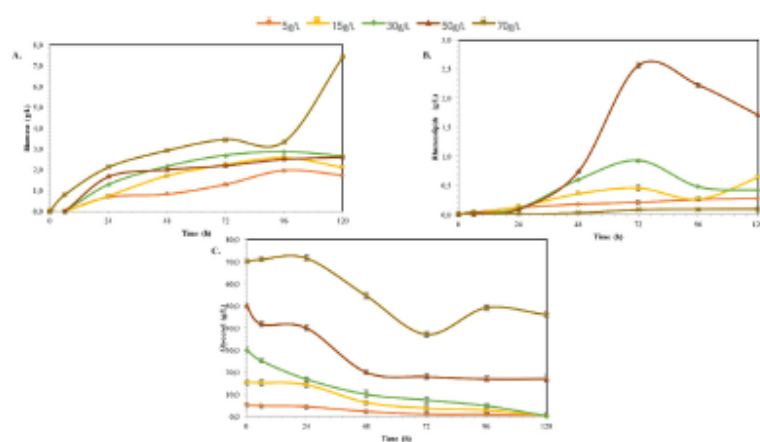


Fig. 3. Comparison on the effect of different crude glycerol concentrations (5 g/L – orange; 15 g/L – yellow; 30 g/L – green; 50 g/L – brown; 100 g/L – light brown) on the fermentation with *P. aeruginosa* LBI 2A1 (A) Biomass production; (B) Rhamnolipids production; (C) Glycerol consumption.

performed with different concentrations of crude glycerol (50, 70, 100, 150 g/L). Second, the rhamnolipid production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI and *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 was compared using the lowest crude glycerol concentration tested initially. Finally, fermentation experiments were conducted with lower glycerol concentrations to confirm a limiting concentration (50, 30, 15, 5 g/L) for *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1. Mineral salt solutions, phosphate sources, and crude glycerol were autoclaved separately for all experiments. All experiments were performed in triplicate.

2.3.2. Inoculum preparation

For the pre-culture each strain was re-activated in 25 mL of LB contained in a 125 mL Erlenmeyer flask with incubation at 37 °C and 200 rpm. After 24 h, 2.5 mL of the pre-inoculum were transferred to 500 mL Erlenmeyer flasks containing 20% volume of seed medium and they were incubated for 24–48 h at 37 °C, 200 rpm. For inoculation in the production medium, a theoretical initial OD₅₈₀ of 0.08 was considered, and the appropriate inoculum volume of the seed culture needed to be calculated and transferred to the fermentation broth.

2.3.3. Rhamnolipid production in shaker

The rhamnolipid production was carried out in 1L Erlenmeyer flasks containing 30% production medium at 37 °C with agitation at 200 rpm for 120 h on rotatory shaker. Samples (10 mL) were collected every 24 h of fermentation, cells were separated by centrifugation at 6000 rpm for 30 min at 4 °C, and the cell pellet was used for dry biomass quantification, while the supernatant was submitted to analysis of rhamnolipid and substrate concentration.

2.4. Analytical methods

2.4.1. Rhamnolipid quantification

2.4.1.1. Rhamnolipid extraction

For rhamnolipid precipitation, 85% H₃PO₄ 1:100 (v/v) was added to the cell-free broth. The biosurfactants were extracted using ethyl acetate 1:125 (v/v). The mixture was then shaken for 1 min and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and the upper phase was removed. The extraction process was repeated using the remaining lower phase.

2.4.1.2. Thin layer chromatography

The formation of rhamnolipid congeners was checked by thin layer chromatography on silica gel plates and chloroform/methanol/acetic acid (65:15:2 by vol) was


 Cite this: *RSC Adv.*, 2019, 9, 2885

Production of rhamnolipids with different proportions of mono-rhamnolipids using crude glycerol and a comparison of their application potential for oil recovery from oily sludge

 Feng Zhao,^a Hao Jiang,^{b,c} Huichun Sun,^a Chang Liu,^d Siqin Han^a and Ying Zhang^{*a}

The use of efficient green cleaning agents, such as biosurfactants, is important in oil sludge treatment. Enhanced oil recovery from oily sludge by different rhamnolipids was comparatively evaluated. Using crude glycerol, the wild-type strain *Pseudomonas aeruginosa* SG and the recombinant strains *P. aeruginosa* PrhIAB and *P. stutzeri* Rhl produced 1.98 g L⁻¹, 2.87 g L⁻¹ and 0.87 g L⁻¹ of rhamnolipids, respectively. The three bacterial strains produced different rhamnolipid mixtures under the same conditions. The proportions of mono-rhamnolipids in the three rhamnolipid products were 55.92%, 94.92% and 100%, respectively. These rhamnolipid products also possessed different bioactivities. Emulsifying activity became higher as the proportion of mono-rhamnolipids increased. The three rhamnolipid products were stable at temperatures lower than 121 °C, pH values from 5–11 and NaCl concentrations from 0–15%. All three rhamnolipid products could recover oil from oily sludge, but oil recovery efficiency was positively related to the proportion of mono-rhamnolipids. Mono-rhamnolipids produced by the recombinant strain Rhl exhibited the best oil recovery efficiency (53.81%). The results reveal that mono-rhamnolipids are the most promising for oil recovery from oily sludge.

Received 13th November 2018

Accepted 7th January 2019

DOI: 10.1039/c8ra09351b

rsc.li/rsc-advances

Introduction

A large amount of oily sludge (solid waste containing oil) is produced in the process of oil production, transportation, refining and treatment of oily sewage.^{1,2} Oily sludge has become a major source of soil oil pollution.³ Oily sludge has been included in the national hazardous waste list in China. Oily sludge is the primary pollutant from the oil industry.³ Although oily sludge is a solid waste product, it is also a high oil content resource.^{4,5} How to recycle crude oil from sludge in an environmentally friendly and economically efficient way is significant to the treatment of oily sludge.

Surfactant-enhanced sludge cleaning is the focus of sludge treatment technology.^{6,7} This mainly refers to the use of surfactant for desorption and emulsification of crude oil in oily sludge.⁶ Then, separation of oil and sludge is completed under

the action of an external force, such as centrifugal force. Surfactants are widely used and the consumption of surfactants is increasing. However, the residual chemical surfactants are not easily biodegraded.^{8,9} So they may cause secondary pollution.⁹ The consequent damage to the ecosystem has been paid more and more attention.

Compared with chemical surfactants, biosurfactants have good environmental compatibility, high surface activity and easy biodegradability.^{10,11} The emulsifying activity of biosurfactant and the formation of micelles can disperse and solubilize petroleum hydrocarbons.¹² In oily sludge washing treatment, biosurfactants with high emulsification activity play a stronger role in solubilization of crude oil. The chemical structure of biosurfactants is diverse, which makes it possible to obtain biosurfactants with different activities.^{13–15} Rhamnolipids are one of the most popular biosurfactants. Rhamnolipids are a series of homologues composed of rhamnosides and fatty acids.^{16,17} Different rhamnolipid-producing bacterial strains afford rhamnolipid products with different structures.¹⁸ The different structures of rhamnolipids may give quite different physico-chemical properties, such as emulsifying activity.^{14,19}

In this study, three different rhamnolipid producers (*Pseudomonas aeruginosa* SG, *P. aeruginosa* PrhIAB, *P. stutzeri* Rhl) were used for rhamnolipid production. Crude glycerol was used as the low-cost substrate. Three different rhamnolipid products

^aCAS Key Laboratory of Pollution Ecology and Environmental Engineering, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shenyang, Liaoning Province, 110016, China. Email: zhaof2008569@126.com; yzhang@iae.ac.cn; Tel: +86-24-83970370

^bHeilongjiang Weikaier Biotechnology Company Limited, Harbin, Heilongjiang Province, 150025, China

^cHarbin Hongda Construction Development Group, Harbin, Heilongjiang Province, 150000, China

^dSchool of Environmental Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China



were extracted. The structural compositions and surface-active properties of the three rhamnolipids products were characterized. The rhamnolipids' stability against environmental stresses was evaluated at different temperatures, pH values and salinities. Further, the application potential of the three kinds of rhamnolipid products for oily sludge washing was also comparatively investigated.

Materials and methods

Strains

In this study, three different rhamnolipid producers (*Pseudomonas aeruginosa* SG, *P. aeruginosa* PrhLAB, *P. stutzeri* Rhl) were used for rhamnolipid production. Strain SG is the wild-type strain, which was isolated from production water of Xinjiang oil reservoir, China.²⁰ Strain PrhLAB is a recombinant strain derived from strain SG by increasing the copy numbers of the *rhLAB* genes.²¹ Strain Rhl is also a recombinant strain, constructed by heterologous expression of *rhLABRI* genes in strain *P. stutzeri* DQ1.²²

Medium and culture conditions

Luria-Bertani (LB) medium was used to prepare seed culture. The three strains were cultured at 37 °C and 200 rpm for 16 h. The medium used for rhamnolipid production contained 60 g L⁻¹ crude glycerol, 3.4 g L⁻¹ KH₂PO₄, 4.0 g L⁻¹ K₂HPO₄·3H₂O, 0.80 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 3.5 g L⁻¹ NaNO₃, 0.50 g L⁻¹ KCl, 0.05 g L⁻¹ CaCl₂, 0.50 g L⁻¹ NaCl. The pH of the medium was adjusted to 6.8 using 1 M NaOH. Crude glycerol was purchased from an agency company in Jinan, China. This crude glycerol contained 90% glycerol, some water, methanol, and esters. The other chemicals were analytical grade, and were purchased from Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd, China. The culture conditions for rhamnolipid production were 37 °C, 200 rpm for 5 days. The inoculum amount of seed culture was 3% (v/v). In cultivation experiments, 250 mL Erlenmeyer flasks containing 120 mL medium were used.

Rhamnolipid extraction

Cultures of the three strains were centrifuged at 10 000 rpm for 10 min. Cell-free culture was collected and heated at 80 °C for 30 min. The soluble protein in cell-free culture degenerated and precipitated. Treated cell-free culture was centrifuged at 10 000 rpm for 10 min again. The supernatant was collected. The pH of the supernatant was adjusted to 1.5 using 6 M HCl. The supernatant was placed at 4 °C for 16 h. Then the sample was centrifuged at 10 000 rpm for 10 min. The precipitate was collected and then dissolved in 0.1 M NaHCO₃. The rhamnolipid product in NaHCO₃ solution was extracted using chloroform/methanol (v/v, 2 : 1). The extraction solution was dried by vacuum rotary evaporation (65 °C, 50 rpm). The obtained yellow solid substance was the rhamnolipid product.

Quantitative analysis by oil-spreading method

Rhamnolipid concentrations in the three bacterial cultures were quantified by the oil-spreading method.²³ The three

rhamnolipid products were respectively dissolved in distilled water. Rhamnolipids-water solutions were prepared with different concentrations (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 and 800 mg L⁻¹). The oil-spreading circle diameters of the rhamnolipid solutions were measured as previously described.²⁴ Standard curves of oil-spreading circle diameters and rhamnolipid concentrations were prepared. Linear correlations were established between the oil-spreading circle diameters and rhamnolipid concentrations. The oil-spreading circle diameters of the bacterial cultures were measured. The rhamnolipid concentrations in the three bacteria cultures were calculated using the related standard curves.

Qualitative analysis by TLC and FTIR

Thin-layer chromatography (TLC) analysis was performed according to previous studies.^{20,22} The three rhamnolipid products were respectively dissolved in methanol to a concentration of 200 mg L⁻¹. Then, 10 µL of sample was spotted on silica gel G plates (Qingdao Marine Chemical Factory, Qingdao, China). Chloroform/methanol/distilled water (90 : 25 : 2, v/v/v) was used as developing solvent. The silica gel G plates were finally visualized by sulfuric acid-phenol reagent (concentrated H₂SO₄, 80% phenol solution) at 95 °C for 10 min.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis was also used to identify the functional groups of the rhamnolipids.^{20,22} A NICOLET380 FTIR spectrometer (Thermo Electron Corporation, USA) was used. The resolution was 0.5 cm⁻¹. FTIR spectra were collected at wave numbers between 400 cm⁻¹ and 4000 cm⁻¹. Solid rhamnolipid product (10 mg) was mixed with spectral purity KBr (100 mg). Then a translucent disc was made at 25 Mpa for 30 s.

Structural composition analysis by HPLC-MS

The three rhamnolipid products were respectively dissolved in 10% acetonitrile-water to a concentration of 500 mg L⁻¹. High-pressure liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) analysis was carried out according to previous studies.^{24,25} A liquid chromatography-mass spectrometer (Waters, Milford Massachusetts, USA) equipped with a reversed-phase C18 column (ø 2 mm × 150 mm × 0.5 µm) was used. The injection sample volume was 20 µL. The mobile phase was acetonitrile-water with gradient from 10% to 60%. Mass spectrum scanning mass number ranged from 50 *m/z* to 800 *m/z*. Rhamnolipid congeners were identified based on *m/z*.²⁴ Their relative proportions were calculated using the area normalization method.

Bioactivity and stability analysis

Three rhamnolipid products were respectively dissolved in distilled water to a concentration of 200 mg L⁻¹. The rhamnolipid surface activity, emulsifying activity and stability against environmental stresses were evaluated. Surface tension was measured at 30 °C using a surface tension meter BZY-1 (Shanghai Hengping Instrument and Meter Factory, Shanghai, China). The emulsifying activity was measured as described previously.²⁹ Crude oil sampled from the Xinjiang oil field was



used. The emulsion index (EI_{24}) (%) is defined as the height of the oil layer (mm) divided by the total height of the mixture (mm) and multiplied by 100.²⁰ Stability of rhamnolipids was evaluated under diverse environmental conditions. Rhamnolipid solutions were treated at different temperatures (50 °C, 80 °C, 100 °C and 121 °C), pH values (2, 4, 6, 8, 10, 11 and 12) and NaCl concentrations (0%, 3%, 6%, 9%, 12%, 15%, 18%, 21% and 25%) for 30 min. The surface tension and EI_{24} were measured to evaluate the rhamnolipids' stability against environmental stresses.

The critical micelle concentration (CMC) of the rhamnolipid products was also measured. Rhamnolipid solutions with concentrations ranging from 0 to 120 mg L⁻¹ were prepared. The surface tension of the solutions was measured. Curves of surface tension against rhamnolipid concentration were prepared. The concentration at the inflection point of the surface tension curve is the CMC of rhamnolipids.

Oily sludge washing experiments

The three rhamnolipid products were investigated for their capacity to remove oil from oily sludge. Experiments and analyses were performed as previously described.²⁶ The oily sludge was sampled from an onshore oilfield in the northwest of China. It contained 13.66% total petroleum hydrocarbons (TPH). Using the extracted rhamnolipids and water, three kinds of rhamnolipid solutions (200 mg L⁻¹) were prepared. In Erlenmeyer flasks, 10 g oily sludge was mixed with 100 mL rhamnolipid solution. Distilled water was used as negative control. The Erlenmeyer flasks were shaken at 180 rpm and 60 °C for 24 h to wash the oily sludge. Then, samples were centrifuged at 5000g for 10 min to separate the oil, water and oil sludge. The washed oil sludge samples were collected. Using tetrachloromethane, TPH in the oily sludge samples were extracted. The extraction liquid was collected and naturally dried at room temperature (28 °C) in 90 mm plates. The weight of TPH was calculated, named as A. The weight of washed-out oil was the initial TPH amount in 10 g oily sludge (1.366 g) minus A. The washing efficiency (%) was defined as the weight of washed-out oil divided by the initial TPH amount (1.366 g) multiplied by 100.

Results and discussion

Rhamnolipid production by the three strains using crude glycerol

As shown in Fig. 1, all three strains can efficiently produce rhamnolipids using crude glycerol, decreasing the surface tension of the culture from 64 mN m⁻¹ to 26 mN m⁻¹. Using crude glycerol, strain SG produced 1.98 g L⁻¹ of rhamnolipids (Fig. 1A), strain PrhLAB produced 2.87 g L⁻¹ of rhamnolipids (Fig. 1B), and strain Rhl produced 0.87 g L⁻¹ of rhamnolipids (Fig. 1C). The results demonstrated that crude glycerol can be used as a good carbon source by different rhamnolipid-producing strains.

The rhamnolipid concentrations in bacterial culture were determined by the oil-spreading method.²³ The linear

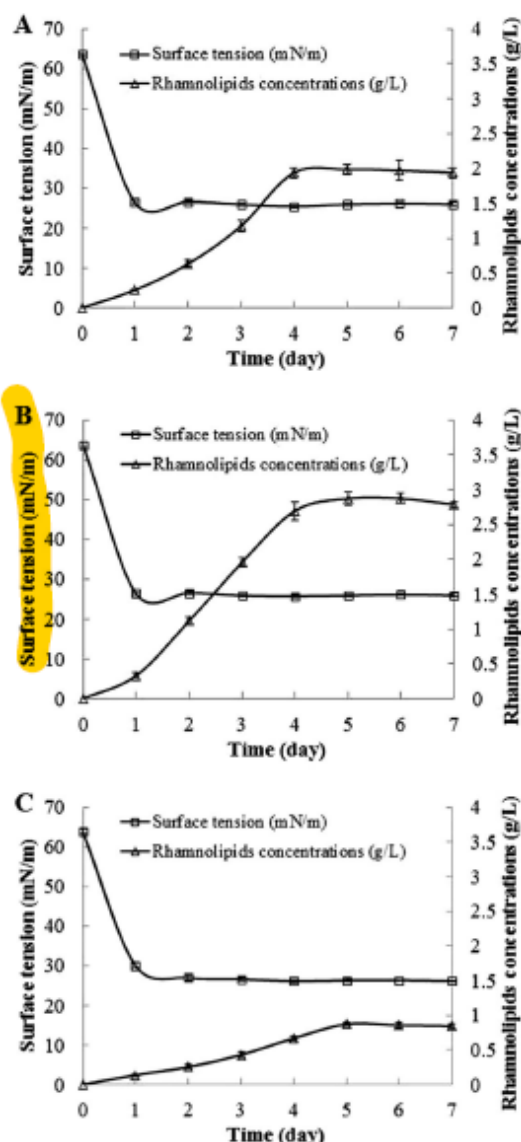


Fig. 1 Rhamnolipid production by strains SG (A), PrhLAB (B) and Rhl (C) grown on crude glycerol.

correlations for quantification of rhamnolipids produced by strain SG, PrhLAB and Rhl were as follows: $y = 0.0624x + 5.4286$, $R^2 = 0.9908$; $y = 0.0609x + 5.9643$, $R^2 = 0.9879$; $y = 0.0602x + 6.7857$, $R^2 = 0.9906$. In the linear correlations, y (mm) is the diameter of the oil-spreading circle, and x (mg L⁻¹) is rhamnolipid concentrations in the bacterial culture. Values of x are between 100 mg L⁻¹ and 800 mg L⁻¹. The linear correlations for quantification of three rhamnolipids were different, which indicated different bioactivity of the three rhamnolipid





Short communication

Bioremediation of petroleum contaminated soil to combat toxicity on *Withania somnifera* through seed priming with biosurfactant producing plant growth promoting rhizobacteria



Amar Jyoti Das, Rajesh Kumar*

Rhizospheric Biology Laboratory, Department of Environmental Microbiology, School for Environmental Sciences, Babasaheb Bhimdeo Ambedkar (A Central) University, VidyaVihar, Raibareilly Road, Lucknow 226 025, India

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 October 2015

Received in revised form

23 January 2016

Accepted 25 January 2016

Available online 25 March 2016

Keywords:

Petroleum toxicity

Bioremediation

Biosurfactant

PCPR

Seed priming

Withania somnifera

ABSTRACT

Soil contaminated by Petroleum oil cannot be utilized for agricultural purposes due to hydrocarbon toxicity. Oil contaminated soil induces toxicity affecting germination, growth and productivity. Several technologies have been proposed for bioremediation of oil contaminated sites, but remediation through biosurfactant producing plant growth promotory rhizobacteria (PGPR) is considered to be most promising methods. In the present study the efficacy of seed priming on growth and pigment of *Withania somnifera* under petroleum toxicity is explored. Seeds of *W. somnifera* were primed with biosurfactant producing *Pseudomonas* sp. AJ15 with plant growth promoting traits having potentiality to utilize petroleum as carbon source. Results indicates that plant arose from priming seeds under various petroleum concentration expressed high values for all the parameters studied namely germination, shoot length, root length, fresh and dry weight and pigments (chlorophyll and carotenoid) as compared to non primed seed. Hence, the present study signifies that petroleum degrading biosurfactant producing PGPR could be further used for management and detoxification of petroleum contaminated soils for growing economically important crops.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Petroleum refinery is an industrial plant which refined the crude oil into useful product such as gasoline, petrol, diesel, kerosene, asphalt base, liquefied petroleum gas and heating oil (Gary and Handwerk, 1984). However in case of an unwanted leakage of petroleum oil and its product might act as a persistent soil and water pollutant (Graj et al., 2013). Soil pollution by petroleum oil induces major changes in the physical and chemical properties of soil ensuing in adverse effect on plant growth. Petroleum oil and its constituents can decrease the availability of oxygen, water and nutrients in soil, which as a result may decline the seed germination rate and effect the plant growth (Nogueira et al., 2011). Several technologies have been introduced for remediation of oil contaminated sites, but bioremediation through microorganisms with the appropriate metabolic capabilities is most promising. Although, optimal rates of hydrocarbon biodegradation by microorganism can

be maintained by the adequate concentration of oxygen, nutrients and pH values, but high hydrophobic nature and low solubility of petroleum hydrocarbon compounds make them highly unavailable to microorganisms (Atlas, 1975; Amund and Nwokoye, 1993; Perry, 1984). Hence release of biosurfactants is one of the strategies used by microorganisms to influence the uptake of petroleum hydrocarbon and hydrophobic compounds (Marin et al., 1996; Johnsen et al., 2005; Obayori et al., 2009; Ron and Rosenberg, 2002). Biosurfactants increases the surface area of hydrophobic water insoluble substrates and increase their bioavailability, thereby enhancing the growth of bacteria and rate of bioremediation. Certain microbial species such as fluorescent pseudomonads are accounted to excrete a various form of partially or totally extracellular biosurfactant that facilitates the uptake of hydrocarbons by reducing the surface tension and enhance the removal of hydrocarbons from the oil contaminated soil (Bento et al., 2005; Franzetti et al., 2010). Various microorganisms have acquired a mechanism to thrive and grow in oil containing environment and play an immense role in treatment by degrading the pollutant (Pothuluri and Cemiglia, 1994; Jurelevicius et al., 2013; Pacwa-Ptocińczak et al., 2016). Petroleum pollutants can be degraded by plants

* Corresponding author.
E-mail address: Rajesh4971@yahoo.com (R. Kumar).

through biochemical reactions taking place within the plants and in the rhizosphere (Hryniewicz and Baum, 2011). The remediation of soils containing petroleum is possible with the use of plants and their rhizosphere processes (Mirsal, 2004; Hryniewicz and Baum, 2011). In this interaction soil microorganism provides nutrients in the rhizosphere which leads to an increased microbial activity and degradation of toxic pollutants (Mirsal, 2004; Hryniewicz and Baum, 2011). Most of the soil bacteria with plant growth promoting traits can be well habituated to harsh soil conditions and enhance the remediation of disturbed soils directly and by plant growth promotion (Hryniewicz and Baum, 2011; Fomina et al., 2005; Wenzel, 2009). Fluorescent pseudomonad (versatile bacteria, gram-negative, motile, rod shaped and non-spore forming) have been reported to promote plant growth in rhizosphere directly by their plant growth promoting traits. These plant growth promoting traits can enhance various stages of plant growth development and combat abiotic stress (Kumar et al., 2013, 2015; Yang et al., 2008). *Withania somnifera* is a medicinal belonging to family Solanaceae, reportedly exhibit antipyretic, anti-inflammatory abortifacient, immunomodulatory and haematopoietic activity (Mishra et al., 2000). Leaves and roots of Indian *W. somnifera* contain active components withaferin-A and withanolide-D, which serve as a source of drugs. But according to Red data book of threatened species *W. somnifera* is an endangered medicinal plant (Anumugam and Gopinath, 2013). So their cultivation is of urgent need, but due to scarcity of agricultural land no much attention has been given for their cultivation. Hence, managing the petroleum contaminated soil with biosurfactant producing bacterial strain for their cultivation could open a new vista for their conservation.

The present investigation was carried out for the management and detoxification of petroleum contaminated soil to reduce the toxic effect of petroleum on the growth and pigments of *W. somnifera* (economically important crop) through seed priming with biosurfactant producing plant growth promoting bacteria having the potentiality utilize petroleum as carbon source.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism

In this present study, a biosurfactant producing microorganism, identified as *Pseudomonas* sp. AJ15, was selected to perform the experiments on the basis of its plant growth promoting traits and ability to degrade petroleum oil. This strain was isolated from petroleum oil contaminated soil and stored in our laboratory. The inoculum was prepared by transferring a loopful of bacterial culture into 25 ml nutrient medium (composition g/l beef extract-3 g, peptone-5 g, NaCl-5 g) in 250 ml Erlenmeyer flask and incubated at 30 °C for 24 h. This inoculum contained 10⁸ cells/ml.

2.2. Screening of the bacterial strain for biosurfactant production

Bacterial strain was tested for biosurfactant production on 500 ml minimal salt medium, MSM (composition g/l MgSO₄ (anhydrous) –0.5, NaNO₃ –2.5, KH₂PO₄ –1.0, FeSO₄ –0.01, KCl –0.1, Na₂HPO₄ –5.67, CaCl₂ –0.1, NH₄NO₃ –0.39, MnSO₄ –0.002, dextrose –15). Further the biosurfactant production was confirmed by various test. Drop collapse test was performed by following the method of Bodour et al., 2003. Haemolytic assay was performed by modifying the method of Plaza et al., 2006 and Mulligan et al., 1984. Emulsification index E₂₄ (%) was determined by following the method of Cooper and Goldenberg (1987). Surface tension reducing ability was measured by following the method of Viramontes-Ramos et al. (2010). Oil displacement test of the isolated crude

biosurfactant was done by Ohno et al., 1993.

2.3. Screening the potentiality of the bacterial strain to utilize petroleum as carbon source

2% (v/v) petroleum oil was mixed with 100 ml minimal salt medium (MSM) to check the potentiality of the bacterial strain to utilize petroleum as carbon source for production of biosurfactant. The incubation was carried out on shaker for 72 h at 30 °C. Culture medium samples were drawn once at every 24 h for estimation of bacterial biomass, biosurfactant production. A minimal salt medium with dextrose as carbon source was used for comparative study. All the experiments were performed in triplicate.

2.4. Plant growth promoting traits

Phosphate solubilization activity was screened on NBRIP medium as per the method described by Nautiyal (1999) and Quantitative analysis of phosphate solubilization (tricalcium phosphate) in liquid medium was estimated by following the method of Jackson 1973. Siderophores production was assayed on the Chrome azurol 5 agar medium according to the method of Schwyn and Neilands (1987). Quantitative analysis of IAA was performed by following the method of Loper and Scroth (1986) at concentrations of 100 and 500 µg/ml of tryptophan.

2.5. Seed priming

Five certified seeds of *W. somnifera* were primed with 1 ml of 48 h grown bacterial cell suspensions of *Pseudomonas* sp. AJ15 by incubating at 22 °C for 4 h. During incubation, seeds were agitated at 150 rpm on a rotary shaker and were air dried overnight at 28 °C. After 2 days storage of the seeds at room temperature, to assure that each seed had between log₁₀⁷ CFU seed⁻¹, the number of bacteria per seed were assessed by grinding samples of ten seeds for 1 min in 1 ml 0.85% NaCl using a sterilised mortar and pestle. Suspensions were serially diluted and plated on TSA (TSB supplemented with 1.6% agar and 100 mg/ml rifampicin). Plates were then incubated at 28 °C in the dark for 48 h before CFUs were counted (Abuamsha et al. 2011).

2.6. Growth profiling to assess the stress effect

The effect of petroleum oil on the growth was conducted according to Sagar et al., 2012. The primed and non primed seeds (10 each) were sown in pots with 1 kg sterilized sandy clay soil with chemical properties [C organic (%) 1.4 ± 0.05, Ca (g Kg⁻¹) 3.5 ± 0.4, N (g Kg⁻¹) 1.19 ± 0.8, Na (g Kg⁻¹) 3.8 ± 0.1, P (g Kg⁻¹) 0.75 ± 0.05, K (g Kg⁻¹) 2.94 ± 0.4, Fe (g Kg⁻¹) 0.155 ± 0.03, Zn (g Kg⁻¹) 0.0038 ± 0.02] amended with 0.88% (10 ml), 2.2% (25 ml) and 4.4% (50 ml) of petroleum oil concentration. Each experimental set consisted of 3 pots. Pots were placed in a growth chamber at 30 °C with a 12 h dark–light cycle. Percentage germination, root/shoot length and fresh/dry weight were recorded after 30 days. Rhizospheric colonization for 5 representative plants from each set was determined by dilution plating of 1 g of rhizospheric soil at 20 day on TSA amended with rifampicin.

2.7. Effect on the pigments

Method of Arnon (1949) was followed to study the effect petroleum oil contamination on carotenoid and chlorophyll content. Briefly, 500 mg of fresh leaf was cut into small piece and homogenized with 10 ml of 80% acetone and centrifuged at 2500 rpm for 10 min at 4 °C. The extract obtained was mixed with 80% acetone

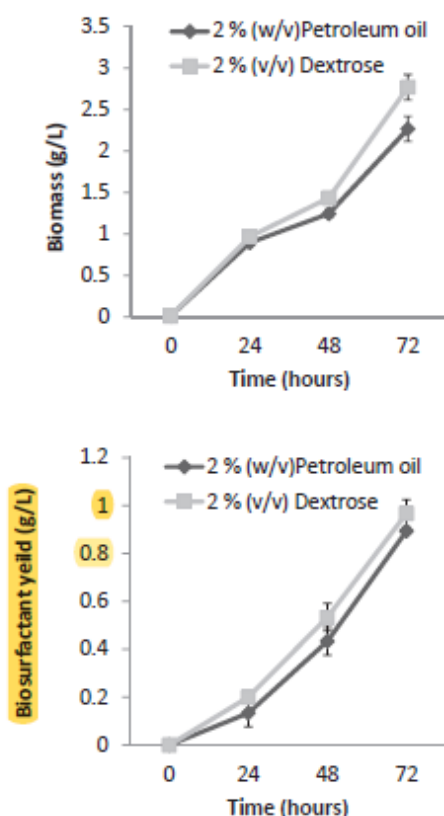


Fig. 1. Potentials of the bacterial strain to degrade and utilized petroleum as carbon source for production of biosurfactant and its comparative analysis with dextrose.

and absorbance was noted at 645, 663 and 480 nm against 80% acetone as blank. Chlorophyll content in milligrams (mg) was estimated using the formula of Arnon (1949). The extract that was used for the chlorophyll estimation was also used for carotenoids estimation. Total carotenoids content was determined by the method of Kirk and Allen (1965).

2.8. Statistical analysis

Experimental results were analysed by using single-factor

ANOVA analysis. Statistical data were expressed as means \pm S.D and differences were considered significant at $p < 0.01$ and $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Screening and characterization of biosurfactant

The test microorganism *Pseudomonas* sp. AJ15 produced bio-surfactant on MSM and formed foam with surfactants. Drop collapse test was positive for surfactant production as the drop spread and collapsed, whereas clear zone in hemolytic assay indicates that the strain produced biosurfactants. Surfactant produced by the strain reduced surface tension up to 30.5 mN/m. Emulsification index of biosurfactant produced by the strain AJ15 is 62.7 for engine oil, whereas 67 for petroleum oil. Emulsification ability of surfactant indicates that strain has the ability to emulsify the petroleum engine oil. The emulsification property is very important as it can be used for several applications like oil recovery and bioremediation of oil spilled sites. During emulsification emulsion is formed in which one liquid phase is dispersed as microscopic droplets in some other continuous liquid phase (Desai and Banat, 1997).

3.2. Utilization of petroleum as carbon source for biosurfactant production

The growth kinetics and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. AJ15 with a 2% (v/v) concentration of petrol oil is represented in Fig. 1. The culture was monitored at every 24 h interval; maximum bacterial biomass of 2.266 ± 0.152 g/L and maximum biosurfactant yield of 0.89 ± 0.011 g/L was obtained at 72 h indicating the strain has the potentiality to degrade and utilized petroleum as carbon source for production of biosurfactant.

3.3. Plant growth promoting traits

In qualitative analysis of phosphate reddish zone around the colonies indicate that the bacterial strain AJ15 has the ability to solubilise phosphate, whereas quantitative test for solubilization of tricalcium phosphate in liquid medium by the test strain showed that strain solubilize tricalcium phosphate up to 91%. Siderophore production on Chrome Azurol-S agar (CAS agar) plates were found to be positive as indicated by change in colour of the media around the colonies. Quantitative estimation of Indole acetic acid (IAA) in the presence of 100 and 500 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of tryptophan indicates that the strain was able to produce good amount of IAA (Table 1). Hence, *Pseudomonas* sp. AJ15 possess plant growth promoting traits such as phosphate solubilization, Indole Acetic Acid (IAA) and siderophore production which signifies that the strain has the tendency to promote plant growth in petroleum

Table 1
Comparative study of IAA production by *Pseudomonas* sp. AJ15 with various fluorescent *Pseudomonas*.

Strain	Tryptophan concentration ($\mu\text{g/ml}$)	IAA production ($\mu\text{g/ml}$)	References
Fluorescent <i>Pseudomonas</i> Ps ₇	150	5.90 \pm 0.20	Ahmad et al., 2008
	500	18.07 \pm 0.25	
Fluorescent <i>Pseudomonas</i> Ps ₉	150	6.10 \pm 0.20	Ahmad et al., 2008
	500	22.02 \pm 0.20	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1	200	12.82	Ćolo et al., 2014
	500	12.93	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2	200	7.68	Ćolo et al., 2014
	500	11.0	
<i>Pseudomonas</i> sp. AJ15	100	3.1 \pm 0.5	Present study
	500	16.3 \pm 0.8	

Study of metabolic network of *Cupriavidus necator* DSM 545 growing on glycerol by applying elementary flux modes and yield space analysis

Markan Lopar · Ivna Vrana Špoljarić ·
Nikolina Capanec · Martin Koller · Gerhart Braunegg ·
Predrag Horvat

Received: 18 December 2013 / Accepted: 13 March 2014 / Published online: 9 April 2014
© Society for Industrial Microbiology and Biotechnology 2014

Abstract A metabolic network consisting of 48 reactions was established to describe intracellular processes during growth and poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production for *Cupriavidus necator* DSM 545. Glycerol acted as the sole carbon source during exponential, steady-state cultivation conditions. Elementary flux modes were obtained by the program Metatool and analyzed by using yield space analysis. Four sets of elementary modes were obtained, depending on whether the pair NAD/NADH or FAD/FADH₂ contributes to the reaction of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GLY-3-P DH), and whether 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PG DH) is present or not. Established metabolic network and the related system of equations provide multiple solutions for the simultaneous synthesis of PHB and biomass; this number of solutions

can be further increased if NAD/NADH or FAD/FADH₂ were assumed to contribute in the reaction of GLY-3-P DH. As a major outcome, it was demonstrated that experimentally determined yields for biomass and PHB with respect to glycerol fit well to the values obtained in silico when the Entner–Doudoroff pathway (ED) dominates over the glycolytic pathway; this is also the case if the Embden–Meyerhof–Parnas pathway dominates over the ED.

Keywords *Cupriavidus necator* · Elementary flux modes · Glycerol · PHB · Yield space analysis

Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) serve as carbon- and energy-storage compounds in microorganisms and genetically modified plants [5]. They are natural, biodegradable macromolecules with material traits similar to those of synthetic petrochemically derived plastics and are accessible by the biotechnological conversion of renewable sources [17]. The downside of such processes for industrial biopolymer manufacturing is still the product price. The use of different inexpensive waste materials for PHA biosynthesis is a promising strategy for reducing production costs and, at the same time, handling industrial waste-disposal problems [16]. Among all described PHAs, the homopolymer poly-3-hydroxybutyrate (PHB) is the most common representative in nature and, since decades, the most profoundly investigated.

Biodiesel is a biofuel produced through transesterification of vegetable oils or animal fats [15]. Glycerol emerging from biodiesel production (principal by-product of the process; mass ratio of biodiesel to glycerol is 9:1) at increasing quantities [14, 15], constitutes a potential carbon substrate for PHA production.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10295-014-1439-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Lopar · I. V. Špoljarić · N. Capanec · P. Horvat
Department of Biochemical Engineering, Faculty of Food
Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Pierottijeva
6/IV, 10000 Zagreb, Croatia

M. Koller
Institute of Biotechnology and Biochemical Engineering, Graz
University of Technology, Petersgasse 12, 8010, Graz, Austria

M. Koller · G. Braunegg
ARENA, Arbeitsgemeinschaft für Ressourcenschonende
and Nachhaltige Technologien, Graz University of Technology,
Inffeldgasse 23, 8010 Graz, Austria

M. Koller (✉)
Institute of Chemistry, University of Graz, Stremayrgasse 16/IV,
8010 Graz, Austria
e-mail: martin.koller@uni-graz.at

Analytical procedures

Determination of cell dry mass (CDM)

A gravimetric method was used to determine the biomass concentration expressed as CDM in fermentation samples. Five milliliters of culture broth was centrifuged in pre-weighed glass screw-cap tubes for 10 min at 10 °C and 4,000 rpm in a Heraeus Megafuge 1.0 R refrigerated centrifuge. The supernatant was decanted and used for substrate analysis. The cell pellets were washed with distilled water, re-centrifuged, frozen, and lyophilized to a constant mass. CDM was determined as the mass difference between the tubes containing cell pellets and empty tubes. The determination was done in duplicate. The lyophilized pellets were subsequently used for determination of intracellular PHB as described below. Residual biomass (non-PHB part of biomass) was calculated by subtracting of PHB mass from CDM mass.

GC-FID analysis of PHB

PHB in lyophilized biomass samples was transesterified by acidic methanolysis according to Braunegg's method [1]. Gas chromatographic analysis was performed with a 6850 Network GC System (Agilent Technologies), equipped with a 25 m × 0.32 mm × 0.52 μm HP5 capillary column and a flame ionization detector (FID). Helium (Linde; purity = 4.6) was used as a carrier gas with a split-ratio of 1:5, hydrogen (Linde; purity = 5.0) and synthetic air (Linde; purity = "free of hydrocarbons") as detector gases and nitrogen (Linde; purity = 5.0) as auxiliary gas.

The following protocol for the temperature program was used: Initial temperature: 50 °C; rate 1:15 °C/min; final temperature 1:60 °C; rate 2:2 °C/min; final temperature 2:80 °C; final temperature 3:300 °C; final time 3:5 min. The determination of all samples was done in duplicate. The methyl esters of PHB constituents were detected by a flame ionization detector (FID); carrier gas: helium (split-ratio of 1:10), injection volume of 1 μL. The co-polyester Poly(3HB-co-15.6 %-3HV) (BIOPOL, ICI, UK) was used as reference material and hexanoic acid acted as the internal standard. The PHB content (wt %) was defined as the percentage of PHB concentration to dry cell mass (CDM).

Ammonia determination

A commercially available test (Merck, Spectroquant, 1.00683.0001) was used following the principle of ammonia reacting with hypochlorite ions to monochloramine, which further reacts with substituted phenol to form a blue indophenol derivative. This complex can be determined photometrically at 690 nm using a Genesys 10S UV-Vis

Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). The measuring range of the test for ammonium is 6–193 mg/L. Ammonium sulphate was used as reference. Deionized water was used as zero reference.

Glycerol determination

Glycerol concentration in supernatant (remaining after the centrifugation step described in 2.2.1) was monitored using a high-performance liquid chromatography (HPLC; Shimadzu) equipment consisting of a thermostated Aminex HPX 87H column (thermostated at 75 °C, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a LC-20AD pump, a SIC-20 AC autosampler, a RID-10A refractive index detector, and a CTO-20 AC column oven. For registration and evaluation of the data, LC solution software was used. Sterile-filtered supernatant was transferred into vials and water was used as eluent at a flow rate of 0.6 mL/min. External standards were prepared using different concentrations of p.a. glycerol.

Cultivation conditions

Inoculum preparation

Colonies from solid agar slants (2.1) were cultivated in small baffled shaking flasks (100 mL medium in 300-mL flasks) at 37 °C under continuous shaking in liquid minimal media containing glycerol as the sole carbon source. After sufficient growth of the strain was achieved, large baffled shaking flasks (1 L) containing fresh medium (250 mL) were inoculated with each 5 mL of the first liquid cultures. These large cultures were incubated overnight under continuous shaking at 37 °C and subsequently used as inoculum cultures for the bioreactor experiment.

Cultivation in bioreactor

The cultivation was carried out aerobically in a laboratory bioreactor (Labfors 3, Infors, CH, working volume 5 L; glass vessel stirred from the upper side) under controlled conditions for pH value (7.1 ± 0.1), temperature (37 °C), and dissolved oxygen concentration pO_2 (controlled by agitation speed of two axial stirrers and air flow rate; during growth phase, pO_2 amounted to 40 %, during the phase of predominant PHB-accumulation to 20 % of the oxygen saturation concentration). The sterilization of the reactor equipment and the relevant accessories (feed bottles, nutrients) was accomplished via heat sterilization in an autoclave. All relevant cultivation parameters (pH value, temperature, pO_2) as well as the addition of substrate feed, pH-value correcting agents, antifoam agent, etc., were monitored automatically using INFORS IRIS software version 5.

RESEARCH

Open Access



Feasibility of biodiesel production and CO₂ emission reduction by *Monoraphidium dybowskii* LB50 under semi-continuous culture with open raceway ponds in the desert area

Haijian Yang¹, Qiaoning He^{1,2} and Chunxiang Hu^{1*}

Abstract

Background: Compared with other general energy crops, microalgae are more compatible with desert conditions. In addition, microalgae cultivated in desert regions can be used to develop biodiesel. Therefore, screening oil-rich microalgae, and researching the algae growth, CO₂ fixation and oil yield in desert areas not only effectively utilize the idle desertification lands and other resources, but also reduce CO₂ emission.

Results: *Monoraphidium dybowskii* LB50 can be efficiently cultured in the desert area using light resources, and lipid yield can be effectively improved using two-stage induction and semi-continuous culture modes in open raceway ponds (ORPs). Lipid content (LC) and lipid productivity (LP) were increased by 20% under two-stage industrial salt induction, whereas biomass productivity (BP) increased by 80% to enhance LP under semi-continuous mode in 5 m² ORPs. After 3 years of operation, *M. dybowskii* LB50 was successfully and stably cultivated under semi-continuous mode for a month during five cycles of repeated culture in a 200 m² ORP in the desert area. This culture mode reduced the supply of the original species. The BP and CO₂ fixation rate were maintained at 18 and 33 g m⁻² day⁻¹, respectively. Moreover, LC decreased only during the fifth cycle of repeated culture. Evaporation occurred at 0.9–1.8 L m⁻² day⁻¹, which corresponded to 6.5–13% of evaporation loss rate. Semi-continuous and two-stage salt induction culture modes can reduce energy consumption and increase energy balance through the energy consumption analysis of life cycle.

Conclusion: This study demonstrates the feasibility of combining biodiesel production and CO₂ fixation using microalgae grown as feedstock under culture modes with ORPs by using the resources in the desert area. The understanding of evaporation loss and the sustainability of semi-continuous culture render this approach practically viable. The novel strategy may be a promising alternative to existing technology for CO₂ emission reduction and biofuel production.

Keywords: Microalgae, Lipid production, Semi-continuous culture, CO₂ fixation, Open raceway ponds, Desert area, Evaporation

*Correspondence: cxhu@hbc.cn

¹ Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences (CAS), Wuhan 430072, China

Full list of author information is available at the end of the article

(Additional file 1: Figure S1). Two scales of ORPs at 5 and 200 m² were utilized. The length, width, and maximum depth were 4.80, 1.05, and 0.60 m and 34.50, 5.80, and 0.60 m in 5 and 200 m² illuminated areas of ORP, respectively (Additional file 1: Figure S1). The culture depth in raceway ponds was set to 20 cm, with 1000 and 40,000 L culture volumes. A stainless steel paddlewheel, 0.80 m in diameter, was used for the circulation of the cultures in 5 and 200 m² ORPs at 0.35 and 0.25 m s⁻¹, respectively. Microalgae were cultivated using a modified BG11 medium containing 0.25 g L⁻¹ urea, but 0.1 M NaHCO₃ was added to the medium used for *M. dybowskii* LB50. The medium was thoroughly compounded with groundwater. A series of scale-up pre-cultivation was employed (Additional file 1: Figure S1). Water in the system was replenished every day to prevent serious evaporative losses in the open raceway system. Cell concentration measured as an OD₆₈₀ of 0.1 was inoculated into the culture in 5 and 200 m² ORPs.

After pre-cultivation, the batch culture was conducted with three microalgae in 5 m² ORP (1000 L) to select the optimal stain for lipid production.

For two-stage salt induction culture in 5 m² ORPs, *M. dybowskii* LB50 was cultivated in 5 m² ORPs outdoors. On the 10th day, which is at the late-exponential growth phase, NaCl and industrial salts (Hubei Guangyan Liantian salt chemical co., Ltd, China. Additional file 2: Table S1) were added at final concentrations of 0 and 20 g L⁻¹. Industrial salts, often referred in China to NaCl, NaOH (caustic soda), and Na₂CO₃ are widely used in the industry. In the current study, the main component of industrial salt was NaCl. Industrial salt can be inexpensive and is easily produced because of the low purity. Day 0 was assumed as the time of salt addition.

For semi-continuous cultivation, further experiments were conducted with semi-continuous mode in two ORP scales. Two-thirds of the culture was harvested, and the remaining culture was used as the seed for subsequent batches and replaced by the same volume of nutrition-rich growth media containing half of the urea concentration. The algal culture was harvested every 3 or 4 days. The semi-continuous experiment was carried out in a 200 m² ORP for a month.

The water used for algal cultivation was pumped from the ground and contained 89.39 ppm Na⁺, 62.92 ppm SO₄²⁺, and low levels of K⁺ (1.69 ppm), Mg²⁺ (13.65 ppm), Ca²⁺ (12.66 ppm), Cl⁻ (24.12 ppm), and NO₃⁻ (1.41 ppm) [13].

Analytical procedures

Biomass measurement

Biomass productivity (BP, mg L⁻¹ day⁻¹) was calculated according to Eq. (1):

$$BP = (B2 - B1)/t, \quad (1)$$

where *B2* and *B1* represent the DW biomass density at time *t* (days) and at the start of the experiment, respectively.

Algal density was determined by measuring the OD₆₈₀—the optical density of algae at 680 nm. The relationships between the DW (g L⁻¹) and the OD₆₈₀ values of the algae were described using Eqs. (2–4):

$$\begin{aligned} DW &= 0.2122 \times OD - 0.0037 \\ R^2 &= 0.9888 \quad (M. dybowskii \text{ LB50}), \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} DW &= 0.2866 \times OD - 0.0052 \\ R^2 &= 0.991 \quad (Micractinium \text{ sp. XJ-2}), \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} DW &= 0.217 \times OD - 0.0089 \\ R^2 &= 0.9947 \quad (P. falcate \text{ XJ-176}). \end{aligned} \quad (4)$$

The cells were harvested by centrifugation and baked in an oven.

Lipid analysis

Total lipid was extracted from approximately 80–100 mg of the dried algae (*w*₁) using a Soxhlet apparatus, with chloroform–methanol (1:2, v/v) as the solvent. Total lipid was transferred into a pre-weighed beaker (*w*₂) and blow-dried in a fume cupboard. The lipid was dried to a constant weight in an oven at 10 °C and weighed (*w*₃).

LC (%) and the LP (mg L⁻¹ day⁻¹) were determined according to Eqs. (5, 6):

$$LC (\%) = (w_3 - w_2)/w_1 \times 100, \quad (5)$$

$$LP (\text{mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}) = BP \times LC. \quad (6)$$

Determination of urea concentration

Urea concentration was determined following the protocol outlined by Beale and Croft [22]. The liquid sample collected from the raceway pond was filtered using a 0.22 μm-pore filter and then diluted 60-fold with deionized water for each sample. The sample was collected and mixed with 1 volume of diacetylmonoxime–phenylanthranilic acid reagent (1 volume of 1% w/v diacetylmonoxime in 0.02% acetic acid and 1 volume of phenylanthranilic acid in 20% v/v ethanol with 120 mM NaCO₃). Exactly, 1 mL of activated acid phosphate (1.3 M NaH₂PO₄, 10 mM MnCl₂, 0.4 mM NaNO₃, 0.2 M HCl in 31% v/v H₂SO₄) was added before incubation in boiling water for 15 min. The tubes were left to