

**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 Наталія \_\_\_\_\_  
(підпис) (прізвище та ініціали)

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 р.

«До захисту допущено»  
Завідувач кафедри  
\_\_\_\_\_ Стабніков Віктор \_\_\_\_\_  
(підпис) (прізвище та ініціали)

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)  
освітньо-професійної програми «Промислова біотехнологія»  
на тему: Біотехнологічні аспекти отримання препаратів на основі бактеріофагів для контролю збудників бактеріальних хвороб хрестоцвітих

Виконав: здобувач II курсу, групи 1

\_\_\_\_\_ Кутрик Іван Володимирович \_\_\_\_\_  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Буценко Людмила Миколаївна \_\_\_\_\_  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Моцар В.С. \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2022 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології  
Освітній ступінь магістр  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)  
Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»  
(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор Стабніков

« 03 » листопада 2021 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Кутрику Івану Володимировичу

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологічні аспекти отримання препаратів на основі бактеріофагів для контролю збудників бактеріальних хвороб хрестоцвітих

керівник роботи Буценко Л.М., д.б.н., доцент,

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від 02 листопада 2021 року

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Xanthomonas campestris*, цільовий продукт: бактеріофаг для контролю збудників бактеріальних хвороб хрестоцвітих

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

РОЗДІЛ 1. Збудник слизового бактеріозу та застосування фагів для його контролю.

РОЗДІЛ 2. Застосування пестицидів для контролю збудника слизового бактеріозу.

РОЗДІЛ 3. Аналіз особливостей отримання бактеріофагів, які синтезуються в бактеріях

роду *Xanthomonas*. РОЗДІЛ 4. Аналіз особливостей отримання бактеріофагів відмінних

від *Xanthomonas*. РОЗДІЛ 5. Сфера застосування бактеріофагів. РОЗДІЛ 6. Техніко-

економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми.

РОЗДІЛ 8. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 9. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ

10. Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема виробництва 1 аркуш формату А2. Апаратурна схема – 1 аркуш формату А1 та 1 аркуш формату А2.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання   03 листопада 2021 року  

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Збудник слизового бактеріозу та застосування фагів для його контролю	03.11.2021 - 10.11.2021	
2	Застосування пестицидів для контролю збудника слизового бактеріозу	11.11.2021 - 18.11.2021	
3	Аналіз особливостей отримання бактеріофагів, які синтезуються в бактеріях роду <i>Xanthomonas</i>	19.11.2021 - 25.11.2021	
4	Аналіз особливостей отримання бактеріофагів відмінних від <i>Xanthomonas</i>	26.11.2021 - 05.12.2021	
5	Сфера застосування бактеріофагів	06.12.2021 - 27.12.2021	
6	Техніко-економічне обґрунтування	28.12.2021 - 10.01.2022	
7	Обґрунтування вибору технологічної схеми	11.01.2022 - 16.01.2022	
8	Специфікація обладнання	17.01.2022 - 23.01.2022	
9	Опис технологічної схеми	23.01.2022- 25.01.2022	
10	Контроль виробництва	25.01.2022- 29.01.2022	
11	Оформлення пояснювальної записки	29.01.2022- 03.02.2022	
12	Виконання графічної частини роботи	29.01.2022- 03.02.2022	

Здобувач \_\_\_\_\_  
( підпис )

Кутрик І.В.  
(прізвище та ініціали)

Керівник роботи \_\_\_\_\_  
( підпис )

Буценко Л.М.  
(прізвище та ініціали)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем виробництва протимікробного препарату на основі бактеріофагу Хссф1, що включає в себе культивування бактерій *Xanthomonas campestris*, які слугують клітинами-хазяїном для бактеріофагу. Даний препарат є новим у сільськогосподарській промисловості і виступає, як альтернатива пестицидам для контролю збудника судинного бактеріозу рослин роду Хрестоцвіті.

Технологічний процес включає в себе наступні допоміжні стадії: підготовка стерильного аераційного повітря, підтримання колекційної культури *Xanthomonas campestris*, бактеріофагу Хссф1, підготовка посівного матеріалу *Xanthomonas campestris* в шейкері-інкубаторі, підготовки посівного матеріалу бактеріофагу Хссф1, приготування та стерилізація поживних для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л, 500 л та власне технологічних етапів виробництва: виробничого культивування в ферментері 5000 л, вирощування інокуляту в ферментерах 50 та 500 л, виробничий біосинтез в ферментері 5000 л, відділення біомаси, концентрування та очищення фільтрату, пакування, а також стадії знешкодження і переробки відходів Дані технологічні процеси здійснюються за допомогою обладнання (збірники, реактори, ферментери, центрифуги тощо), яке наведене в специфікації цього проекту.

Дана робота складається зі вступу, десяти розділів, списку використаної літератури з 88 найменувань, графічних матеріалів: апаратурної схеми формату двох листів А1 та технологічної схеми формату лист А2 та А3. Загальний обсяг роботи – 86 сторінок, 4 рисунків та 9 таблиць.

**Ключові слова:** *Xanthomonas campestris*, бактеріофаг, фагопрепарат, поживне середовище, біосинтез, виділення, хрестоцвіті, контроль збудника.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. Збудник слизового бактеріозу та застосування фагів для його контролю .....	10
РОЗДІЛ 2. Застосування пестицидів для контролю збудника слизового бактеріозу .....	18
РОЗДІЛ 3. Аналіз особливостей отримання бактеріофагів, які синтезуються в бактеріях роду <i>Xanthomonas</i> .....	25
РОЗДІЛ 4. Аналіз особливостей отримання бактеріофагів відмінних від <i>Xanthomonas</i> .....	29
РОЗДІЛ 5. Сфера застосування бактеріофагів .....	35
РОЗДІЛ 6. Техніко-економічне обґрунтування.....	38
6.1 Потреба у цільовому продукті .....	38
6.2 Розрахунок потужності виробництва.....	40
6.3 Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері.....	41
6.4 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в посівному апараті на третьому етапі.....	42
6.5 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в посівному апараті на другому етапі .....	43
6.6 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбі з використанням шейкера-інкубатора.....	43
6.7 Розрахунок кількості посівного матеріалу бактеріофагу для культивування в ферментері 5000 л .....	43
РОЗДІЛ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	45
7.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та середовища для його культивування.....	45
7.2 Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера.....	50
7.3 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища .....	52
7.4 Обґрунтування вибору стадій підготовки стерильного аераційного	

повітря .....	53
7.5 Обґрунтування культивування бактеріофагу.....	55
7.6 Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту .....	55
7.7 Обґрунтування пакування цільового продукту .....	65
РОЗДІЛ 8. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ .....	66
РОЗДІЛ 9. Опис технологічної схеми .....	70
РОЗДІЛ 10. Контроль виробництва.....	80
10.1 Мікробіологічний контроль .....	80
10.2 Концентрація біомаси .....	80
10.3 Концентрація цільового продукту .....	81
10.4 Концентрація джерела вуглецю і азоту .....	82
10.5 Визначення літичної активності бактеріофагів .....	82
10.6 Визначання титру фага на твердому поживному середовищі.....	83
Список використаної літератури: .....	92

## ВСТУП

Вирощування сільськогосподарських рослинних культур забирає величезний обсяг ресурсів – енергетичних, людських тощо. При цьому приблизно третина того, що вирощується, потрапляє на звалище. Щось гниє на складах під час зберігання та на полицях магазинів під час продажу, щось викидають на смітник споживачі, але суттєву частину складає врожай, втрачений через шкідників, в тому числі, фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби є проблемою для багатьох агрокультур по всьому світу, зокрема для Хрестоцвітих рослин. Їх збудниками виступають грамнегативні бактерії, які так само швидко набувають стійкості до пестицидів, як людські патогени – до антибіотиків. І так само, як у випадку з людськими патогенами, для боротьби с фітопатогенами вчені вирішили звернутися по допомогу до природних ворогів бактерій – бактеріофагів (фагів). На відміну від пестицидів та антибіотиків, фаги високоспецифічні – вбивають лише певний вид або навіть штам бактерії, не впливаючи на корисну мікрофлору – в кишечнику, в ґрунті, будь-де [1].

Аналіз динаміки розвитку хвороб капусти показує, що бактеріози є найпоширенішими та найшкідливішими хворобами. При обстеженні посадок капусти ознаки судинного бактеріозу виявлялися через три-чотири тижні після висажування розсади в ґрунт. Нижні листки жовтіли починаючи з країв ставали крихкими і опадали. На пожовтілих частинах жилки темнішали. В подальшому симптоми хвороби спостерігали на головках у вигляді судинного кільця, штрихів. У фазу утворення головки рослини недорозвивалися, головка не зав'язувалась [2].

Різного роду механізми виживання є й в інших форм життя — вірусів. Майже кожний відомий нині вид бактерій є хазяїном для одного або кількох вірусів (бактеріофагів).

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Кутрик І.В.				ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							7	102
Керівник	Буценко Л.М.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

Фаги бактерій поширені майже у всіх екосистемах: у ґрунті, воді, повітрі, фекаліях людей і тварин, промислових і побутових стоках тощо. Вони є одним із елементів цих систем, відповідно, спектр бактеріальних патогенів, що можуть бути мішенями фагів, досить широкий. Це робить їх ваговою альтернативою антибіотикам й ідеальною «зброєю» проти мікроорганізмів [3].

Останнім часом вітчизняні і зарубіжні науковці багато уваги приділяють вивченню питань ефективного і безпечного застосування бактеріофагів у сільському господарстві – для захисту рослин.

В даний час застосування бактеріофагів для ідентифікації та боротьби зі збудниками бактеріальних хвороб рослин є швидко розширюваним напрямком, в зв'язку з чим бактеріофаги можуть бути використані в якості ефективних антибактеріальних препаратів. Застосування фагових біопрепаратів в різних методиках (в тому числі реакція наростання титру фага) дозволяє здійснювати контроль і аналізувати кількісний та якісний склад виділених бактерій, що на відміну від класичних бактеріологічних методів займає значно менше часу [4].

Для отримання бактеріофагу проти бактеріальних захворювань рослин (бактеріозів) зазвичай використовують бактерії роду *Xanthomonas*, оскільки саме бактерії даного роду спричиняють найбільше захворювань рослин. При культивуванні цих бактерій можливо одержати досить високий вихід бактеріофагу, що попередить розповсюдження бактеріозів серед сільськогосподарських культур [5].

Судинний бактеріоз хрестоцвітних, що спричиняється бактерією *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, є одним з найбільш небезпечних захворювань сільськогосподарських культур. Він вражає практично всі відомі рослини, що відносяться до роду Хрестоцвіті (*Brassicaceae*), більшість представників якого є культури, що мають важливе продовольче значення. Захворювання може призвести до значних втрат, особливо в теплих і вологих умовах. Стандартні методи боротьби з даним захворюванням, до яких відносять використання насінневого матеріалу гарної якості, сівозміну, вирощування менш сприйнятливих сортів, не забезпечують задовільного

контролю захворювань, особливо коли погодні умови сприяють поширенню збудника. У зв'язку з цим спостерігається зростання ролі бактеріофагів з одного боку, як ефективний засіб ідентифікації бактерій-збудників хвороб рослин роду *Xanthomonas*, а з іншого, як перспективний засіб для боротьби з ними.

**Актуальність теми:** полягає в пошуку альтернативних антибіотичних препаратів, а саме препаратів на основі фаголізату, оскільки дані препарати не викликають резистентності бактерій та діють прицільно на збудник хвороби за рахунок спеціальних механізмів адсорбції.

**Новизна :** запропоновано використання технології, яка включає в себе застосування шейкера-інкубатора для отримання посівного матеріалу фагу та культури на початкових стадіях. Він оснащений датчиком оптичної густини який дає можливість постійно контролювати рівень біомаси в колбі. Також в даній роботі передбачене застосування проточної центрифуги для осадження клітинного дебрису та клітин що не лізувались та мікро-ультрафільтраційного модулю для остаточного очищення та концентрування фагів.

## РОЗДІЛ 1. Збудник слизового бактеріозу та застосування фагів для його контролю

У природі рослини завжди знаходяться під загрозою шкідників та захворювань. Патогенні бактерії є одним з основних видів патогенних мікроорганізмів, що викликають захворювання у різних рослин, що призводить до негативного впливу на ріст рослин і врожайність сільськогосподарських культур. Хімічні бактерициди та антибіотики використовувались як основні підходи для боротьби з бактеріальними хворобами рослин на полі або в теплиці. Однак поява стійких до поширених антибіотиків та бактерицидів бактерій, а також їх потенційний негативний вплив на навколишнє середовище та здоров'я людини вимагає від бактеріологів розробки альтернативних засобів контролю. Бактеріофаги, віруси, які можуть дуже конкретно заражати та вбивати лише бактерії-мішені, були продемонстровані як потенційні агенти, які можуть не мати негативного впливу на навколишнє середовище та здоров'я людини. Багато бактеріофагів було виділено проти різноманітних рослинних патогенних бактерій, і багато досліджень показали, що ефективно управляють розвитком хвороби як в контрольованих, так і у відкритих умовах, таких як теплиця та поле. Більше того, специфічність бактеріофагів до певних видів бактерій застосовується для розробки засобів виявлення для діагностики рослин-патогенних бактерій [6].

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* відомий як збудник хвороби чорної гнилі, яка атакує переважно хрестоцвітих, сильно знижуючи їх глобальну продуктивність. Одним з основних факторів вірулентності цього збудника є його здатність проникати та утворювати структуру біоплівки в судинах ксилеми. Відкриття нових підходів до управління хворобами сільськогосподарських культур є терміновим, і можливе лікування може бути спрямоване на знищення біоплівки, хоча антибіофільні підходи в

					<b>НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Лист</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Кутрик І.В.			Розділ 1. Дослідження та аналіз збудника бактеріозів рослин, та бактеріофагів проти цих збудників	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
Консульт.							10	102
Керівник		Буценко Л.М.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

сільськогосподарській мікробіології все ще рідкісні. Беручи до уваги багатофакторний характер біоплівки, ефективний підхід проти *Xanthomonas campestris* передбачає використання багатоцільової або комбінаторної стратегії. У цій роботі [7] розглядається стратегія боротьби з біоплівкою, заснована на застосуванні жирних кислот та бактеріофагів (Хссф1). Було продемонстровано синергічну дію цих елементів та ефективне видалення зрілої біоплівки *Xanthomonas campestris*, що робить запропонований підхід ефективним рішенням для підвищення виживання рослин при інфекціях *Xanthomonas campestris*.

Бактеріальна біоплівка забезпечує бактеріям стійкість та захист від звичайних антимікробних засобів. Відомо, що бактеріофаги пересуваються по біоплівці, щоб зробити її проникною для антимікробних препаратів. В даній роботі вчені намагаються показати ефективність комбінованого використання фагів проти біоплівки *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Вчені використовували метаболоміку на основі ядерного магнітного резонансу (ЯМР) для дослідження молекулярних детермінант, пов'язаних з літичною дією, з метою виявлення метаболічних шляхів, нерегульованих фаговою обробкою. Крім того, науковці виявили специфічні маркери (амінокислоти, лактат та галактоманнан), які беруть участь у контролі стабільності біоплівки. Дані показують, що фаг Хссф1 втручається в метаболічні шляхи, що беруть участь у формуванні біоплівки [8].

З зразків ґрунту, під зараженими судинним бактеріозом рослин капусти, було виділено 21 ізолятів бактеріофагів, специфічних для 11 штамів-мішеней *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Електронно-мікроскопічне дослідження морфології бактеріофагів дозволило віднести 3 ізолята до сімейства *Siphoviridae*, а інші 18 зразків - до сімейства *Myoviridae*. В результаті аналізу даних фаготипування, 73 штами фітопатогена по відношенню до нових виділених ізолятів та 4 колекційним штамам бактеріофагів пропонується створити фаговий коктейль із ізоляторів BT2, SM10, Ph30-1, Ph44, DB1 і Tir2, які входять у сукупність способів інфікування 88% *Xanthomonas campestris* pv.

*campestris*. Попередні дослідження на декількох ізолятах бактеріофагів показали в модельних експериментах перспективність їх використання для обробки насіння капусти. Так, при обробці штучно заражених насіння бактеріофагами зараженість розсади капусти знизилась в 2,0-4,1 рази в порівнянні з контролем. Оброблення зерен капусти, сорту «Московська поздня 15» з високою зараженістю патогеном (25,6%) коктейлем бактеріофагів, привела до значного зниження зараженості проростків судинним бактеріозом. Біологічна ефективність застосування коктейлю бактеріофагів складала 90,6% [9].

Досліджено колекцію з 24 слабопатогенних штамів плямистості листя *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Насіння капусти, які досліджували вчені, обробляли слабо патогенними штамми *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* та висівали в 8-сантиметрові горщики, вирощування відбувалось за стандартних умов (20-24°C, 16 годин світлового дня). Розвиток захворювання оцінювали через 16 днів після висадження. Генетичне різноманіття плямистості листя було визначено шляхом секвенування фрагментів трьох домових генів (*ahyR*, *nrdB* та *purA*), які показали від 97-100% ідентичності штамів *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* типу, за винятком делеції 12 bp у гені *ahyR* (кворум, що сприймає гомологи LuxRI ХСС2818 геному Хсс АТСС 33913 (NCPPB 528)). Дані показали, що на рослинах, оброблених суспензією з 5 бактеріофагів, пригнічувався розвиток чорної гнилі, у порівнянні з контрольними рослинами, обробленими водою або непатогенними бактеріями. Обробка насіння капусти суспензією з 5 бактеріофагів, призвело до значного зменшення зараження чорною гниллю саджанців. Оціночна біологічна ефективність бактеріофагової суспензії досягла 90,6 % [10].

У роботі вчених на чолі з *Fernanda Pereira da Silva* досліджено збудник чорної гнилі хрестоцвітих - *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* та виділено вірус з цвітної капусти, який заражає *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Здатність літичних бактеріальних вірусів лізувати клітини збудника та проблеми у боротьбі з бактеріальними захворюваннями у рослин викликали інтерес до застосування фаготерапії в сільському господарстві.

Морфологічний, молекулярний та філогенетичний аналіз показав, що ізолюваний вірус є новим представником роду *Pbunavirus*, сімейства *Myoviridae*. Також вчені запропонували назву для вірусу – *Xanthomonas virus* ХС 2. Ізолюваний вірус має вузький діапазон бактеріолітичної дії, тому здатний заражати лише ізоляти *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, та не вражає інших філогенетично споріднених представників. Ці результати вказують на те, що ізолюваний бактеріофаг є дуже специфічним для *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* і може бути потенційним агентом для біологічного контролю збудника чорної гнилі хрестоцвітних [11].

Група закордонних науковців оцінювали біологічну активність бактеріофагів при обробці насіння капусти, зараженої чорною гниллю за допомогою тепличних експериментів. Штучне зараження насіння капусти культурою *X. campestris* Tir2 і культурою *X. campestris* 276NZ проведено у вакуумі. Експерименти проводились з колекцією штамів *X. campestris* pv. *campestris*. Зразки ґрунту для виділення бактеріофагів були зібрані влітку 2014 року з кількох капустяних полів, де раніше реєстрували епідемії чорної гнилі. Розвиток чорної гнилі було зафіксовано через 30, 40 та 50 днів після посіву. Попередня обробка бактеріофагами насіння, зараженого патогеном чорної гнилі призвело до значного зниження концентрації життєздатних клітин збудника в екстрактах насіння та зменшення захворюваності в розсаді капусти у 2,0–4,1 рази порівняно з контролем [12].

Виявлено, що збудником чорної гнилі являється *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Чорна гниль, спричинена *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* була знайдена на 28 полях капусти у п'яти основних районах вирощування капусти в Непалі та на чотирьох полях цвітної капусти. Виділення ДНК та визначення генетичної однорідності проводили за допомогою ПЛР тестування з використанням специфічних праймерів. Проведені аналізи підтвердили ідентичність збудника, взятого для тесту з різних зразків, та дали можливість для розроблення препаратів для попередження даної хвороби капусти [13].

Метою досліджень бразильських вчених було розробити новий метод

отримання та ідентифікації суспензії бактеріофагів та дослідження його потенціалу проти рослинних бактерій. Суспензія, отримана за новою методикою, була ефективною у боротьбі з *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* як *in vitro*, так і *in vivo*. Спостерігалася різниця між суспензією з патогеном (PLP) та суспензією з ураженою рослиною (PLS). Прозорі зони спостерігались через 48 год при 28°C в обох суспензіях. Хоча лікування PLP та PLS не показало статистичної різниці у значеннях КУО ( $5 \times 10^5$  та  $1 \times 10^5$ , відповідно), але вони відрізнялись від контрольної суспензії. Потім проводили оцінку *in vivo* суспензій із чіткими зонами в посуді. Спостерігалось зниження індексу тяжкості захворювання порівняно з контролем, показуючи, що обробка фаговою суспензією захищає рослину [14].

Вченими з Данії було досліджено епідеміологічні хвороби чорної гнилі які спричиненні бактеріальними збудниками, завдаючи значних втрат врожаю. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* є найпоширенішою бактерією, здатною викликати вищезазначене захворювання у хрестоцвітних рослин. Використання бактеріофагів може представляти вагомий та ефективний підхід до подолання цього поширеного явища. Дослідження підкреслили застосування фагової терапії для боротьби з хворобами рослин, а також *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* інфекцією. Вченими було охарактеризовано вплив літичного фага на рослину *Brassica oleracea*, інфіковані *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, і, перша метаболічна відповідь рослин. Результати досліджень довели потенційні переваги бактеріофагів: зменшення проліферації бактерій, зміна структури біоплівки та /або модуляція метаболізму рослин та захисної реакції [15].

Проводились дослідження щодо потенціалу біологічного контролю чорної гнилі брокколі, спричиненої *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, використовуючи непатогенні *Xanthomonas* sp. 11-100-01 (npX), змішаний з бактеріофагом XcpSFC211 (pXS). При вирощуванні брокколі в тепличних умовах з використанням npX або pXS не вдавалось контролювати чорну гниль. Однак після посіву пошкодженої рослини окремо з npX або з (npX і

pXS) суттєво контролювали чорну гниль. Коли змішану суспензію прХ з рXS поміщали на мембранний фільтр, потім промивали дистильованою водою і сушили на повітрі, значна кількість рXS адсорбувалась на поверхні прХ. У польових випробуваннях рослини брокколи обприскували суспензією прХ з рXS, потім інокулювали *X. campestris* pv. *campestris*. Поєднання прХ з рXS покращило профілактичний ефект проти чорної гнилі. Це перший опис доповіді що непатогенні штами *Xanthomonas* sp., змішані з бактеріофагом ефективно контролювали чорну гниль брокколи в польових випробуваннях. Бактеріофаги дуже специфічні для цільових бактерій і розглядаються як потенційні агенти біоконтролю. Бактеріофаги успішно використовуються проти кількох хвороб рослин але не були протестовані проти чорної гнилі брокколи. Біологічний контроль чорної гнилі ксантомонади з бактеріофагами може зменшити використання бактерицидів міді та обмежити фітотоксичність на листках овочів *Brassica* [16].

Російськими вченими проведено дослідження по виділенню бактеріофагів *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* методом індукції. Як індукуючі фактори використовувалися ультрафіолетові промені з довжиною хвилі 254 нм і метоміцин С. Отримані результати свідчили про відсутність переходу профага у вільний бактеріофаг у бактерій *X. campestris* pv. *campestris* під впливом індукуючих факторів. Проведено дослідження по виділенню бактеріофагів *X. campestris* pv. *campestris* з об'єктів навколишнього середовища. Виділено 8 бактеріофагів із зразків ґрунту і зразків капусти з ознаками ураження бактеріозом. На основі отриманих даних розроблена схема виділення бактеріофагів *X. campestris* pv. *campestris* з об'єктів навколишнього середовища, що включає 4 етапи. В даний час застосування бактеріофагів для ідентифікації та боротьби зі збудниками бактеріальних хвороб рослин є швидко розширюваним напрямком. Бактеріофаги більшою мірою вигідні і можуть бути використані в якості антибактеріальних заходів тоді, коли бактерії-збудники широко представлені в природі [17].

Метою цього дослідження було виділення та очищення потенційних

бактеріофагів щодо їх здатності лізувати рослинні патогенні штами *Xanthomonas campestris* pv. *campestris in vitro*. Бактеріофаги очищали і обирали для подальшої характеристики на основі їх здатності здійснювати чіткий лізис патогенів. 17 штамів патогенних *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* були протестовані на чутливість до 31 фага, виділеного під час дослідження. Було виявлено, що вірулентний фаг Хсс9SH3 лізує всі штами *Xanthomonas campestris* pv. *campestris in vitro*. Характеристику Хсс9SH3 було виконано на основі морфології БУО, титру фага, чутливості до органічного розчинника, впливу температури та електронної мікроскопії. Розмір довгого нескорочувального хвоста фага становив 100 нм в довжину і 10 нм в ширину з діаметром головки 20 нм. Ізометрична головка фага, як передбачається, належить до сімейства бактеріофагів *Siphoviridae*. Ці фаги можуть бути корисним інструментом у конкретному та ефективному виявленні та контролі *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, що викликає хворобу чорної гнилі. Використання бактеріофагів для боротьби із захворюваннями - це сфера захисту рослин з великим потенціалом мінімізувати заходи хімічного контролю. Бактеріофаги є вигідними, оскільки вони широко присутні в природі, самовідтворюються і можуть бути спрямовані проти бактеріальних рецепторів, важливих для патогенезу [18].

Характерно для Хсс, бактеріофаг розглядаються як потенційний засіб проти чорної гнилі. Біологічний контроль чорної гнилі з бактеріофагами досить простий і безпечний для людей, тварин і рослин. Бактеріофаги відповідають за 10–80% загальної смертності від бактерій в екосистемах і є перспективними агентами для боротьби з бактеріальними збудниками. На виживання бактеріофагів у філосфері впливає багато факторів, включаючи ультрафіолетове опромінення сонячним світлом. Вплив фактора УФ-світла на стійкість оцінювали фаг, змішаний з різними ультрафіолетовими протекторами *in vitro* на молодих капустияних рослинах у теплиці. Експозиція УФ-опромінення позитивно корелювала із зменшенням популяції фагів. У дослідженнях *in vitro* аскорбінова кислота, рибофлавін та знежирене молоко

викликали значний захист фагів, якщо застосовувати їх разом із застосуванням фагів. Щоб продемонструвати прямий вплив протекторів, суспензії фагів з різними сполуками піддавалися дії УФ опроміненню та визначали ефективність проти чорної гнилі хрестоцвітних, спричинених *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. Захисний склад усував вплив УФ-опромінення та, можливо, інших факторів навколишнього середовища. Посилена залишкова активність фагів може призвести до більш зручного графіка внесення шляхом обприскування нових саджанців капусти в теплиці. Метою цього проекту було дослідити дію ультрафіолетових захисників, оцінити сумісність Хсс-специфічного фагового коктейлю з пестицидами та дослідити в тепличних експериментах, чи використання обраних складів підвищило ефективність обробки бактеріофагами для боротьби з чорною гниллю капусти [19].

## РОЗДІЛ 2. Застосування пестицидів для контролю збудника слизового бактеріозу

У цій роботі [20] вченими досліджувалась чутливість збудників бактеріозів до пестицидів. У досліді використовували пестицид, що дозволені до застосування в Україні і призначені для обробки насіння і посівів цукрових буряків для обмеження розвитку різних патогенів – Роялфло, Круїзер, Семафор, Альто Супер, Фалькон, Фундазол, Сумітїон, та чотири найменування фунгіцидів, що застосовуються на інших культурах для обмеження розвитку хвороб, що викликаються грибами – Толсін, Ридоміл Голд, Альетт, Скор. Встановлено, що збудники смугастості жилок *P. syringae*, раку *A. tumefaciens* та туберкульозу *X. axonopodis* виявилися в основному не чутливими до фунгіцидів та інсектицидів, що використовують для обробки насіння та рослин цукрових буряків. Встановлено, що частково пригнічує ріст *P. syringae* 7921, *P. syringae* pv. *aptata* 8544. *P. syringae* pv. *aptata* 8545, *X. axonopodis* 6, *X. axonopodis* 10, *A. tumefaciens* 9054 в концентрації в 10 разів більше рекомендованої виробником, інсектицидний протруйник на основі біфентрину 200 г /л. – Семафор. Відмічено відсутність росту бактерій *X. axonopodis* 7325 та *A. tumefaciens* 8628 за додавання у поживне середовище фунгіциду Альто Супер, з діючою речовиною пропіконазол та *X. axonopodis* 7325 під впливом Фалькону, з діючими речовинами - спірокамін 250 г/л + тебуконазол 167 г /л + тріадименол 43 г/л. Незважаючи на поширеність бактеріозів, втрати врожаю та погіршення якості вирощуваних рослин, спричинених ними, на сьогодні не зареєстровано препаратів для обмеження їх розвитку. Тому метою цієї роботи було вивчення впливу хімічних пестицидів на збудники бактеріозів.

У цьому дослідженні використано гібриди капусти брюссельської Діабло F1 та Долорес F1. У досліді використовували біопрепарати Фітоцид -р, біокомплекс-БТУ, Азотофіт-р, які виготовлялись на основі корисних бактерій

					<b>НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Кутрик І.В.				Розділ 2. Огляд бактеріальних захворювань рослин та препаратів відмінних від бактеріофагів	Літ.	Арк.	Акруїв
Консульт.							18	102
Керівник	Буценко Л.М.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

та продуктів їх метаболізму. Аналіз проходження фенологічних фаз росту і розвитку рослини не виявив позитивного впливу біопрепаратів. У контролі спостерігалось раннє зав'язування головок, період від висаджування до технічної стиглості становив 165 діб незалежно від гібриду. Застосування біопрепарату видовжувало проходження основних фаз росту і розвитку рослини на 2-5 діб. Обробка рослин гібриду Долорес F1 досліджуваними біопрепаратами під час вегетації забезпечило одержання однакового показника маси головки на рівні 7,8 г, що перевищував показник контролю на 13%. Триваліший період дозрівання продуктового органу встановлено у гібридів Діабло F1 та Долорес F1 за використання Азотофіту-р, а різниця до контролю складала 5 діб. Одночасно, застосування Фітоциду-р та Біокомплексу-БТУ не різнилось періодом дозрівання головок відносно контролю [21].

На відміну від попередньої статті, в цій статті вітчизняні вчені досліджували 23 пестициди різного спрямування, дозволені до використання в Україні. Вплив пестицидів на ріст бактерій визначали їх культивуванням на картопляному агарі (КА) з досліджуваними препаратами в рекомендованих виробниками дозах упродовж 3-х діб за температури 28°C. Відзначали наявність росту колоній на середовищі з відповідними препаратами. Після 3-добового культивування на середовищі з препаратами спостерігали ріст культури штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* АФ4, *P. agglomerans* П324. Для захисту сільськогосподарських культур від хвороб та інших шкодочинних факторів використовують пестициди. Проте разом з високою ефективністю стосовно цільових об'єктів багаторічне використання та персистенція цих ксенобіотиків і продуктів їх розпаду в навколишньому середовищі призводять до розвитку резистентності фітопатогенів і фітофагів. Досліджувані пестициди не виявляли чіткої антибактеріальної дії до цих штамів. Слабший ріст штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8462 і 9010 спостерігали на КА з десикантом Грінфорт. Цей препарат та інсектицид Твікс незначно пригнічували ріст штамів *X. translucens* 3164 і *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400. Ріст штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* K20 слабо пригнічувався препаратами Віктор, Грін форт,

гранстар, зенкор, експрес, твікс, тобто виявився помірно чутливим до більшості пестицидів. Отже, фітопатогенні бактерії виявляють полівалентну чутливість до пестицидів, навіть у межах одного виду. Тому для визначення чутливості до цих ксенобіотиків не можна обмежуватися окремими їх представниками [22].

Іншою групою вітчизняних вчених було досліджені бактеріальні хвороби ріпаку. Збір зразків уражених рослин ріпаку проводили регулярно в вегетаційні періоди 2010-2012 рр. на дослідних полях. Для виділення і культивування бактерій використовували картопляний агар (КА). Досліджували 18 ізолятів бактерій, збудників слизового бактеріозу та бактеріозу коренів, виділених вченими з різних уражених органів та тканин ріпаку. На основі дослідження патогенних властивостей показано, що популяція збудників бактеріальних хвороб ріпаку у природі гетерогенна - 78% високо- і середньоагресивних та 11% низькоагресивних штамів. Слід зазначити, що найбільш агресивними серед усіх виділених ізолятів виявився збудник слизового бактеріозу *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, а найменш агресивним – поліфаг *Pseudomonas fluorescens*. Досліджувані штами є досить агресивними, як на різних сортах ріпаку, так і капусті сорту Амагер, та за основними морфолого-культуральними і біохімічними властивостями є спорідненими з основними збудниками бактеріозу коренів *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, слизового бактеріозу *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* та *Pseudomonas fluorescens*. Ізольовані збудники потребують наступної коректної ідентифікації із залученням новітніх молекулярно-генетичних методів досліджень. При розробці заходів для захисту рослин від бактеріозів велике значення відіграє екосистемний моніторинг, діагностика захворювань та вивчення біологічних властивостей їх збудників, які вивчені ще недостатньо [23].

Також українські науковці займаються дослідженнями щодо збудника базального бактеріозу пшениці. Ізолювання *Pseudomonas syringae* pv. *atrovaciens* із рослин пшениці та сегетальних рослин у її посівах проводили у

2012–2016 рр. Визначали морфологію і структуру колоній бактерій, що вирости на картопляному агарі в чашках Петрі через кілька діб. Морфологію клітин визначали за допомогою світлового мікроскопа у препаратах, забарвлених за Грамом. Патогенні властивості досліджуваних штамів у польових умовах вивчали шляхом штучного зараження рослин пшениці у фазі трубкування. За результатами проведених досліджень встановлено, що збудник базального бактеріозу поширений в усіх обстежених вченими областях і спричиняє ураження пшениці як за інтенсивної, так і за органічної технології вирощування. Ізольовані із уражених рослин пшениці штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* були вірулентними, 80% ізолятів характеризувалися високою і середньою агресивністю щодо рослини-хазяїна. Уражене збудником зерно пшениці на зародковому, або базальному кінці має плями від світло-коричневого до вугільно-чорного кольору. Хоча цей симптом характерний для ураження *P. syringae* pv. *atrofaciens*, він не є специфічним і може траплятися за ураження зерна іншими збудниками, такими як *Bipolaris sorokiniana* і *Alternaria alternata* [24].

Групою вітчизняних дослідників було досліджено та визначено ураження посівів сої методом лінійної оцінки. Вчені відбирали листя та стебла рослин сої з симптомами бактеріального ураження і проводили бактеріологічний аналіз ураженого матеріалу. Патогенні властивості виділених ізолятів бактерій визначали в польових умовах у 4-разовій повторності. Штучне зараження рослин сої проводили шприцом бактеріальною суспензією клітин у стебло і листя. Щільність суспензії —  $1 \cdot 10^9$  КУО/мл. Спостереження за поширенням бактеріозів сої на дослідних посівах і фітопатологічний аналіз отриманих результатів дали змогу визначити загальне відсоткове співвідношення збудників за ураження рослин. Серед основних збудників, які викликають хвороби сої в Україні, між *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (кутаста плямистість) та *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (пустульний бактеріоз) існує певний взаємозв'язок. Збудник кутастої плямистості сої є не лише

невід'ємною складовою патогенної мікробіоти сої, а й становить 30–40% від уражених рослин. Фітопатогенні збудники бактеріальних хвороб завдають посівам сої значних збитків. Їхній розвиток призводить до зниження продуктивності або загибелі рослин. Агресивні бактеріальні фітопатогени дуже поширені в природі і в умовах, сприятливих для їх розвитку, завдають значної шкоди врожаю. У виділених ізолятів бактерій вивчали морфологічні, культуральні, фізіологічні, біохімічні властивості. Ідентифікацію ізольованих бактерій проводили, порівнюючи їх властивості з характеристикою колекційних штамів і визначником бактерій [25].

Також було проведено дослідження щодо чутливості фітопатогенних бактерій до стрептоміцину за дії пестицидів. Об'єктами досліджень слугували штами із колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАН України *Xanthomonas translucens* 3164 – збудник чорного бактеріозу пшениці, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027Т – збудник бактеріального опіку чи плямистості, *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* УКМ В-1011Т – збудник базального бактеріозу. Дослідники застосовували методику, розроблену для визначення токсичної і мутагенної дії пестицидів на мікробні угруповання ґрунту, а саме врахування кількості стрептоміцинорезистентних колонієутворюючих одиниць (КУО Str<sup>R</sup>) за дії пестициду. Мінімальна інгібуюча концентрація стрептоміцину для досліджуваних псевдомонадів становила 1 мкг/мл, а для *P. agglomerans* П324 і *X. translucens* 3164 – 5 і 10 мкг/мл відповідно. Широко розповсюджених пестицидів антибактеріальну дію виявляють фунгіциди, до складу яких входять атоми металів (Cu, Hg, Mn, Zn, Fe) чи галогенів (Cl). Проте, пестициди, насамперед фунгіциди, порушують екологічну рівновагу між бактеріальною та грибною мікробіотою. Результатом цього є загострення проблеми бактеріозів сільськогосподарських культур. Крім того, деякі пестициди мають генотоксичні властивості. Так фунгіциди на основі беномілу, флудиоксонілу, тіофанат-метилу не пригнічують розвиток збудників бактеріозів зернових культур, проте підвищують рівень їх антибіотикорезистентності, тобто

проявляють стосовно фітопатогенних бактерій мутагенну дію. Перевагою таких досліджень мутагенної активності наряду з комерційними тест-системами (тест Еймса, Allium сера-тест), є безпосередній вплив пестицидів на досліджувані фітопатогенні бактерії, а не на віддалені тест-об'єкти [26].

У даній роботі вчені досліджували дію біопрепаратів Фітохелп, Фітоцид і Екстрасол, на основі бактерій *Bacillus subtilis*. Вони мали різну антибактеріальну активність до тест-культур, що обумовлено особливостями штамів, титром клітин та концентрацією біологічно активних продуктів (БАП) життєдіяльності мікроорганізмів. Біопрепарати Фітохелп, Фітоцид і Екстрасол, на основі бактерій *Bacillus subtilis*, мали різну антибактеріальну активність до тест-культур, що обумовлено особливостями штамів, титром клітин та концентрацією біологічно активних продуктів (БАП) життєдіяльності мікроорганізмів. Біопрепарати Фітохелп і Фітоцид проявляли високу антибактеріальну активність до збудників бактеріального раку *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* та чорної бактеріальної плямистості *X. Vesicatoria* — діаметр зони відсутності росту варіював у межах 70–80 мм (рис. 1, 3). Щодо штамів *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* і *X. Vesicatoria*, за дії мікробіологічного препарату Екстрасол такий діаметр не перевищував 40 мм. Найактивнішим до збудника бактеріальної крапчастості томатів *P. syringae* pv. *tomato* виявився мікробний препарат Екстрасол — діаметр зони відсутності росту становив 20–26 мм [27].

Попри досить широке впровадження в землеробстві України біологічних препаратів, використання пестицидів хімічного походження все ще переважає їх застосування. Тому доцільно було б використовувати такі пестициди, які, крім антифунгальної, виявляли б і антибактеріальну активність до збудників бактеріальних хвороб. Вченими виявлено, що препарати, які містять беноміл, флудиоксоніл, пенконазол, дифеноконазол, тіофанат-метил, не мають антибактеріальної активності до всіх досліджених штамів *P. syringae* pv. *atofaciens* та *A. tumefaciens*, *P. carotovorum*, *X. vesicatoria*, *P. syringae* pv.

*lachrymans*. З унесенням цих препаратів у технологіч -но рекомендованій для виробників дозі та у 10-разовій до живильного середовища, на якому культивували бактерії, не було пригнічення росту бактеріальних культур, за винятком штаму *X. vesicatoria* 7605 , у якого не спостерігався ріст на препараті , що містив беноміл. Часто неконтрольоване використання пестицидів призводить до серйозних негативних наслідків. Накопичуючись у біоценозах, вони порушують ланцюг живлення співчленів ценозу ; пригнічують діяльність природних регуляторів чисельності шкідливих агентів , забруднюють [28].

### РОЗДІЛ 3. Аналіз особливостей отримання бактеріофагів , які синтезуються в бактеріях роду *Xanthomonas*

Російськими вченими представлені результати підбору основних технологічних параметрів для виготовлення біопрепарату на прикладі бактеріофага *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Кл34-УлГАУ. Були проведені експерименти, спрямовані на визначення найкращого способу очищення бактеріофага від виробничої культури бактерій, серед яких виділялися вплив температурою і трихлорметаном, а також фільтрація суспензії через мембранні фільтри з різною величиною пор. Встановлено, що очищення суспензії шляхом фільтрації через мембранні фільтри з величиною пор 0,22 мкм виявилася найкращим способом очищення . Було встановлено оптимальний час осадження при виготовленні фагового препарату, яке склало 24 г. При цьому періоді було отримано оптимальне співвідношення результату (літична активність бактеріофага). Підбір оптимального співвідношення фага і бактеріальної культури для культивування показав, що найкращим є співвідношення 1:2 і 1 :3. В якості оптимальної температури культивування бактеріофага встановлена 20-32°C, при якій зберігається активність бактеріофага [29].

Періодичні епідемії хвороби чорної гнилі відбуваються у всьому світі, спричиняючи значні втрати врожаю. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* являє собою одну з найпоширеніших бактерій, здатних викликати вищезазначене захворювання у хрестоцвітних рослин, таких як брокколи , капуста, цвітна капуста. У сільському господарстві розробляється кілька стратегій боротьби з інфекцією ксантомонади. Використання бактеріофагів може представляти вагомий та ефективний підхід до подолання цього широко поширеного явища. Кілька досліджень підкреслили потенційну корисність застосування фагової терапії для боротьби з хворобами рослин, та з хворобою

					<b>НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ</b>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Кутрик І.В.</i>				Розділ 3. Аналіз особливостей отримання бактеріофагів, які синтезуються в бактеріях роду <i>Xanthomonas</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>							25	102
<i>Керівник</i>	<i>Буценко Л.М.</i>					<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стабніков В.П</i>							

чорної гнилі. У цьому дослідженні вчені охарактеризували дію літичного фага на рослину *Brassica oleracea* var. *gongylodes*, інфіковані *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* і, вперше, корельована метаболічна відповідь рослин. Результати висвітлили потенційні переваги бактеріофагів: зменшення розмноження бактерій, зміна структури біоплівки та / або модуляція метаболізму рослин та захисної реакції [30].

При використанні бактеріальної суспензії з концентрацією  $10^6$  КУО/мл, у 21,5% проростків проявились симптоми на сім'ядольних листках, а при концентрації  $10^9$  КУО /мл їх було 86,1%. Обробка насіння сумішшю бактеріофагів привела до істотного зниження зараженості проростків. У насінні №1 біологічна ефективність замочування в коктейлі бактеріофагів становила 95,2%, а при методі зволоження 56,4%. Така ж закономірність спостерігалася в разі зразка насіння №2. Тут біологічна ефективність замочування становила 89,3 %, а методу зволоження - 68,8%. Слід мати на увазі, що метод замочування не технологічний, так як вимагає подальшого підсушування насіння. У зв'язку з цим практичний інтерес представляє використання суміші бактеріофагів для обробки насіння методом зволоження. Таким чином, показана можливість використання бактеріофагів для придушення насінневої інфекції при судинного бактеріозу капусти [31].

У цій статті досліджено потенціал біологічного контролю бактеріофагами, вірусами, які специфічно інфікують бактерії, їх реплікація, що призводить до лізису їхнього бактеріального господаря та вивільнення новоутворених вірусних частинок. Усі фаги вважалися придатними для фаготерапії через їх літичний потенціал та стабільність в умовах температури та рН, характерних для сільськогосподарських полів. Для *Xanthomonas campestris* pv *campestris* було виділено сім нових фагів. Нові фаги були охарактеризовані для визначення їх мікробіологічної придатності для застосування у сільськогосподарській промисловості. Їх морфологія була визначена за допомогою аналізу трансмісійної електронної мікроскопії, ідентифікуючи SoPhi1, SoPhi2 та всі KIL-фаги як представників сімейства

*Myoviridae* [32].

Бактеріофаг фL7, здатний інфікувати клітини *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, відноситься до сімейства *Siphoviridae*. Фаг складається з ікосаедричного капсиду, розміром 53,2 нм в діаметрі і довгим нескорочувальним хвостовим відростком довжиною 156 нм. Генوم фага фL 7 представлений лінійною молекулярною ДНК. Вміст Г-Ц в геномі становить 56 %. Оптимальна температура культивування становить 28°C, однак віруси зберігають життєздатність на протязі 6 місяців. при 4°C і витримують нагрівання до 80°C протягом 10 хв. На чашках формують колонії розміром 1 мм у діаметрі. Обробка фагів 10% -ним хлороформом, етанолом або ацетоном призводить до повної втрати інфікуючої здатності, а також впливу метанолу та етилу інактивує 99% фагових частин [33].

Боротьба з бактеріальними хворобами рослин на основі бактеріофагів є сферою досліджень, що швидко розвивається. Широкий спектр стратегій (запобігання розвитку фагостійких мутантів, правильний підбір ефективних фагів, терміни застосування фагів, максимізація шансів на взаємодію між фагами та цільовою бактерією, подолання несприятливих факторів у філосфері на стійкість фагів, розробка сонячних протекторів до підвищення біоефективності фази та доставка фагів у присутності фагочутливої бактерії) використовувались для підвищення ефективності контролю. В даний час обробка фагом використовується в теплицях та на полях у Флориді, США, як частина стандартної інтегрованої програми управління бактеріальною плямистістю томатів. Завдяки зростаючій ефективності та внеску до сталого сільського господарства, продукти на основі фагів, ймовірно, отримають більшу частку на ринку бактерицидів у майбутньому [34].

У даній роботі вчені досліджували *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* phage K81, представник сімейства *Myoviridae*. Фаговий штам виявляв антибактеріальну активність до всіх випробуваних штамів *X. campestris* pv. *campestris* і не лізував інші *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Геном K81 - це дволанцюжкова ДНК, що включає 66 відкритих рамок зчитування та

середній вміст GC 62,9%, що представляє першу повну послідовність геному. Фаг K81, стійкий до хлороформу та стабільний у різних середовищах у діапазоні рН 5-11, демонстрував високу здатність зберігати титр принаймні 2 роки при +4°C. Фаги виживали щонайменше 7 днів на поверхні листя, демонструючи здатність зберігатися на рослинній тканині без присутності бактерії-хазяїна. Результати трьох повторних експериментів показали, що застосування суспензії фага K81 ефективно контролює бактеріальну пляму перцю порівняно зі стандартним лікуванням та необробленим контролем. [35].

## РОЗДІЛ 4. Аналіз особливостей отримання бактеріофагів відмінних від *Xanthomonas*

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* є патогеном, який викликає хвороби м'якої гнилі та стовбурової гнилі в кількох культурах. Для боротьби з цією бактерією вчені виділили бактеріофаг PP1, який проявляє високу літичну активність щодо *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Трансмісійною електронною мікроскопією виявлено, що фаг PP1 належить до сімейства *Podoviridae*, якому притаманні ікосаедричні головки та короткі нескорочувальні хвости. Фаг PP1 показав високу специфічність для *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Цей фаг демонстрував швидку і сильну літичну активність проти свого господаря у рідкому середовищі та був стабільним у широкому діапазоні значень рН. Випадки хвороби, спричиненої *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* значно порідшали при лікуванні PP1 [36].

У цій статті досліджено біоконтрольний потенціал бактеріофагів у боротьбі з бактеріальним в'яненням томатів. Бактеріофаги були виділені з ґрунту, зібраного з овочевих полів. Їх ефективність у боротьбі з бактеріальним в'яненням, спричиненим двома ізолятами *Ralstonia solanacearum* (ізолятом 6 та АВ3), досліджували в тепличних умовах. Суміші бактеріофагів у концентрації  $2,86 \times 10^6$  БУО/мл наносили на ризосферу як ґрунтовий засіб кількома методами. Ізоляти фагів мали різну літичну картину щодо *R. solanacearum* і різнилися за своєю морфологією БУО. Відсоток випадків в'янення за ізолятом 6 зменшився на 10%, а частота в'янення за допомогою ізоляту АВ3 зменшилась на 20% завдяки застосуванню фагової суміші. Виживання бактеріофага в ґрунті, обробленому пагтями, коливалось від  $0,2 \times 10^3$  -  $3,5 \times 10^4$  БУО /г ґрунту після 15 днів останнього внесення фагів [37].

Бактерія *Stenotrophomonas maltophilia* є новим інфекційним патогеном і через стійкість до лікарських засобів доступні обмежені можливості лікування.

					<b>НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ</b>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Кутрик І.В.				Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						29	102
Керівник	Буценко Л.М.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						
Розділ 4. Аналіз особливостей отримання бактеріофагів відмінних від <i>Xanthomonas</i>							

Потенційним варіантом боротьби з інфекціями *S. maltophilia* є фаготерапія. *Stenotrophomonas* фаг Bf11 був виділений із зразка ґрунту з використанням клінічного штаму *S. maltophilia* S18202. Трансмисійна електронна мікроскопія дала докази того, що цей фаг є членом сімейства *Siphoviridae*. Аналіз діапазону господарів показав, що фаг успішно інфікував і лізував 30% випробуваних штамів *S. maltophilia* [38].

Вченим з Польщі вдалось виділити 9 бактеріофагів, що інфікують *Dickeya* spp. *biovar*. Фаги мають типову морфологію представників ряду *Caudovirales*, родини *Myoviridae*, з діаметром головки 90–100 нм і довжиною хвоста 120–140 нм. В експериментах фаг D5 виражав найширший діапазон, заражаючи представників усіх видів *Dickeya* spp., а фаг D7 показував найвужчий спектр, інфікуючи лише ізоляти *Dickeya dadantii* та *D. solani*. Всі фаги були схильні до інактивації при рН 2, температурі 85°C та УФ-освітленням протягом 10 хв. Крім того, фаги D1, D10 та D11 інактивували за допомогою 5М NaCl, а фаг D2 інактивували хлороформом. Бактеріофаги змогли повністю зупинити ріст *D. solani in vitro* та використовуються для захисту тканини бульб картоплі від мацерації [39].

Великобританськими вченими було виділено нові бактеріофаги для контролю *Pseudomonas syringae* pv. *porri* за допомогою фагової терапії. П'ять нових фагів було виділено із заражених полів у Фландрії (vB\_PsyM\_KIL1, vB\_PsyM\_KIL2, vB\_PsyM\_KIL3, vB\_PsyM\_KIL4 та vB\_PsyM\_KIL5). Геномний аналіз фагів виявив розміри геному від 90 до 94 кб і середній вміст ГЦ 44,8%. Філогеномічні мережі класифікували їх на нову кладу, названу «KIL-подібними вірусами», пов'язану з родом феліксуноподібних вірусів, разом із фагом phiPsa374 з *P. syringae* pv. *actinidiae*. Характеристика *in vitro* продемонструвала стабільність та літичний потенціал цих фагів [40].

Бактеріальне коричневіння рису, викликане *Pantoea ananatis* під час цвітіння, широко зустрічається в Японії та погіршує якість рису. Фаги, літичні як до патогенних, так і до непатогенних *P. ananatis*, були виділені вченими із суцвіття евлалії (*Miscanthus sinensis*), зернистого бур'яну. Застосування фага та

непатогенного *P. ananatis* придушував хворобу під сонячним світлом. Дивно, але застосування світлолабільного фага само по собі було супресивним. Фаг уповільнював ріст збудника на рослинах рису та на середовищі LB. Оскільки непатогенні штами *Pantoea* рясніють на рисових волотиках на стадії цвітіння то можуть бути господарями фага [41].

У цій роботі вченими був проведений пошук високоактивних літичних бактеріофагів, інфекційних по відношенню до патогенних штамів *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. і наданий вичерпний опис їх властивостей. Бактеріофаг PP16 ефективно інфікує штам *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* F002, практично повністю адсорбуючись на клітинах бактерій протягом 5 хв при 26°C. Фаг лізує клітини повністю протягом 1 год, при цьому відбувається повне просвітлення культури клітин і формування потомства фага (приблизно 60 частинок на клітину). Протягом 3 год *in vitro* не відбувається помітного зростання фагостійких мутантів клітин [42].

У статті представлені матеріали з розробки технологічних параметрів виготовлення і контролю біопрепарату для діагностики бактерії виду *Pseudomonas syringae*. Вченими були вивчені температурні показники культивування і кількісне співвідношення бактеріофага і культури при культивуванні виділених бактеріофагів. Встановлено що для бактеріофага *Pseudomonas syringae* Ps.s-7 УЛГАУ і індикаторної культури *Ps.s27* УЛГАУ оптимальним співвідношенням є 1:1, тобто 0,2 мл фага до 0,2 мл індикаторного культури, температура культивування системи бактеріофаг-бактерія - 28 °C [43].

Науковцями було виділено 19 активних бактеріофагів проти *Erwinia amylovora*. Вісім пережили процеси ізоляції, очищення та зберігання. П'ять ізолятів бактеріофагів, включених у це дослідження, лізували понад 50% з 20 штамів *E. amylovora*. Дослідження за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії показало, що всі вісім фагів належать до ряду *Caudovirales*, хвостатих фагів, і включали представників сімейств *Myoviridae* та *Podoviridae*.

Бактеріофаги характеризувались перетравленням фагової ДНК з чотирма рестрикційними ендонуклеазами та двома наборами ПЛР-праймерів. Дві нові групи, групи RFLP 7 і 8, були ідентифіковані на основі відмінностей у шаблонах фрагментів рестрикції [44].

У цій статті описані дослідження вчених, у яких описуються бактеріофаги, що заражають патогенну рослиною *Dickeya* spp. В даний час не існує ефективного контролю захворювань, спричинених *Dickeya* spp. Новий бактеріофаг, D5, що належить до сімейства *Myoviridae*, можна використовувати для боротьби з цими бактеріями. Геном D5 складається з дволанцюжкової ДНК із вмістом ГЦ 49,7% і, за прогнозами, матиме 196 відкритих рамок зчитування із середньою довжиною 711 нуклеотидів кожен. ORF класифікували на функціональні групи, включаючи структуру фагів, упаковку, метаболізм ДНК, регуляцію та додаткові функції. Фаг D5 може бути літичним фагом і, отже, може ефективно знищувати патогенну рослиною *Dickeya* spp [45].

У цьому дослідженні повідомляється про виділення бактеріофагу, активних щодо *Dickeya* spp. Бактеріофаг BF25/12, перший бактеріофаг *Podoviridae*, ефективний проти *Dickeya* spp.. Температурна стабільність вибраного бактеріофага *Podoviridae*, який контролювали протягом 1 року, показала значне зниження виживання бактеріофагів, що зберігаються при -20°C протягом довших періодів. Він показав сприйнятливість до низького рН та УФ-випромінювання, але був стабільним при нейтральному та лужному рН. Крім того, стабільність тестованого бактеріофага також була пов'язана з середовищем інкубації та концентрацією бактеріофагів при певних значеннях рН. Це перша доповідь про бактеріофаги проти *Dickeya* spp з сімейства *Podoviridae*, яка розширила потенційні бактеріофаги, включивши їх у коктейлі бактеріофагів як агенти біоконтролю [46].

Вченими вивчена гетерогенність фагового ізоляту, отримана з рослин, уражених *Erwinia amylovora*. Встановлено, що ізолят містить двокомпонентну популяцію КЕУ-подібних фагів, частинки яких відрізняються за

спорідненістю до DEAE-целюлози. Фаги двох субпопуляцій представлені віріонами V1-морфотипу (сімейство *Siphoviridae*) з правильними ікосаедричними капсидами діаметром близько 77 нм і довжиною хвостового відростка, близького до 172 нм. Ці фагові частинки за морфологією та розміром близькі до прототипного фага KEУ. За даними рестрикційного аналізу геноми фагових чистих ліній /7 і KEУ/25 знаходяться між собою і мають розміри близько 72 кб, що на 25—27% менше, ніж розмір геному фага KEУ. Є пропущення, що фаги KEУ/7 і KEУ/25 представляють собою делеговані варіанти фага KEУ [47].

В даний час в Інституті мікробіології НАН Білорусі вченими ведеться розробка препарату на основі консорціуму фагів фітопатогенних бактерій *Xanthomonas phaseoli*, *Pseudomonas corrugata* і *Dickeya dadantii* для захисту рослин від бактеріозів. Для цього бактерії *X. phaseoli* БІМ-279, *P. corrugata* 3 і *D. dadantii* А3937 вирощували в ферментері Sysbiotech С-ВІО2. Динаміка зростання культури бактерій і бактеріофагів фіксувалася шляхом вимірювання оптичної густини. Культивування бактерій здійснювали протягом 2-3 годин до досягнення значення оптичної густини (ОГ) 0,6 (при довжині хвилі  $\lambda = 600$  нм). Бактеріофаги додавали в співвідношенні 1:50. Лізис бактерій фагами вважали завершеним при зниженні показника ОГ з 0,6 до 0,2 [48].

Метою даного дослідження було створення колекції бактеріофагів *E. amylovora* - потенційних агентів контролю бактеріального опіку плодів культур. До завдань дослідження входило виділення із зразків навколишнього середовища культур бактеріофагів і підтримання життєздатності колекції культур в лабораторних умовах культивування. Використання бактеріофагів як природних антагоністів фітопатогенних бактерій надає можливість контролю шкідника за допомогою біологічних засобів. Завдяки таким властивостям препаратів на основі бактеріофагів, як специфічність дії, здатність до самовідтворення, швидке руйнування в середовищі при відсутності бактеріальних клітин-мішеней, порівняно нескладна технологія їх отримання, віруси бактерій привертають увагу багатьох дослідницьких лабораторій. У

статті наведені відомості по первинній характеристиці морфологічних і фізіологічних властивостей нових бактеріофагів, виділених з різних регіонів на території Білорусі в 2017-2018 рр. Для бактеріофагів Hena1, Hena2, Roschal і Dichka показаний високий рівень стабільності та літичної активності при культивуванні в лабораторних умовах і вивчені їх морфологічні властивості, що дозволило віднести їх до сімейства *Myoviridae*. Встановлено необхідні органічні добавки в живильне середовище для культивування бактеріофагів: 2,5% сорбітол, 0,4% гліцин або 2,5% глюкоза [49].

У даній роботі представлена повна біологічна характеристика 8 бактеріофагів, активних у відношенні *Pseudomonas syringae*. Досліджувані фаги формували схожі негативні колонії - прозорі, округлі, діаметром 5-9 мм. Літична активність фагів *Pseudomonas syringae* по Аппельману від  $10^{-4}$  до  $10^{-8}$ ; по Грація від  $1,0 \pm 0,1 \times 10^6$  до  $2,0 \pm 0,1 \times 10^9$  (БОЮ / мл). Вивчення специфічності фагів на 15 видах гетерологічних культур, показало, що фаги видоспецифічні для *Pseudomonas syringae*. Фаги помірно стійкі до нагрівання і втрачають активність при 30-хвилинному впливі температури вище  $62^{\circ}\text{C}$ . На підставі отриманих даних визначено потенціал кожного бактеріофага для використання в якості агента біоконтролю [50].

## РОЗДІЛ 5. Сфера застосування бактеріофагів

В останні десятиліття спостерігається зростання значення фагів в сільському господарстві, медицині і харчовій промисловості . Бактеріофаги - це віруси, що заражають бактерії. Бактеріофаг приєднується до клітки бактерії, вводить в неї свій генетичний матеріал, використовує її для розмноження , потім відбувається лізис клітини і безліч фагів викидаються і продовжують заражати фітопатогенні бактерії. Бактеріофаги безпечні для рослин і тварин, більш того висока специфічність дозволяє цілеспрямовано впливати на патоген , не впливаючи при цьому на інших членів бактеріального співноти. Також бактеріофаги безпечні для навколишнього середовища, так як є частиною природної мікрофлори . Бактеріофаги мають перспективи в захисті рослин від інфекцій, викликаних патогенними бактеріями [51].

Найбільш прийнятним захистом рослин з точки зору екологізації є біологічний контроль за допомогою мікробних препаратів. Використання біопрепаратів на основі бактеріофагів як профілактичний і терапевтичний засіб боротьби з хворобами видається більш доцільним , оскільки фаги мають ряд переваг: віруси бактерій мають високу специфічність щодо бактерій, що дозволяє уникнути несприятливих наслідків по відношенню до навколишнього середовища і організму хазяїна, стійкість до бактеріофагів у бактерій виробляється набагато рідше, ніж до антибіотиків, завдяки наявності в складі бактеріофагів літичних ферментів, фаги можуть руйнувати екзополісахаридний матрикс бактеріальних біоплівки, бактеріофаги в порівнянні з хімічними засобами здійснюють менш токсичний вплив на рослини [52].

Використання бактеріофагів для захисту рослин від бактеріозів має велике практичне значення для скорочення використання хімічних речовин в сільському господарстві. До теперішнього часу велика кількість бактеріофагів виявлено та охарактеризовано у представників фітопатогенних бактерій

<i>Erwinia</i>					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Кутрик І.В.				Розділ 5. Сфера застосування бактеріофагів	Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.								
Керівник	Буценко Л.М.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П							

*amylovora*. Крім того, нещодавно почалося інтенсивне дослідження фагів бактерій *Pectobacterium carotovorum*. певний інтерес викликають також фагів системи бактерій *Pantoea agglomerans*, які, як епіфіти, тісно асоційовані з багатьма рослинами [53].

Судинний бактеріоз капусти, що викликається *Xanthomonas campestris* *pv. campestris*, є найбільш поширеним і шкідливим бактеріальним захворюванням капустяних культур. Це захворювання поширене по всьому світу, де вирощуються сімейства Хрестоцвіті. Збудник зберігається в насінні, уражених рослинних рештках. Навіть слабка зараженість партії насіння може викликати значний збиток. Тому, до засобів передпосівної обробки насіння пред'являються високі вимоги по їх біологічній ефективності. Перша згадка про використання бактеріофагів проти хвороб рослин відноситься до 1926 р. Але з відкриттям і розвитком антибіотиків бактеріофаги були незаслужено забуті. Однак в даний час на тлі появи антибіотикорезистентних штамів фітопатогенів інтерес до використання бактеріофагів як альтернативного засобу захисту від бактеріальних хвороб рослин значно зріс [54].

У промисловості і сільському господарстві інтерес до бактеріофагів обумовлений можливістю їх використання для контролю популяцій бактерій, що приносять шкоду на виробництвах і вражаючих сільськогосподарські рослини. Фітопатогенні бактерії викликають захворювання більшості культивованих людиною і безлічі дикорослих рослин. Застосування хімічних засобів захисту не завжди ефективно і небезпечно в екологічному відношенні. За допомогою бактеріофагів, специфічних до штамів фітопатогенних бактерій, здійснюють профілактику і боротьбу з бактеріальними хворобами сільськогосподарських рослин. Препаратами на основі бактеріофагів обробляють інфіковані насіння, хворі рослини або ґрунт, на якій вирощуються рослини. Препарати також додають в зрошувальну воду і ґрунт. Виходячи з широкого поширення фагів, вивчення особливостей будови і функціонування бактеріофагів фітопатогенних бактерій становить великий інтерес з теоретичної та практичної точки зору. Отримані дані розширюють уявлення

про фаги, активних у відношенні найбільш поширених видів фітопатогенних бактерій . Застосування розробленої схеми індикації та ідентифікації бактерій *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* з використанням фагового біопрепарату відкриває перспективи її застосування в сільському господарстві для контролю збудників захворювань судинних бактеріозів [55].

## РОЗДІЛ 6. Техніко-економічне обґрунтування

### 6.1 Потреба у цільовому продукті

Бактеріальні хвороби рослин є однією з основних причин втрати врожаю в сільському господарстві, оскільки в даний час немає ефективних засобів боротьби з ними. Бактерія *Xanthomonas campestris* є збудником судинного бактеріозу. Патоген поширений практично всюди. Бактерії впроваджуються в рослини через продихи, через механічні травми, ушкодження кореневої системи, переходячи по головній жилці і черешки листя в кочеригу. Від рослини до рослини вони переносяться краплями дощу, шкідниками або механічним способом (одяг робітників, інвентар, тощо). Стандартні методи боротьби з вищесказаним захворюванням не забезпечують задовільного контролю захворювань, особливо коли погодні умови сприяють поширенню збудника [56].

Рослини, що відносяться до сімейства Хрестоцвіті, можуть бути вражені судинним бактеріозом протягом усього періоду вегетації [57]. Це захворювання виявляється всюди де вирощується дана культура. Дані бактерії приводять до закупорювання судин рослини, рослинні тканини, розташовані в безпосередній близькості від закупорених судин, з часом жовтіють. Враження рослин капусти проявляється на всіх стадіях вирощування культури [58]. В результаті захворювання у рослин спостерігаються затримки в рості, зниження розмірів качанів, відбувається опадання нижніх листків. Хвороба здатна прогресувати в період зберігання, що призводить до втрат урожаю. В даний час застосування бактеріофагів, для ідентифікації та боротьби зі збудниками бактеріальних хвороб рослин, швидко поширюється, в зв'язку з чим бактеріофаги можуть бути використані в якості ефективних антибактеріальних заходів [59].

Застосування біопрепаратів на основі фагів для контролю збудників Хрестоцвітих дозволяє контролювати і аналізувати кількісний та якісний

склад					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.	Кутрик І.В.				Літ.			Арк.		Архивів
Консульт.					Розділ 6. Техніко-економічне обґрунтування					
Керівник	Буценко Л.М.				Кафедра БТМ					
Н. Контр.										
Зав. каф.	Стабніков В.П.									

виділених бактерій, що на відміну від класичних бактеріологічних методів займає значно менше часу. При цьому важливим є правильний підбір бактеріофагів, що входять до складу біопрепарату для індикації та ідентифікації бактерій, що вимагає їх ретельного вивчення і визначення оптимальних параметрів взаємодії фаг-бактерія з метою мінімізації розвитку резистентності бактерій [60].

При проведенні попереднього розрахунку необхідної кількості бактеріофагу, для попередження розповсюдження бактеріальних захворювань Хрестоцвітих, який будемо виготовляти для ТзОВ «Долина Агро», ТОВ «С - Альфа Грин», ТОВ «Агровіо-Україна» потрібно встановити кількість посівів капусти білокачанної на даних підприємствах, для захисту якої, буде виготовлятися бактеріофаг.

Бактеріофаг Хссф1 представляє собою вірус, які специфічно заражає бактерії *Xanthomonas campestris*, його реплікація призводить до лізису бактеріального господаря і вивільнення новостворених фагових частинок. Фаготерапія успішно застосовується у ветеринарній та медичній практиці, однак практично не застосовується до бактерій, збудників хвороб рослин, в тому числі *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Даний напрямок набуває все більший інтерес у дослідників внаслідок підвищення уваги до безпеки сільськогосподарської продукції.

Препарат на основі даного бактеріофагу використовується для контролю бактеріальних захворювань у сільськогосподарських культурах, особливо від судинного бактеріозу, який спричиняється бактерією *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Розчин препарату являє собою рідину, золотисто-жовтого кольору, без характерного запаху, густина розчину – 1,003 – 1,005 г/л, рН 6,0-7,5. Концентрація бактеріофагу в препараті становить  $1 \times 10^8$  БУО/л [61].

За офіційними даними підприємств, посівна площа капусти разом взятих трьох підприємств становить 361 га [62].

## 6.2 Розрахунок потужності виробництва

Визначено, що для ефективного захисту та контролю збудника судинного бактеріозу Хрестоцвітих, необхідний препарат, в якому концентрація бактеріофагу становитиме  $10^6$ - $10^8$  БУО/мл. Встановлено, що для  $1 \text{ м}^2$  земельної ділянки з метою запобігання враження фітопатогенними бактеріями, буде достатньо нанести 21 мл розчину бактеріофагу методом розпилювання.

Також для ефективного захисту рослин під час всього вегетаційного періоду капусти необхідно 3 рази (коли складаються найсприятливіші умови для розвитку збудника судинного бактеріозу) здійснити обробку розчином бактеріофагу [63].

Згідно з даними літератури концентрація бактеріофагу в препараті для оброблення становить  $1 \times 10^8$  БУО/мл, а витрата такого препарату становить 21 мл/м<sup>2</sup>. Враховуючи необхідність щонайменше триразового оброблення за вегетаційний період витрата препарату на м<sup>2</sup> площі насаджень капусти становитиме 63 мл/м<sup>2</sup>.

Площа насаджень капусти, що будуть оброблятися препаратом бактеріофагу становить 361 га або  $3,61 \times 10^6 \text{ м}^2$ . Отже, для оброблення цієї площі впродовж вегетаційного періоду знадобиться  $63 \text{ мл/м}^2 \times 3,61 \times 10^6 \text{ м}^2 = 227,43 \times 10^6 \text{ мл} = 227430 \text{ л} = 227,430 \text{ м}^3$  препарату, який містить  $1 \times 10^8$  БУО/мл фага.

Далі розраховуємо кількість культуральної рідини. Якщо синтезувальна здатність *Xanthomonas campestris* становить  $1 \times 10^{11}$  БУО/л =  $1 \times 10^8$  БУО/мл фага культуральної рідини, то необхідно отримати 227430 л культуральної рідини.

Враховуючи загальну кількість культуральної рідини необхідної на рік, розраховуємо скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ( $T_{рд} = 200$ ). Тоді кількість продукту за добу ( $V_d$ ) становитиме:

$$V_{цк} = V_{нт} \cdot T_{ц} / (T_{рд} \cdot 24) = 227\,430 \cdot 41,5 / (200 \cdot 24) = 1966 \text{ л}$$

де  $V_{нт}$  – кількість потрібної культуральної рідини,  $T_{цф}$  – цикл роботи ферментера, який складається з тривалості виробничого біосинтезу (24 год) та часу підготовчих операцій (17,5 год),  $T_{рд}$  – кількість трудоднів .

Підготовчі операції: миття та огляд (3,5 год), перевірка на герметичність (1,5 год), підігрів апарату (1 год), стерилізація (2,5 год), охолодження (1,5 год), завантаження середовища (2 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1,5 год).

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{нт}/V_{цк} = 227\,430/1966 = 116 \text{ циклів,}$$

Кількість культуральної рідини за цикл, л:

$$V_{кр} = K_1 \cdot V_{ц}/(1-E_{св}) = 1,1 \cdot 1966/(1-0,2) = 2704 \text{ л}$$

Такий об'єм культуральної рідини (2704 л) можна отримати у ферментері з геометричним об'ємом:

$$V_{гф} = V_{кр}/K_3 = 2704/0,6 = 4506 \text{ л,}$$

де  $K_3$  – коефіцієнт заповнення ферментера ( $K_3 = 0,6$ ), що обирається в межах 0,5 – 0,7.

У ГОСТ 20680–2002 знаходимо ферментер номінальним об'ємом  $V_{нф} = 5000$  л.

### **6.3 Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері**

За виробничий цикл отримують  $V_{кр} = 2704$  л культуральної рідини. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%) становитиме:

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{ф}} = \frac{2704}{1 - 0,1} \approx 3004 \text{ л}$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом  $V_{роб.1} = 5000$  л.

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{зап} = 0,6$  можливий

геометричний об'єм ферментера  $V_{ф.1} = 3004/0,6 = 5007$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 5000$  л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення :

$$K_{зап.1} = \frac{V_{роб.1}}{V_{сф}} = \frac{3004}{5000} = 0,6$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість посівного матеріалу це 10% від об'єму поживного середовища . В такому разі кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб.1}}{1 + X_{ф}} = \frac{3004}{1 + 0,1} = 2731 \text{ л}$$

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

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 3004 - 2731 = 273 \text{ л}$$

#### **6.4 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в посівному апараті на третьому етапі**

Для одержання 273 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.3} = \frac{V_{пм2}}{1 - E_{ін}} = \frac{273}{1 - 0,1} = 303,4 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора  $V_{ін.} = 303,4/0,6 = 505,7$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 500$  л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.3} = \frac{V_{роб.3}}{V_{сін}} = \frac{303,4}{500} = 0,61$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс3} = \frac{V_{роб.3}}{1 + X_{ін}} = \frac{303,4}{1 + 0,1} = 275,9 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пмз}} = V_{\text{роб.з}} - V_{\text{псз}} = 303,4 - 275,9 = 27,5 \text{ л}$$

### **6.5 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в посівному апараті на другому етапі**

Для одержання 27,5 посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.з}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{27,5}{1 - 0,1} = 30,5 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора  $V_{\text{ін.}} = 30,5/0,6 = 51,1$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{сф}} = 50$  л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.з}} = \frac{V_{\text{роб.з}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{30,5}{50} = 0,61$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{псз}} = \frac{V_{\text{роб.з}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{30,5}{1 + 0,1} = 27,7 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пмз}} = V_{\text{роб.з}} - V_{\text{псз}} = 30,5 - 27,7 = 2,8 \text{ л}$$

### **6.6 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбі з використанням шейкера-інкубатора**

Для одержання 2,8 л посівного матеріалу використовують шейкер-інкубатор та колбу об'ємом 5 літрів.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу бактеріофагу у ферментері об'ємом 5000 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи.

### **6.7 Розрахунок кількості посівного матеріалу бактеріофагу для культивування в ферментері 5000 л**

Для отримання необхідної кількості бактеріофагу по закінченню

культивування, в ферментер потрібно внести 0,3% посівного матеріалу бактеріофагу від кількості культуральної рідини, що становить 9 л. Дану кількість посівного матеріалу бактеріофагу можна отримати за поетапних 3 рази в колбі 5 л з використанням шейкера-інкубатора.

## РОЗДІЛ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми

### 7.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та середовища для його культивування

Бактеріальні хвороби є проблемою для багатьох агрокультур по всьому світу, зокрема для томатів, картоплі, арахісу, тютюну. Їх збудниками виступають бактерії, які так само швидко набувають стійкості до пестицидів, як людські патогени – до антибіотиків. І так само, як у випадку з людськими патогенами, для боротьби з фітопатогенами вчені вирішили звернутися по допомогу до природних ворогів бактерій – бактеріофагів. На відміну від пестицидів та антибіотиків, фаги високоспецифічні – вбивають лише певний вид або навіть штам бактерії, не впливаючи на корисну мікрофлору – у кишечнику, в ґрунті, будь-де [64].

Для отримання бактеріофагу проти бактеріальних захворювань Хрестоцвітих (судинних бактеріозів) використовують бактерії роду *Xanthomonas campestris*, оскільки саме бактерії даного роду спричиняють судинний бактеріоз Хрестоцвітих рослин. При культивуванні цих бактерій можливо одержати досить високий вихід бактеріофагу, що попередить розповсюдження бактеріозу.

Переважно, накопичення біомаси клітини-хазяїна та отримання бактеріофагу здійснюють на різних поживних середовищах. Найчастіше культивування продуцентів бактеріофагу здійснюють періодичним способом. У небагатьох випадках здійснюють культивування з підживленням. Бактерії, на основі яких отримують бактеріофаг, ростуть на середовищах, що містять глюкозу (сахарозу), м'ясний екстракт, пептон, триптон, різноманітні солі [65].

Культивування *Xanthomonas campestris* відбувається при 27°C, протягом 24 годин, при постійному перемішуванні та постійній подачі стерильного аераційного повітря за допомогою барботеру, яким оснащений ферментер.

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Кутрик І.В.				Розділ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							45	102
Керівник	Буценко Л.М.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей культивування бактерій роду *Xanthomonas* наведено у таблиці 7.1.

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г /л	Кінцева концентрація бактеріофагу, БУО/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> Хссф1 фаг Хссф1	Пептон – 10 М'ясний екстракт – 10 NaCl - 5	$1 \times 10^8$	24 год 28°C рН 7-7,5 Внесення фага через 21 год, при OD <sub>600</sub> = 0,5 $1 \times 10^6$ БУО/мл	<i>Papaianni M., Paris D., Sheridan L.</i> Plant Dynamic Metabolic Response to Bacteriophage Treatment After <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> infection. <i>J Plant Pathol.</i> 2020 [65]
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Пептон – 10 М'ясний екстракт – 10 NaCl - 5	$1 \times 10^7$	24-48 год 24-25°C рН 1 -11 Внесення фага через 25 год, при OD <sub>600</sub> = 0,001 $1 \times 10^6$ БУО/мл	<i>Jensen, B. D., Vicente, J. G., Manandhar, H. K., and Roberts, S. J.</i> Occurrence and diversity of <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> in vegetable Brassica fields in Nepal. <i>Plant Dis.</i> 2010. .94: p.298-305. doi:10.1094/PDIS-94-3-0298 [66]
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Глюкоза – 10 Дріжджовий екстракт – 5 CaCO <sub>3</sub> – 30	$1 \times 10^7$	24 год 28 °C рН 7-7,5 Внесення фага через 13 год, $1 \times 10^4$ БУО/мл	<i>Igor Villela Marroni, José Carlos Germani</i> New Technique to create a suspension containing bacteriophages and how it can be used to control cabbage leaf spot caused by <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> . <i>Agricultural Sciences</i> 2014 5 :286-297 [67]

Так як основним критерієм вибору біологічного агента є його здатність рости на найбільш дешевих поживних середовищах, наступним етапом вибору продуцента є розрахунок та порівняння вартості поживних середовищ для культивування продуцентів, що накопичують бактеріофаг у найбільших концентраціях (таблиця 7.2).

Таблиця 7.2.

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування продуцентів бактеріофагу**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента на 1 л середовища	Джерело інформації (1,2,3,4,5,6)*
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> Хссф1 фаг Хссф1	Пептон – 10	524,3	5,243	1
	М'ясний екстракт – 10	1120	11,2	2
	NaCl - 5	5	0,025	3
	Вартість 1 л середовища -16,45 грн			
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Пептон – 10	524,3	5,243	1
	М'ясний екстракт – 10	1120	11,2	2
	NaCl - 5	5	0,025	3
	Вартість 1 л середовища -16,45 грн			
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Глюкоза - 10	30	0,3	4
	Дріжджовий екстракт - 5	1880	9,4	5
	CaCO <sub>3</sub> – 30	25	0,75	6
	Вартість 1 л середовища -10,45 грн			

Примітка : \* - ціни наведено станом на грудень 2021, 1 - <https://prom.ua/ua/p1229299620-pitatelnaya-sreda-pepton.html>, 2 - <https://www.amazon.com/HiMedia-RM669-500G-Beef-Extract-Powder/dp/B00DYOAXZ6> 3 -

<https://prom.ua/ua/p1096672568-sol-pischevaya-pomol.html>? 4 - <https://prom.ua/ua/p1292861578-glyukoza-pischevaya-meshkah.html>? 5 - <https://prom.ua/ua/p1201452272-drizhdzhovij-ekstrakt-100.html> 6 - <https://prom.ua/ua/p1082785908-kaltsiya-karbonat-pischevoj.html>?

Підсумовуючи дані таблиці 7.2 можна зробити висновок, що середовище для культивування трьох з чотирьох продуцентів має однакову ціну – 16,45 грн а для *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* – 10,45 грн.

Таблиця 7.3.

#### Умовна вартість цільового продукту

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація бактеріофагу, БУО/мл	Умовна вартість цільового продукту, грн/мл	Тривалість культивування, год
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	16,45	$1 \times 10^7$	16,45	48
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> Хссф1 фаг Хссф1	16,45	$1 \times 10^8$	16,45	24
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	10,45	$1 \times 10^7$	10,45	24

Отже, з даних цієї таблиці видно, що вартість поживного середовища однакова для двох продуцентів – 16,45 грн, для останнього - *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* вона дещо дешевша, становить 10,45 грн. Лідером

серед наведених вище продуцентів по продуктивності є *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Хссф1 фаг Хссф1, який здатний насинтезувати  $1 \times 10^8$  БУО/мл. По тривалості культивування найдоцільніше вибрати того продуцента, тривалість культивування якого є найменша – той самий, у якого найкраща синтезуюча здатність. Порівнявши дані *таблиці 7.3*, можемо зробити висновок, що найкращим продуцентом буде *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, фаг Хссф1.

## 7.2 Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

Оскільки фаг Хссф1, як і інші віруси є облігатним ендопаразитом, то спосіб культивування підбирається під клітину-хазяїна, у даному випадку це *Xanthomonas campestris*. Дана культура – аеробна, тож для її культивування необхідно забезпечити подачу стерильного аераційного повітря, що здійснюється в ферментері за допомогою барботеру.

Так як температура для культивування *Xanthomonas campestris* становить 28°C, а рН підтримується на нейтральному рівні, є ризик контамінації середовища сторонніми нейтрофільними та мезофільними мікроорганізмами, з чого робимо висновок про необхідність проведення стерилізації комунікацій, обладнання, аераційного повітря та поживного середовища. Також для запобігання контамінації в посівних апаратах та ферментері створюється надлишковий тиск [58].

Культивування *Xanthomonas campestris* для накопичення біомаси проводиться глибинним методом, оскільки цей метод має ряд переваг над поверхневим. Він дозволяє виключити непродуктивну ручну працю, скоротити виробничі площі, спростити механізм культивування, а також автоматизувати процес. Зазначимо, що при глибинному способі культивування поживні речовини середовища використовуються раціональніше, що дає можливість в певній мірі скоротити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів твердого поживного середовища. Для культивування ми застосовуємо рідке поживне середовище, в якому джерелами вуглецю і азоту є пептон і м'ясний екстракт.

При глибинному культивуванні можливе забезпечення як безперервного так і періодичного процесу. Зазначимо, що у безперервних процесах продуценти завжди підтримуються в експоненційній фазі росту. Оскільки бактеріофаг накопичується та лізує клітини в стаціонарній фазі росту ми використовуємо періодичне культивування як біль доцільне у даному конкретному випадку [68].

Узагальнюючи вищенаведені дані, зазначимо що культивування фагу Хссф1 клітиною-хазяїном *Xanthomonas campestris* проводиться періодичним глибинним способом на рідкому поживному середовищі в асептичних умовах з постійною подачею стерильного аераційного повітря.

Вибираючи ферментаційне обладнання враховуємо вищеописані характеристики.

Даний тип культивування (глибинне культивування) проводиться в ферментерах, основними вимогами до яких є можливість проведення процесу в асептичних умовах за інтенсивного масообміну та подачею стерильного аераційного повітря. Для культивування *Xanthomonas campestris* необхідним є подача аераційного повітря, оскільки бактерії є аеробними. У зв'язку з цим варто використовувати ферментер оснащений барботером, який буде забезпечувати культуру необхідною кількістю аераційного повітря.

Оскільки ферментація має проходити при нейтральному значенні рН, то для забезпечення контролю за цим показником ферментер повинен бути оснащений датчиком, який відображає значення рН.

Для інтенсифікації масообміну та підвищення розчинення кисню всередині ферментера (рис. 7.1) повинен бути встановлений перемішувачий пристрій. зважаючи на те, що в процесі культивування не утворюється міцелій, не відбувається накопичення метаболітів, не злипається біомаса, даний процес не вимагає інтенсивного масообміну. Зважаючи на це, пропонується використовувати найдешевшу та найпростішу за конструкцією мішалку – лопатеву (зі стандартною кількістю лопатей – 6 шт). Оскільки ти тепломасообміні можуть утворюватись воронки, необхідно обладнати

ферментер відбивними перегородками (4 шт ) [69].

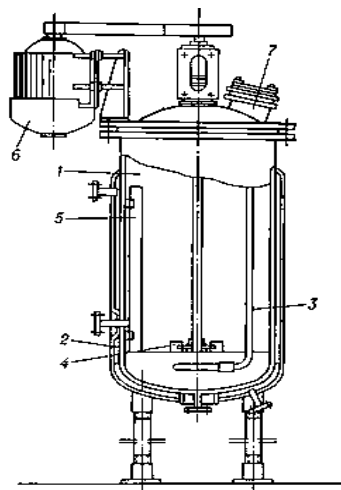


Рис 7.1. Ферментер з лопатевою мішалкою

1 - корпус; 2 – парова сорочка; 3 – барботер ; 4 – мішалка; 5 – відбивна перегородка; 6 – двигун ; 7 – загрузочний люк.

### 7.3 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища

Для одержання бактеріофагу Хссф1 за допомогою біомаси клітин *Xanthomonas campestris* використовується середовище наступного складу (г/л):

- М'ясний екстракт – 10;
- пептон – 10;
- NaCl – 5.

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування даного біологічного агенту, умовно ділимо його на композиції залежно від режиму стерилізації компонентів:

**Композиція А:** м'ясний екстракт, пептон (режим стерилізації: 112°C, 30 хв ).

**Композиція Б:** NaCl (режим стерилізації: 131°C, 30 хв).

В композицію А входять термолабільні речовини , що потребують м'якшого режиму стерилізації ніж солі . Саме тому вирішено розділити дане середовище на дві композиції.

Динаміка утворення двох композицій, зберігається для вирощування культури в посівних апаратах об'ємом 50 л, 500 л, та при виробничому біосинтезі в ферментері 5000 л.

## **7.4 Обґрунтування вибору стадій підготовки стерильного аераційного повітря**

Основною вимогою до повітря, що буде надходити до ферментера, це відсутність сторонньої мікрофлори та механічних домішок.

В ферментер має бути безперервна подача очищеного стерильного аераційного повітря, так як культивування буде відбуватись глибинним способом. Аераційне повітря, яке буде подаватися в ферментер, відводить газоподібні продукти обміну і тепло яке утворюється в період культивування та постачає культуру киснем. В процесі синтезу повітря мікроорганізмами, що подається на аерацію, повітря має бути очищене на 99,9999 % від мікроорганізмів розміром до 1 мкм та механічних домішок [70].

Підготовки аераційного повітря складається з таких стадій:

**Забір атмосферного повітря.** Повітря відбирається ззовні приміщення, в найменш забрудненому місці, зазвичай забір повітря здійснюють на висоті не менше 3 метрів від найвищої ділянки промислової будівлі. Повітряна частина складається з корпусу з шибером, завихрювача, заслінки і корпусу примусової подачі повітря.

Слід ретельно обирати місце для забору повітря з атмосфери, тому, що чим нижча температура забору повітря, тим вища його щільність та менша кількість вологи в повітрі.

Забране повітря з атмосфери має проходити через апарати для очищення атмосферного повітря, щоб позбавити його від зайвої вологи та механічних домішок. Волога повітря яке буде надходити до колорифера не повинне перевищувати 70%. В разі більшого вологовмісту потрібно висушити його до оптимального рівня перед подачею в колорифер [71].

**Очищення повітря від пилу на плоских тканинних фільтрах грубого очищення.** Для очищення грубих частинок пилу використовують фільтри грубого очищення, пил який потрапив разом з повітрям очищається на даному фільтрі і відправляється в компресор. Фільтр грубого очищення в більшій мірі використовується для подовження терміну служби фільтру

тонкого очищення, який в свою чергу виконує одну із головних процесів очищення повітря.

Фільтр касетного типу з продуктивністю  $100 \text{ м}^3/\text{хв}$  буде обраний в якості фільтру грубого очищення. Матеріали які можна використовувати в даному фільтрі це : бавовна, волокнистий шар з поліпропіленових волокон, скловолокно тощо. Скловолокно обираємо як фільтруючий матеріал, також в нижніх та верхніх шарах вкладаємо бавовну . В даному фільтрі скловолокно буде використовуватися як попередній фільтруючий матеріал, для того, щоб бавовна не карамелізувалась в процесі проходження неочищеного атмосферного повітря. Стерилізація фільтру грубого очищення відбувається гострою парою упродовж 2 годин при тиску  $0,5 \text{ мПа}$ . Сушіння фільтру після стерилізації проводиться нагрітим стерильним повітрям.

По закінченню процесу фільтрування , повітря потрапляє в компресор для подальшого його стиснення. В процесі стиснення, повітря нагрівається до температури  $200\text{-}250 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Після процесу стиснення , повітря подається до теплообмінник типу «труба в трубі» в якому відбувається охолодження повітря до температури  $20\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$ , в процесі охолодження , волога яка знаходиться в повітрі конденсується.

Ресивер в подальшому відводить сконденсовану вологу а також пари мастила які потрапили в ресивер з компресора. За допомогою ресивера зменшується швидкість руху повітря, яке в подальшому без допомоги ресивера може негативно вплинути на роботу фільтру тонкого очищення. По закінченню видалення сконденсованої вологи, повітря подається на теплообмінник нагрівач, де відбувається нагрівання повітря до оптимального рівня, тобто до температури культивування яка складає  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  [72].

**Очищення повітря на фільтрах тонкого очищення.** Нагріте повітря з теплообмінника нагрівача відправляється фільтр тонкого очищення типу ФТО, який складається з гофрованої тканини Петрянова . Дана тканина характеризується своєю міцністю та термостійкістю . Очищення за допомогою

даного фільтра складає 96 %. На етапі вибору було обрано фільтр типу ФТО-400, продуктивність якого складає 200 м<sup>3</sup>/год, даний фільтр витримує температуру до 150 °С [70].

### **Очищення повітря на фільтрах індивідуального очищення.**

Індивідуальні мембранні фільтри використовуються додатково для кращого очищення повітря від дрібнодисперсних часточок пилу які не видалилися на фільтрі тонкого очищення . Даний фільтр складається з капсул та фільтропатронів . Фільтр встановлюється перед кожним інокулятором та ферментером . Стерилізація фільтру відбувається парою упродовж 2 годин при тиску 0.5 мПа [72].

### **7.5 Обґрунтування культивування бактеріофагу**

На пробірки попередньо засіяні культурою *Xanthomonas campestris* вносять суспензію фага та культивують 2-3 год у термостаті при температурі 28°C. Контролюють відсутність сторонньої мікробіоти . Після культивування проводять змив фізіологічним розчином, утворену суспензію переливають колбу 5 л дотримуючись умов асептики. Далше вирощування посівного матеріалу бактеріофагу відбувається в поетапних 3 рази в колбі 5 л з використанням шейкера-інкубатора [68].

Через 21 годину з моменту початку культивування в ферментер вносять посівний матеріал бактеріофагу 9 л .

### **7.6 Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту**

Бактеріофаги за своєю природою є облигатними ендопаразитами, тобто розвиваються в середині клітини -хазяїна. Оскільки в промислових цілях застосовуються виключно бактеріофаги, що лізують клітину (вірулентні), то по закінченню ферментації основна маса фагів знаходиться у культуральній рідині [73].

Для того щоб отримати фагопрепарат необхідно провести його очистку від залишків поживного середовища та уламків клітин, сконцентрувати фагові частки та досягнути певного ступеню очистки відповідно до вимог та сфери застосування препарату. Іноді концентрування та очистка відбувається

одночасно. Отже, відповідно до вище поставлених цілей необхідно підібрати оптимальні умови [74].

### **Обґрунтування способу відділення біомаси**

Неочищений препарат бактеріофагу містить в своєму складі баластні речовини, залишки клітин бактерій та токсини. Основними технологічними параметрами виготовлення і контролю фагових біопрепаратів, є такі показники, як спосіб очищення бактеріофага від виробничої культури бактерій без зміни його основних біологічних властивостей, кількісне співвідношення бактеріальної культури і фага, оптимальне співвідношення між активністю фага і часом пасажу, температура культивування і спосіб очищення бактеріофага від виробничої культури бактерій без зміни його основних біологічних властивостей. від даних параметрів залежить ефективність виробничого процесу і кінцева концентрація бактеріофага в біопрепараті [65].

Тобто нашою метою буде очистити препарат від уламків клітин-хазяїна та токсинів, відповідно процес виділення бактеріофагу можна буде умовно розділити на:

- відділення залишків біомаси від фагових часточок;
- очищення від токсинів.

Для відділення біомаси на сьогоднішній день застосовуються різні методи, в залежності від типу кінцевого продукту та мікроорганізму-продуценту. Оскільки бактеріофаг лізує клітину-хазяїна та знаходиться у культуральній рідині, потрібно відділити бактеріофаг від залишків поживного середовища та уламків клітин [74].

Першим етапом виділення більшості продуктів біосинтезу є фракціонування культуральної рідини. Найпоширенішими методами відділення біомаси від рідкої фази є:

- фільтрування;
- відстоювання;
- сепарування;
- центрифугування.

**Фільтрування** – процес розділення неоднорідних систем через перегородку. Принцип роботи різних застосовуваних на даний час фільтрувальних систем (барабанні, стрічкові, тарілчасті фільтри, карусельні вакуум-фільтри, фільтри-преси, мембранні фільтри) засновані на однаковому принципі – затримки біомаси за допомогою пористої фільтрувальної перегородки. Залежно від характеру робочого процесу виділяють фільтри періодичної і безперервної дії. Вони можуть працювати як під вакуумом, так і при надлишковому тиску. Для фільтрів безперервної дії підведення суспензії, відведення осаду і відведення фільтрату (або відведення загущеної суспензії) відбувається безперервно. А в фільтрах періодичної дії ці стадії розділені в часі (перериваються).

Перевагами є повне відділення завислих часточок, простота проведення процесу, продуктивність. Недоліком способу є явище налипання клітин на фільтрі, та забивання пор фільтруючого елемента білками і іншими колоїдними частинками, це знижує швидкість потоку рідини в процесі фільтрування, збільшує енерговитрати на підтримання процесу. Тому цей спосіб не є ефективним для бактеріальної культури [75].

**Центрифугування** – це процес відділення завислих часток з розчинів під дією відцентрових сил. Виділяють два основних типи центрифуг: відстійні і фільтруючі. Відстійні центрифуги використовують для розділення емульсій і суспензій за допомогою осадження дисперсних частинок під впливом відцентрових сил. У хімічній галузі також широко застосовуються фільтруючі центрифуги.

Якщо розділяти центрифуги за призначенням, то можна виділити фільтруючі і сепаруючі центрифуги.

Фільтруючі центрифуги оснащуються барабанами, покритими зсередини, як правило, тканиною або іншим фільтруючим матеріалом. Даний тип центрифуг використовується для розділення суспензій.

Сепаруючі центрифуги теж оснащені суцільним барабаном. Даний тип центрифуг найчастіше використовуються для поділу концентрованих

суспензій і емульсій.

Даний спосіб вимагає більш дорогого устаткування, ніж фільтрування, тому він застосовується, якщо:

- суспензія фільтрується занадто повільно;
- виникає необхідність максимального звільнення культуральної рідини від наявних в ній частинок;
- потрібно забезпечити безперервний процес сепарації, коли фільтри розраховані на періодичну дію [69].

Переваги: продуктивність та ефективність розділення (можна відділяти частинки розміром до 0,01 мкм ).

Недоліки: складність конструкції, висока вартість та енергоємність , складність експлуатації, нагрівання мікроорганізмів, складність герметизації та асептики.

**Відстоювання** — процес повільного розшаровування рідкої дисперсної системи (суспензії, емульсії, піни) на складові фази : дисперсійне середовище та дисперсійну фазу, яке проходить під дією сили тяжіння.

Відстоювання не забезпечує виділення з суміші тонкодисперсних часток, які характеризуються повільною швидкістю осідання, тому відстоювання використовують для грубого розподілу неоднорідних систем. У процесі відстоювання частки дисперсної фази осідають або піднімаються на поверхню, накопичуючись, відповідно, на дні посудини або поверхні рідини. Осідання високодисперсних систем часто супроводжується збільшенням часток унаслідок коагуляції чи флокуляції. Структура осаду залежить від фізичних характеристик часток дисперсної системи та умов відстоювання. Полідисперсні суспензії тонкоподрібнених продуктів утворюють пухкі гелеподібні осади. Основні параметри, які характеризують процес відстоювання: швидкість осадження часток, лінійна швидкість потоку, час перебування потоку в апараті, кількість фракцій, які отримують при розподілі [76].

Переваги: простота проведення процесу, невеликі затрати енергії .

Недоліки: велика тривалість процесу, неможливість повністю розділити компоненти середовища.

**Сепарування** – це процес розділення неоднорідних рідких сумішей на фракції, що розрізняються за щільністю, в полі дії відцентрових сил.

Цей метод дозволяє розділяти суспензію, що погано фільтрується, інтенсифікувати виділення та концентрування твердих часток розміром більше 0,5 мкм. Доцільний, якщо у культуральній рідині міститься невелика кількість твердої фази або біомаса є цільовим продуктом.

Переваги: висока продуктивність; високий рівень концентрування.

Недоліки: складність конструкції; енергоємність[77].

Уламки клітин *Xanthomonas campestris* та фагові частинки істотно відрізняються за розмірами, тому в будь-якому випадку неможливо буде в одну стадію зробити повну очистку препарату, відділивши його від бактеріальних клітин, токсинів та баластних речовин. Розмір бактеріальних клітин дуже малий, але розмір часток бактеріофагу ще менший. Спочатку нашою задачею є розділити уламки клітин *Xanthomonas campestris*, що лізувалися та часток бактеріофага з культуральною рідиною.

Враховуючи всі недоліки та переваги вищеописаних методів оптимальним буде варіант очищення культуральної рідини звичайним центрифугуванням з подальшою доочисткою. При цьому культуральну рідину центрифугують протягом 30 хв при 3000 об/хв, а далі надосадову рідину подають на доочистку для остаточного очищення від уламків клітин стрептокока [65].

Перевагами саме такого простого методу є значно менша вартість апаратури, швидкість, простота та відсутність токсичних реагентів. Недоліком такого способу відділення бактеріофагів є те, що після таких маніпуляцій препарат має низький ступінь очистки і додатково потребує більш інтенсивного доочищення. Але оскільки після використання будь якого із запропонованих методів передбачена доочистка, то недоліком методу з використанням центрифугування можна знехтувати беручи до уваги лише його

переваги.

### ***Обґрунтування методу концентрування та очищення фагів***

Розрізняють фізичні та хімічні методи концентрування та очистки бактеріофагів. Розглянемо декілька фізичних методів.

Одним із таких методів є фільтрація, яка включає в себе 4 етапи: мікрофільтрацію, яка проводиться в тупіковому режимі в три етапи (на фільтр-картоні, на целюлозних мембранах з діаметром пор 0,5-0,7 мкм, потім на целюлозних мембранах с розміром пор 0,2 мкм) і четвертий етап – це очистка фаголізату методом ультрафільтрації в режимі тангенціального потоку через волокна з порогом затримання речовин 100 кД [77].

Також існує двоетапний спосіб очистки, що включає в себе мікрофільтрацію в режимі тангенціального потоку на капронових мембранах з діаметром пор 0,2 мкм і очистку ультрафільтрацією в режимі тангенціального потоку на мембранах з порогом затримання 150-200кД. Якщо порівнювати ці два методи то фільтрація на капронових фільтрах є більш високотехнологічною та має більшу продуктивність оскільки капронові фільтри більш стійкі до зношування і витримують до 50-70 циклів на відмінну від одноразових целюлозних мембран та фільтр-картона [78].

Наступним методом є диференційне центрифугування. Всі методи центрифугування ґрунтовані на розділенні часток по їх масі. При диференційному центрифугуванні спочатку центрифугують матеріал при 3-4 тис. об/хв., протягом 30 хвилин, надосадову рідину збирають в іншу центрифужну пробірку і ще раз центрифугують при більш високих обертах, близько 5-6 тис. об/хв.. Супернатант зливають і для осадження бактеріофагу знову центрифугують вже при швидкості 30-60 тис. об/хв. Осад після центрифугування ресуспендують в фізіологічному розчині та в подальшому очищують.

При центрифугуванні в градієнті концентрації використовують розділення часток по швидкості седиментації у в'язкому середовищі при цьому утворюються зони з часток одного типу. В залежності від речовини, яка

використовується як градієнт розрізняють зональне ( швидкісне) та ізопікнічне центрифугування [79].

При зональному центрифугуванні зазвичай використовують градієнт концентрації сахарози. Для очистки бактеріальних вірусів використовують 10-40% сахарозні градієнти. Щоб здійснити концентрування даним методом необхідно нашарувати один на одного 10, 20, 30 і 40 % розчин сахарози. Далі обережно нашаровують фаговмісний розчин та центрифугують при швидкості 36 тис. об/хв. протягом 2 годин. Зони вірусу буде видно при освітленні, суспензію фагів можна буде відібрати шприцом [79].

Ізопікнічне центрифугування проводять в розчинах хлористого чи сірчаноокислого цезію ( $\text{CsCl}$  чи  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ ). Вибір розчину залежить від властивостей вірусу. Для бактеріофагів зазвичай використовується  $\text{CsCl}$ . Бактеріофаги перед початком центрифугування суспензію змішують з  $\text{CsCl}$  і поміщають в центрифужні пробірки, які заповнюють лише на три четверті і доливають пробірки олією. Ізопікнічні градієнти отримують при центрифугування на швидкості 36 тис.об/хв. протягом 4 годин. Бактеріофаги видаляють за допомогою шприца , солі цезію видаляють діалізом [80].

Дані методи не використовуються для промислових виробництв оскільки неможливо одночасно процентрифугувати велику кількість фаголізату, а також дані методи потребують великих затрат часу.

Іншу групу методів концентрування та очистки складають хімічні, до яких відносять різні способи: осадження метанолом; осадження в ізоелектричній точці; осадження солями та полі етиленгліколем; очищення від ліпідів ефірами [77].

При осадженні метанолом, його додають до охолодженої фаговмісної рідини при низьких температурах до концентрації 35 %. Суміш залишають на 4 години при температурі  $+4^\circ\text{C}$ . Після цього розчин центрифугують при швидкості 5000 об/хв. протягом 30 хвилин [78 ]. Мінуси даного методу в тому, що метанол є токсичним як для людей так і для тварин, а оскільки ми

виготовляємо засіб для захисту сільськогосподарських культур то не можемо використовувати даний метод.

Концентрування рідкого бактеріофагу може відбуватись шляхом висолювання амоній сульфатом, який додають в кількості 69% від об'єму фага. Висолювання продовжується протягом 18 годин без наступного діалізу при температурі 2-4°C, рН 6,9 -7,0. До пастоподібної маси, що утворилася, додають у якості стабілізатора глюконат кальцію (9 %). Масу наносять на касети (товщина слою 1см) і висушують під вакуумом в ліофільних сушарках до отримання залишкової вологи 2-4%. Висушену масу подрібнюють в грануляторі, контролюють на асептичність та літичну активність [81]. Даний метод застосовується для виготовлення таблетованої форми.

Ще одним з методів хімічного концентрування бактеріофагів є осадження бактеріофагів в ізоелектричній точці. Оскільки віруси мають білкову природу їх можна осадити за допомогою досягнення ізоелектричної точки. Ізоелектрична точка бактеріофагів лежить в діапазоні рН 3,5-4,0. При даному методі до фаговмісної рідини додають 1Н розчин соляної кислоти при температурі +4°C і доводять рН середовища до ізоелектричної точки бактеріофагу, суміш витримують на холоді декілька годин. Після цього центрифугують для осадження 20-30 хвилин при 3-4 тис. об/хв.. Надосадову рідину зливають а осад розводять в слабо лужному буфері [79].

Більшість з запропонованих методів зручні для застосування в лабораторних умовах, але не використовуються в промисловості. Наприклад методи висолювання, осадження, та центрифугування є ефективними способами концентрування та очищення фагів. Але за рахунок довготривалого процесу, неможливості автоматизації, застосуванні реактивів або ж потреби особливих умов проведення очистки такі методи не можуть бути використанні у промисловому виробництві фагопрепаратів.

З вище зазначених способів можна відзначити мікрофільтрацію та ультрафільтрацію, поєднання цих двох методів може забезпечити чистоту препарату на 98% від бактеріальних клітин, залишків поживного середовища,

токсинів, пірогенів, тощо . Якщо порівнювати два запропонованих методи фільтрації то безперечно переважає двоетапний спосіб очистки препарату: мікрофільтрація на капронових фільтрах з діаметром пор 0,2 мкм та ультрафільтрація на мембранах з порогом затримання 150-200кД. Даний метод є більш економічно вигідним в порівнянні з чотирьохстаїним фільтруванням оскільки капронові фільтри на відмінну від целюлозних та фільтр-картону можна використовувати багаторазово .

### **Обладнання для очищення фагів**

Для центрифугування культуральної рідини обираємо проточну центрифугу СЕРА Z 61 /Z 61 GP (рис. 7.2), яка має ручний і автоматичний режим роботи і являється ефективною машиною з високим ступенем розділення . Основною особливістю є здатність центрифуги до регуляції швидкостей

(до 17 тис. об/хв.), можливість регулювання температурного режиму та ефективним відділенням осаду від рідини. Центрифуга СЕРА Z 61/Z 61 GP призначена для розділення осаду від рідини, розділення білків крові, концентрування і виділення вірусів та бактерій [79]. Переваги:

- швидкий процес центрифугування;
- простота установки та роботи;
- не потрібно багато простору для установки;

Комфорт в обслуговуванні . В якості другого ступеня очистки будемо використовувати процес мікрофільтрації з використанням пористих мембран з розміром пор 0,22 мкм. Фільтри Нідерландської компанії Lenntech конструкції PLA 3M підійдуть для даної задачі. Даний фільтр забезпечує більш низькі перепади та більший строк служби, знижує загальні витрати на фільтрацію . Конструкція фільтра вироблена з поліпропілену, проте демонструє кращу фільтруючу здатність порівняно з іншими фільтрами схожої конструкції. Дані фільтри призначені для широкого спектру фармацевтичних, біофізичних та біологічних та процесів , у тому числі:

-



*Рис. 7.2. Проточна центрифуга SEPA Z 61/Z 61 GP*

- фільтрування розчинників;
- реагентів та буферів;
- очистка вакцини;
- очистка культуральної рідини;
- системи високої чистоти DI та WFI.

Після проведення процесу мікрофільтрації для концентрування вірусу та позбавлення його від токсинів і баластних речовин використовують процес ультрафільтрації [82].

Розмір головки використовуваного штаму бактеріофага складає близько 22 нм, що дорівнює 0,022 мкм. Здійснювати ультрафільтрацію на фільтрах з розміром пор 0,1 мкм не доречно, оскільки вірус пройде крізь мембрану. Тому будемо використовувати фільтр з діаметром пор 0,05 мкм [65].

Таким чином, препарат очищається від токсинів та залишків баластних речовин. Токсини проходять скрізь мембрану, а вірусні часточки затримуються та концентруються на мембрані.

Фільтри з таким діаметром пор не так широко розповсюджені. Дане обладнання є у фірми Millipore типу MCE. Біологічна інертна суміш ацетату та нітриту целюлози зробила ці фільтри найбільш широко використовуваними

по всьому світу для різноманітних хімічних та біологічних застосувань . Фільтри даної марки поєднують у собі високу швидкість потоку та термічну стійкість, мають низькі адсорбційні властивості. Вони чудово підходять для використання в умовах напірної фільтрації, гідрофільні, забезпечують високу швидкість потоку завдяки своїй симетричній структурі [83].

### **7.7 Обґрунтування пакування цільового продукту**

При виборі упаковки необхідно враховувати властивості цільового продукту та умови його зберігання. Необхідно обрати таку тару , яка захищала б цільовий продукт від пошкоджень , сприяла безпечному транспортуванню, тривалому зберігання та продажу .

Вибір упаковки та первинної тари проводиться індивідуально в кожному конкретному випадку і залежить від властивостей інгредієнтів. Найважливішою вимогою щодо пакування та вибору пакувальних матеріалів є належний захист від дії зовнішніх факторів (вологи, кисню повітря, мікробного забруднення), властивостей складових ЛП.

Використання полімерних упаковок дозволяє утримувати розчини бактеріофагів у безперервному автоматизованому комплексі (за асептичних умов, протягом одного технологічного циклу), а саме: формування первинної упаковки із термопластичного гранулята, дозування розчину, герметизація упаковки, нанесення необхідного маркування. Досягається також належний захист як самої упаковки, так і розчину від мікробного забруднення, збереження стерильності та апірогенності в процесі виготовлення та зберігання. Найбільш перспективними для використання тарозакупорювальних засобів подібних розчинів є: поліетилен низького , середнього та високого тиску, поліпропілен, полістирол, фторопласт , полікарбонат та їх комбінації, а також поліетилен та полівінілхлорид. Полімерна упаковка може мати форму туби, каністри, пляшки, флакона, пакета, шприц-туби . Тому для використання первинного пакування пропонуються пляшки , об'ємом 2 л [84].

## РОЗДІЛ 8. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Апаратурна схема виконана на двох листах формату А1 та відповідає процесам, зображеним на технологічній схемі із зазначенням точок контролю процесу.

Таблиця 8.1

### Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Технічна характеристика	К -сть
ПЗ-1	Повітрязабірник	Повітрязабірник марки АІИ 020.000-01, фірми ООО «Вектор-Кондвент ». Обладнаний металевією сіткою для видалення механічних забруднень	1
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	Фільтр першого ступеня очистки типу ФЯП. Фільтруючий матеріал – поліуретан, продуктивність – 1540 м <sup>3</sup> /год,	1
К-3	Компресор	Гвинтовий компресор серії SCK 3-52, продуктивність 5,78 м <sup>3</sup> /хв , тиск 10 Атм.	1
Т-4	Теплообмінник - нагрівач	Теплообмінник нагрівач серії NP70 фірми " DEFRO NP ", потік повітря 8268 м <sup>3</sup> /год, потужність 500 Вт, виготовлений з високоякісної котлової сталі	1
РС-5	Ресивер	Ресивер повітряний фірми «Галкостсервис», об'єм 2000 л, робочий тиск 10 Атм	1
Т-6	Теплообмінник-охолоджувач	Теплообмінник -охолоджувач серії Кубік Агрі фірми «Guntner», продуктивність 67 м <sup>3</sup> /год	1

<b>НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ</b>				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Кутрик І.В.		
Консульт.				
Керівник		Буценко Л.М.		
Н. Контр.				
Зав. каф.		Стабніков В.П.		
Розділ 8. Специфікація обладнання				
			Літ.	Арк.
				67
			Акрушів	
			102	
<b>Кафедра БТМ</b>				

Ф-7	Фільтр тонкої очистки	Фільтр ФТО-750 діаметр 360 мм і висота 600 мм при навантаженні 750 м <sup>3</sup> /год опір фільтра становить 274 – 294 Па, фільтруючі елементи – пластини і циліндричні патрони, які слугують до 2 років, E = 99,92 %	1
Д-8, Д-10, Д-12, Д-14	Об'ємно-ваговий дозатор	Дозатор марки ДВСВ -50. Напівавтоматичний дозатор важільного типу	4
Р -9	Реактор-змішувач для приготування розчину солі NaCl	Реактор-змішувач об'ємом 200 л, оснащений перемішуючим пристроєм (100 об/хв), сталь 12Х18Н10Т . Виробник: «Завод химического оборудования «Заря»» (Росія)	1
Р-11	Реактор-змішувач для приготування розчину пептону та м'ясного екстракту	Реактор-змішувач об'ємом 200 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм (100 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Виробник: «Завод химического оборудования «Заря»» (Росія)	1
Р-13	Реактор-змішувач для приготування розчину солі NaCl	Реактор-змішувач об'ємом 2000 л, оснащений перемішуючим пристроєм (100 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Виробник : «Завод химического оборудования «Заря»» (Росія)	1
Р -15	Реактор-змішувач для приготування розчину пептону та м'ясного екстракту	Реактор-змішувач об'ємом 2000 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм (100 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Виробник: «Завод химического оборудования «Заря»» (Росія)	1

АК-16	Автоклав	Напівавтоматичний автоклав з горизонтальним завантаженням виробництва компанії Tuttnauer Дозволяє робити стерилізацію рідин, буферних розчинів, піпеток, інструментів, скляного посуду, а також використовується для приготування різних середовищ і навіть стерилізації наконечників.	1
Ш -17	Шейкер-інкубатор	Шейкер-інкубатор ES-20 /60 для мікробіологічних, біотехнологічних і фармацевтичних лабораторій відноситься до категорії пілотних установок і призначений для культивування клітин мікроорганізмів, включаючи клітини тварин , рослин і комах.	1
Ф-18,Ф -20,Ф-22	Індивідуальний фільтр	Фільтр для стерильної аерації, фірми Munktell, діаметр 64 мм , розмір пор 0,2 мкм	3
ІН -19	Інокулятор	Ферментер New Brunswick BioFlo 310 , для вирощування інокуляту, оснащений паровою сорочкою, барботером , мішалкою, пробовідбірником, трубою перетискання та автоматичним датчиком рівня піни. Швидкість перемішування 50 об/хв . Об'єм 50 л. Виробник: (Росія).	1
ІН -21	Інокулятор	Ферментер New Brunswick BioFlo 310 , для вирощування інокуляту, оснащений паровою сорочкою, барботером , мішалкою, пробовідбірником, трубою перетискання та автоматичним датчиком рівня піни. Швидкість перемішування 50 об/хв . Об'єм 500 л. Виробник: (Росія).	1

ФР-23	Ферментер	Ферментер фірми «Luxin International Group» об'ємом 32 м <sup>3</sup> оснащений мішалкою із нержавіючої сталі, швидкість перемішування 50 об/хв. Також має барботер для подачі стерильного повітря та нижній спуск. Оснащений механічним піногасником.	1
Н-24	Насос відцентровий	Відцентровий, тип KRSН 32/160 Продуктивність 10 м <sup>3</sup> /год, потужність двигуна 2,5 кВт	1
ЗБ-25	Збірник для зберігання культуральної рідини	Збірник оснащений кришкою, нижнім спуском, перемішуючим пристроєм. Об'єм 3000 л; н/сталь AISI 304, Biotechno [85]	1
Н-26	Насос відцентровий	Насос горизонтальний відцентровий Debem MB 100. Максимальна продуктивність 1,5 м <sup>3</sup> /год, матеріал поліпропілен (PP/PVDF). Виробник: «Debem» (Україна)	1
Ц -27	Центрифуга	Центрифуга СЕРА Z 61/Z 61 GP Макс. швидкість – 17 тис.об /хв., продуктивність min/max л/год – 50 /1500, Biotechno [80]	1
МФ-28	Мембранно - фільтруючий модуль для мікро та ультрафільтрації	Установка для мікро- и ультрафільтрації УФ-401/402 Швидкість подачі – 144/284 л/хв Biotechno [80]	1
ФП-29	Фасувально-пакувальний апарат	Апарат для розливу, закупорки та фасування ємностей FPC60, виробник США	1

## РОЗДІЛ 9. Опис технологічної схеми

Технологічна схема отримання протимікробного препарату на основі бактеріофагу Хссф1 складається з наступних допоміжних робіт: підготовка аераційного повітря, поживних середовищ та первинного пакування, а також технологічного процесу: підготовка посівного матеріалу, біосинтез біомаси бактеріофагу Хссф1, зберігання культуральної рідини, її відділення від клітинного дебрису, центрифугування, мікро та ультрафільтрація. Стадії ПМВ

Технологічна схема виробництва протимікробного препарату на основі бактеріофагу Хссф1 наведено у графічній частині даного курсового проекту.

### ДР 1. Підготовка аераційного повітря

Повітря, яке використовується для аерації у процесі культивування посівного матеріалу в посівному апараті та в процесі біосинтезу в ферментері повинно бути стерильним та мати температуру 28 – 30 °С .

Перед тим, як повітря потрапляє до ферментеру , воно проходить повну очистку та стерилізацію, в результаті якої звільняється від мікроорганізмів. В ферментер очищене повітря подається через барботер.

#### ДР 1.1 Забір атмосферного повітря та видалення вологи

Забір повітря здійснюється повітрозбірником ПЗ-1 на висоті близько 20 – 30 м.

Потім повітря через повітрозабірну шахту потрапляє до фільтру попереднього очищення.

#### ДР 1.2 Грубе очищення повітря

На стадії грубого очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром до 150 , 300 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення використовують фільтри грубої очистки Ф-2 – ФЯП . Який складається з рамки, виготовленої з оцинкованої сталі, усередині якої покладений об'ємний фільтруючий матеріал (поліуретан).

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кутрик І.В.			Розділ 9. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							71	102
Керівник		Буценко Л.М.						
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П						
						Кафедра БТМ		

Ефективність очищення повітряними фільтрами ФЯП становить 80 %.

### ***ДР 1.3 Стабілізація термодинамічних показників***

Повітря «переохолоджують» до температури 25 – 40 °С в теплообміннику-охолоджувачі Т-4. При охолодженні стисненого повітря випадає 50 – 70 % вихідної вологи, яка відділяється вологовідділювачами. Повітря подається в ресивер для акумуляції та стабілізації термодинамічних показників. Ресивер має конденсато-відвідний канал. Тиск вирівнюється, вирівнюється пульсація потоку, вологість встановлюється на рівні  $W = 30 - 60\%$ .

### ***ДР 1.4 Стиснення повітря, попередня фільтрація***

Стиснення повітря здійснюється у компресорі К-3 при тиску 0,4 МПа, при цьому температура може підніматися від 120 до 250°C.

### ***ДР 1.5 Очищення повітря на фільтрах тонкої очистки***

Подальше очищення повітря відбувається у головному фільтрі Ф-7. Для головних фільтрів використовується фільтр ФТО-750 з ефективністю  $E = 99,92\%$ . З головного фільтра повітря подається в індивідуальні фільтри Ф-18, Ф-20, Ф-22, які встановлені на кожному інокуляторі та на виробничому ферментері.

### ***ДР 1.6 Очищення повітря на індивідуальних фільтрах***

Для тонкого очищення повітря використовується індивідуальний мембранний фільтр Microfluor II.

Фільтр виготовляються в вигляді фільтропатронів і капсулів, що дозволяє застосовувати різні технологічні рішення.

Фільтр встановлюють перед кожним інокулятором та виробничим ферментером і забезпечує очистку повітря від часток діаметром 0,2 мкм. Отримуємо стерильне аераційне повітря зі ступенем очищення – 99,9999 %.

Стерилізацію фільтруючого матеріалу проводять парою при температурі 145 °С.

## **ДР 2. Приготування та стерилізація поживних середовищ**

### ***ДР 2.1 Приготування та стерилізація поживних середовищ для колби 5 л***

Таблиця 9.1

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 2,8 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції V, л
М'ясний екстракт	10	0,028	А	1,4
Пептон	10	0,028		
NaCl	5	0,014	Б	1,4
<b>Разом</b>				<b>2,8</b>

Для вирощування інокуляту потрібно приготувати 2,8 л поживного середовища Джерелом вуглецю та азоту в середовищі є м'ясний екстракт і пептон.

#### ***ДР 2.1.1 Приготування та стерилізація композиції А***

На технічних вагах зважують 28 г пептону, 28 г м'ясного екстракту. Наважку вносять в колбу об'ємом 2 л, додають 1344 мл питної води, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві АК-16 при температурі 112°C впродовж 30 хв.

#### ***ДР 2.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б***

На технічних вагах зважують 14 г NaCl. Наважку вносять в колбу об'ємом 2 л, додають 1386 мл питної води, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві АК-16 при температурі 131°C впродовж 40 хв.

#### ***ДР 2.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ для інокулятора 50 л***

Таблиця 9.2

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 275,9 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції V, л
М'ясний екстракт	10	0,305	А	13,85
Пептон	10	0,305		
NaCl	5	0,1525	Б	13,85
<b>Разом</b>				<b>27,7</b>

### *ДР 2.2.1 Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 305 г пептону, 305 г м'ясного екстракту. Наважки рівноцінно ділять на 5 порцій по 61 г, вносять в п'ять колб об'ємом 5 л, додають в кожну колбу 2,648 л питної води, перемішують і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С впродовж 30 хв.

### *ДР 2.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 152,5 г NaCl. Наважки рівноцінно ділять на 5 порцій по 30,5 г, вносять в п'ять колб об'ємом 5 л, додають в кожну колбу 2,74 л питної води, перемішують і стерилізують в автоклаві при температурі 131°С впродовж 40 хв.

### *ДР 2.3 Приготування та стерилізація поживних середовищ для інокулятора 500 л*

Таблиця 9.3

Компонент поживного середовища	Вміст, г /л	Кількість для приготування 275,9 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції V, л
М'ясний екстракт	10	3,034	А	137,95
Пептон	10	3,034		

NaCl	5	1,517	Б	137,95
<b>Разом</b>				<b>275,9</b>

**ДР 2.3.1 Приготування та стерилізація композиції А**

На технічних вагах зважують 3034 г пептону, 3034 г м'ясного екстракту. Наважку вносять в реактор-змішувач Р-9 об'ємом 200 л, додають 131,88 л питної води, перемішують і стерилізують в збірнику при температурі 112°C впродовж 30 хв.

**ДР 2.3 .2 Приготування та стерилізація композиції Б**

На технічних вагах зважують 1517 г NaCl. Наважку вносять в реактор-мішувач Р-11 об'ємом 200 л, додають 136,43 л питної води, перемішують, подають в інокулятор 500 л стерилізують при температурі 131°C впродовж 40 хв .

**ДР 2.4 Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого ферментеру 5000 л**

Таблиця 9.4

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г /л</b>	<b>Кількість для приготування 275,9 л середовища, кг (л)</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції V, л</b>
М'ясний екстракт	10	30,04	А	1365,5
Пептон	10	30,04	Б	1365,5
NaCl	5	15,0		
<b>Разом</b>				<b>2731</b>

#### ***ДР 2.4.1 Приготування та стерилізація композиції А***

На технічних вагах зважують 30,04 кг пептону, 30,04 г м'ясного екстракту. Наважку вносять в ректор-змішувач Р-13 об'ємом 2000 л, додають 1305,42 л питної води, перемішують і стерилізують в збірнику при температурі 112°C впродовж 30 хв.

#### ***ДР 2.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б***

На технічних вагах зважують 15 кг NaCl. Наважку вносять в ректор - змішувач Р-15 об'ємом 2000 л, додають 1350,5 л питної води, перемішують, подають в ферментер 5000 л стерилізують при температурі 131°C впродовж 40 хв.

### **ТП 3. Підготовка посівного матеріалу**

#### ***ТП 3.1 Підтримання колекційної культури***

Для одержання посівного матеріалу використовують вихідний штам продуцента. Культуру *Xanthomonas campestris* Хссф1 зберігають на скошеному сусло-агарі. Кожні 3-4 місяця здійснюють пересіви. Завжди при роботі з колекційною культурою дотримуються правил асептики.

#### ***ТП 3.2 Одержання робочої культури***

Колекційну культуру *Xanthomonas campestris* Хссф1, що зберігається в пробірках з МПА, розсівають до ізольованих колоній на чашки Петрі і вирощують при температурі 28°C упродовж 48 годин.

#### ***ТП 3.3 Вирощування культури в колбі 5 л в шейкері-інкубаторі***

В колбу 5 л в асептичних умовах вносять композицію А і композицію Б. У пробірку з робочою культурою *Xanthomonas campestris*, вирощену на МПА, вносять 5 мл стерильної води та роблять змив культури. Одержану суспензію вносять в колбу з стерильним поживним середовищем. Тривалість вирощування становить 24 години, температура 28°C. частота обертання шейкера-інкубатора – 20 об/хв. Після закінчення культивування та проведення мікробіологічного контролю визначають концентрацію біомаси, яка повинна становити 0,5 -0,6 г/л.

#### ***ТП 3.4 Вирощування культури в інокуляторі 50 л***

Вміст колби асептично переноситься в посівний апарат ІН-19 з підготовленим поживним середовищем. Тривалість культивування складає 24 год при 30°C. Кожні 4 години з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, яка для посівного матеріалу на 24 годину культивування повинна становити 0,5 - 0,6 г /л, концентрації джерела вуглецю та азоту.

### ***ТП 3.4 Вирощування культури в інокуляторі 500 л***

Вміст інокулятора 50 л асептично переноситься в посівний апарат ІН-21 500 л з підготовленим поживним середовищем за допомогою труби перетискування. Тривалість культивування в інокуляторі 500 л складає 24 год при 30°C. Кожні 4 години з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, яка для посівного матеріалу на 24 годину культивування повинна становити 0,5 - 0,6 г /л, концентрації джерела вуглецю та азоту.

## **ТП 4. Підготовка посівного матеріалу бактеріофагу**

### ***ТП 4.1 Підтримання колекційної культури***

Штам бактеріофага Хссф1 зберігається у вигляді музейної культури при температурі 4°C.

### ***ТП 4.2 Суспендування фагу***

Колекційна культура бактеріофагу Хссф1 знаходиться в ліофілізованому вигляді. Для активації культури готують суспензію фагу. Для цього у пробірку з фагом додають фізіологічний розчин та ретельно перемішують для гомогенізації.

### ***ТП 4.3 Вирощування фагу на культурі *Xanthomonas campestris****

На пробірки попередньо засіяні культурою *Xanthomonas campestris* вносять суспензію фага та культивують 2-3 год у термостаті при температурі 28°C. Контролюють відсутність сторонньої мікробіоти. Після культивування проводять змив фізіологічним розчином, утворену суспензію переливають в колбу 5 л дотримуючись умов асептики.

### ***ТП 4.4 Вирощування фагу в колбі 5 л в шейкері-інкубаторі***

Фагова суспензія з пробірок вноситься в колбу 5 л, культивують в поетапних 3 рази в шейкері-інкубаторі 2-3 години при температурі 28 °С. Далше отриманий посівний матеріал бактеріофагу передають на стадію біосинтезу в ферментер 5000 л.

#### ***ТП 4.5 Центрифугування***

Далі проводять центрифугування на швидкості 4 тис. об/хв. Протягом 15 хвилин. Метою центрифугування є осадження обломків клітин *Xanthomonas campestris*. Надосадову рідину відбирають для здійснення подальших маніпуляцій, лізовані клітини утилізують.

#### ***ТП 4.6 Фільтрування надосадової рідини***

Після центрифугування отриману надосадову рідину фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,2 мкм, передають на стадію ТП 5.1.

### **ТП 5. Біосинтез**

#### ***ТП 5.1 Виробниче культивування***

Виробниче культивування проводять у ферментері ФР-23 з об'ємом 5000 л з робочим об'ємом – 3004 л. В ферментер з композицією Б з збірника подають композицію А, посівний матеріал від інокулятора, та посівний матеріал бактеріофагу вносять через 21 годину з початку культивування при досягненні в культуральній рідині  $OD_{600} = 0,5$ . Ферментер обладнаний датчиком для відстежування рівня рН.

Тривалість культивування складає 24 год при 28°C та за постійної подачі стерильного аераційного повітря. Кожні 4 год з ферментера відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. В кінці культивування в лізаті бактерій визначають кількість бактеріофага (БУО/мл).

### **ДР 6. Підготовка ємностей 2 л**

#### ***ДР 6.1 Візуальний контроль ємностей***

Проводять візуальний перегляд і відбраковують ємності, що мають включення, відхилення від вимог ТУ за зовнішнім виглядом та геометричними параметрами. Брак збирають у контейнери, маркують етикетками і передають

на утилізацію.

## **ТП 7. Відділення біомаси фагів**

### ***ТП 7.1. Зберігання культуральної рідини***

Після біосинтезу цільового продукту, культуральна рідина відправляється на стадію зберігання в збірник (З-25). У промислових умовах після завершення процесу культивування бактеріофагу, про що свідчить повний лізис клітин, до культуральної рідини додають консервант хінозол (0,01 %). Розчин хінозолу володіє протигрибковою та антибактеріальною дією.

### ***ТП 7.2. Центрифугування культуральної рідини***

Культуральна рідина з збірника (ЗБ-25) подається у центрифугу (Ц-27), де відбувається центрифугування при 5000 об/хв, тривалість обробки становить 15 хв. Фугат, що утворився після закінчення процесу передають на фільтрацію до ТП 8.

## **ТП 8. Концентрування та очищення бактеріофагів**

### ***ТП 8.1. Мікрофільтрація***

Центрифугат від Ц-25 подається до стандартизованої мікрофільтраційної установки (МФ-28). Під час мікрофільтрації розчин проходить через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм, очищується від клітинного дебрису що не був відділений під час центрифугування, а також від залишків поживного середовища.

### ***ТП 8.2. Ультрафільтрація***

За допомогою вмонтованих в ультрафільтраційну установку насосів відфільтрована попередньо рідина надходить до наступного фільтру ультрафільтраційного модуля. Ультрафільтрація проводиться на мембранах з діаметром пор 0,05 мкм, що дозволяє затримати білкові сполуки, що не були затримані при мікрофільтрації і на виході отримати розчин фаголізату.

## **ПМВ 9. Пакування, маркування, відвантаження**

Пакування, маркування та відвантажування здійснюється в (ФП-29). На цій стадії, препарат розливається у пляшки по 2 л, які закриваються пробками, наліплюються етикетки, пакуються в коробки в які вкладаються інструкції до

застосування. Готовий продукт відвантажується на склад.

## **ЗВ 10. Знешкодження та переробка відходів.**

### ***ЗВ 10 .1. Знешкодження рідких відходів***

Оскільки виробництво не є великотоннажним, відходи складають не великі об'єми , а також не є токсичними як з мікробіологічної точки зору (передбачена обробка дезінфікуючим розчином ), так і з хімічної (не використовуються агресивні речовини), тому проводити знешкодження рідких відходів немає необхідності.

### ***ЗВ 10.2. Знешкодження твердих відходів***

Тверді відходи подаються на утилізацію.

## РОЗДІЛ 10 . Контроль виробництва

Упродовж культивування кожні 8 год відбирають проби культуральної рідини (окрім підготовки посівного матеріалу в колбі з шейкера-інкубатора, де проба відбирається лише після культивування) для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

### 10.1 Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом культуральної рідини на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопіюванням (див. *рис.10.1*). Попередньо відібрану культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло -агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА ) – для виявлення дріжджів і грибів.

Результати мікроскопіювання :

- стерильного поживного середовища – відсутність мікробіоти;
- посівного матеріалу – відсутність сторонньої мікрофлори;
- культуральної рідини – відсутність сторонньої мікрофлори.



*a*

*б*

*Рис. 10.1* Культура *Xanthomonas campestris* Xccφ1: *a* - на агаризованому середовищі , *б* – під мікроскопом.

				<b>10.2 Концентрація біомаси</b>		
				<b>НУХТ ВТЕК 02.01.01 КР ПЗ</b>		
Змн.	Лист	Концентрацію мікробних клітин визначають за оптичною густиною на				
Розроб.	Кутрик І.В.			Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.					81	102
Керівник	Буценко Л.М.			Кафедра БТМ		
Н. Контр.						
Зав. каф.	Стабніков В.П					
Розділ 10. Контроль виробництва						

фотоелектроколориметрі або спектрофотометрі за допомогою побудови калібрувального графіка. Оптична густина має досягати позначки близько 0,6 одиниць.

### 10.3 Концентрація цільового продукту

Визначення активності бактеріофага проводять за методом Аппельмана і методом Грація. Метод Аппельмана полягає у визначенні літичної активності бактеріофага на рідких середовищах шляхом встановлення його максимального розведення, що викликає повний лізис бульйонної культури бактерій.

В ряд стерильних пробірок з однаковим діаметром наливають по 4,5 мл поживного середовища. У першу пробірку вносять 0,5 мл випробувального фага, який в подальшому послідовно розводять переносючи з пробірки в пробірку по 0,5 мл (кожен раз окремою стерильною градуйованою піпеткою). Зазвичай готують 10 розведень фага. З останньої (10-ї) пробірки зайві 0,5 мл виливають. Потім в усі пробірки вносять 1-2 краплі 18-годинної бульйонної культури *Xanthomonas campestris*. В якості контролю служать додаткові пробірки – 11 і 12, в одній з них знаходиться рідке поживне середовище і культура (без фага), в іншій – поживне середовище (контроль стерильності). Всі пробірки інкубують в термостаті при 28°C протягом 18 годин. Літичну активність фага, виражену в титрі, встановлюють за останньою пробіркою, в якій відсутня мутність або осад. При обліку результатів слід струсити. Таким чином, титр бактеріофага, по Аппельману, виражається максимальним розведенням фага, при якому стався повний лізис відповідної культури [86].

Метод агарових шарів за Грація. Визначення титру фага проводять методом агарових шарів за Грація (титрування фага на твердому поживному середовищі).

Хід роботи:

1. 1,5% агар заливають в чашки Петрі по 15-20 мл, висушують (10 чашок).

2. Досліджуваний фаг титрують методом 10-кратних розведень (в 12 пробірок вносять 4,5 мл фіз. розчину та додають 0,5 мл фага в першу

пробірку ).

3. У пробірки наливають 2-3 мл розплавленого 0,7%-ного агару та охолоджують до 45°C, потім додають 1 мл бактеріофагу (попередньо розведеного) і 0,2 мл бактеріальної культури. Вміст пробірки ретельно перемішують та виливають в чашки Петрі на нижній агар. Нумерація чашок Петрі з нижнім і пробірок з верхнім агаром відповідає нумерації розведень фага.

4 . Після того як верхній шар застиг, чашки Петрі ставлять на інкубацію (в термостат на 18-20 годин при 28°C).

Через 18 годин підраховують результати. Присутність фагів визначається його здатністю утворювати прозорі негативні колонії [87].

#### **10.4 Концентрація джерела вуглецю і азоту**

Оскільки джерела вуглецю і азоту – м'ясний екстракт і пептон мають невизначений склад, а саме продукти розпаду білків, то будемо вважати, що компоненти взяті в надлишку.

#### **10.5 Визначення літичної активності бактеріофагів**

Визначення літичної активності бактеріофагів проводиться методом Аппельмана. Це метод визначення літичної активності бактеріофага на рідких середовищах шляхом встановлення його максимального розведення, що викликає повний лізис бульйонної культури бактерій.

В ряд стерильних пробірок з однаковим діаметром наливають по 4,5 мл поживного середовища. В першу пробірку ряду вносять 0,5 мл випробуваного фага, який надалі послідовно розводять, переносять з пробірки в пробірку по 0,5 мл (кожен раз окремою стерильною градуйованою піпеткою). Зазвичай готують 10 розведень фага . З останньої (10-ї) пробірки зайві 0,5 мл виливають. Потім в усі пробірки вносять 1-2 краплі 18-годинної культури *X.campestris*. В якості контролю служать додаткові пробірки - 11 і 12; в одній з них знаходиться рідке поживне середовище і культура (без фага), в іншій - поживне середовище (контроль стерильності). Всі пробірки інкубують в термостаті при  $t = 37^{\circ}\text{C}$  протягом 18 год. Літичну активність фага, виражену в

титрі, встановлюють за останньою пробіркою, в якій відсутня мутність або осад. При обліку результатів дослідження пробірки слід струсити. Титр бактеріофага, по Аппельману, виражається максимальним розведенням фага, при якому стався повний лізис відповідної культури.

Дані, отримані титруванням по Аппельману, характеризують лише літичну активність фага. Концентрація ж фагових корпускул визначається титруванням фага на твердих поживних середовищах [88].

### **10.6 Визначання титру фага на твердому поживному середовищі**

Метод агарових шарів за Грація

1. 1,5% агар заливають в чашки Петрі по 15-20 мл, висушують (10 чашок).

2. Досліджуваний фаг титрують методом 10-кратних розведень (в 12 пробірок вносять 4,5 мл фізіологічного розчину та додають 0,5 мл фага в першу пробірку).

3. У пробірки наливають 2-3 мл розплавленого 0,7%-ного агару та охолоджують до 45°C потім додають 1мл бактеріофагу (попередньо розведеного) і 0,2 мл бактеріальної культури. Вміст пробірки ретельно перемішують та виливають в чашки Петрі на нижній агар. Нумерація чашок Петрі з нижнім і пробірок з верхнім агаром відповідає нумерації розведень фага. Ті ж самі висіви проводять із контрольних пробірок на чашці Петрі, які позначають як контроль на ріст бактерій .

4. Після того як верхній шар застиг, чашки Петрі ставлять на інкубацію (в термостат на 18-20 годин при 37°C).

5. Через 18 годин підраховують результати. Присутність фагів визначається його здатністю утворювати прозорі негативні колонії [88].

## 10.7 Карта постадійного контролю виробництва бактеріофага

Таблиця 10.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт 1.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході із фільтра ступінь очищення, тиск	Манометр технічний, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %
Кт 1.3 Стабілізація термодинамічних показників	Охолоджене та нагріте повітря і температура	Термометр технічний	Після охолодження та нагрівання повітря	t = 25 °C, W = 30-60 %
Кт 1.4 Стиснення повітря, попередня фільтрація	Стиснене повітря, температура і тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,4 МПа, t = 120-250 °C
Кт 1.5 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення та перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	E = 99,92 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.6 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення та перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,999 %, тиск згідно паспорту

Кт, Км 2.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр та мікробіологічний контроль	Температура і тиск безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30\text{ хв}$ , $P = 0,05\text{ МПа}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура і тиск вимірюються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40\text{ хв}$ , $P = 0,2\text{ МПа}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр та мікробіологічний контроль	Температура і тиск безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30\text{ хв}$ , $P = 0,05\text{ МПа}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура і тиск вимірюються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40\text{ хв}$ , $P = 0,2\text{ МПа}$ , відсутність мікробіоти

Кт, Км 2.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр та мікробіологічний контроль	Температура і тиск безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30\text{ хв}$ , $P = 0,05\text{ МПа}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура і тиск безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40\text{ хв}$ , $P = 0,2\text{ МПа}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.4.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр та мікробіологічний контроль	Температура і тиск під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30\text{ хв}$ , $P = 0,05\text{ МПа}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура і тиск вимірюються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40\text{ хв}$ , $P = 0,2\text{ МПа}$ , відсутність мікробіоти

<p>Кт, Км 3.1 Підтримання колекційної культури <i>Xanthomonas campestris</i> Хссф1</p>	<p>Колекційна культура, температура, тривалість пересівів, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура безперервно під час зберігання, пересіви у визначений термін, мікробіологічний контроль після пересівів та збереження</p>	<p><math>t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 3\text{-}4</math> місяці, відсутність сторонньої мікробіоти, ознаки присутні даному м/о</p>
<p>Кт, Км 3.2 Одержання робочої культури</p>	<p>Морфологічна, однорідність <i>Xanthomonas campestris</i> Хссф1 температура, тривалість вирощування, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура безперервно під час вирощування, м/б контроль проводять після вирощування</p>	<p><math>t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 48</math> год, відсутність сторонньої мікробіоти, ознаки присутні даному м/о</p>
<p>Кт, Км 3.3 Вирощування культури в колбі 5 л в шейкері- інкубаторі</p>	<p>Робоча культура, морфологічна, однорідність, температура, тривалість вирощування, швидкість оберту шейкера, концентрація біомаси, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, тахометр, ФЕК, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування</p>	<p><math>t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 24</math> год, <math>\omega = 20</math> об/хв <math>c(X) = 0,5\text{-}0,6</math> г/л відсутність сторонньої мікробіоти, ознаки присутні даному м/о</p>

<p>Кт, Км 3.4 Вирощування культури в інокуляторі 50 л</p>	<p>Посівний матеріал, морфологічна, однорідність, температура, тривалість вирощування, швидкість обертів мішалки, концентрація біомаси, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, тахометр, ФЕК, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування</p>	<p><math>t = 30^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 24</math> год, <math>\omega = 20</math> об/хв <math>c(X) = 0,5-0,6</math> г/л відсутність сторонньої мікробіоти, ознаки присутні даному м/о</p>
<p>Кт, Км 3.5 Вирощування культури в інокуляторі 500 л</p>	<p>Посівний матеріал, морфологічна, однорідність, температура, тривалість вирощування, швидкість обертів мішалки, концентрація біомаси, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, тахометр, ФЕК, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування</p>	<p><math>t = 30^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 24</math> год, <math>\omega = 20</math> об/хв <math>c(X) = 0,5-0,6</math> г/л відсутність сторонньої мікробіоти, ознаки присутні даному м/о</p>
<p>Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури</p>	<p>Штам бактеріофага Хссф1, температура, тривалість пересівів, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура безперервно під час зберігання, пересіви у визначений термін, мікробіологічний контроль після пересівів та збереження</p>	<p><math>t = 4^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 3-4</math> місяці, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

<p>Кт, Км 4.2 Суспендування фагу</p>	<p>Колекційна культура бактеріофагу Хссф1 (ліофілізована), гомогенізація розчину, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Тривалість гомогенізації, м/б контроль</p>	<p>Після додання фізіологічного розчину та ретельного перемішування</p>	<p><math>\tau = 15</math> хв, відсутність сторонньої мікрофлори</p>
<p>Кт, Кт 4.3 Вирощування фагу на культурі <i>Xanthomonas campestris</i></p>	<p>Морфологічна, однорідність <i>Xanthomonas campestris</i> температура, тривалість вирощування, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура безперервно під час вирощування, м/б контроль проводять після вирощування</p>	<p><math>t = 28^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 2-3</math> год, відсутність сторонньої мікробіоти, ознаки присутні даному м/о</p>
<p>Кт, Км 4.4 Вирощування фагу в колбі 5 л в шейкері-інкубаторі</p>	<p>Морфологічна, однорідність фагової суспензії температура та кількість етапів вирощування, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура безперервно під час вирощування, м/б контроль проводять після вирощування</p>	<p><math>t = 28^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 2-3</math> год, N=3 рази, відсутність сторонньої мікробіоти, ознаки присутні даному м/о</p>
<p>Кт 4.5 Центрифугування</p>	<p>Частота обертів, тривалість процесу</p>	<p>Тахометр, годинник</p>	<p>Частота обертів перевіряється безпосередньо перед і під час процесу, час під час проведення операції</p>	<p><math>W = 4\ 000</math> об/хв, <math>T = 15</math> хв,</p>

Кт 4.6 Фільтрування надосадової рідини	Надосадова рідина	Мембранні фільтри з відповідним діаметром пор, мікробіологічний контроль	Діаметр пор перевіряється до стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$d = 0,2$ мкм, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 5.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури та визначення оптичної щільності, концентрації біомаси, джерела вуглецю та азоту і визначення кількості бактеріофага (БУО/мл)	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, ФЕК, метод Аппельмана і метод Грація	Температура під мікроскопіювання та визначення оптичної щільності, концентрації біомаси, джерела вуглецю і азоту кожні 4 год, а визначення кількості бактеріофага (БУО/мл) в кінці культивування	$t = 28^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 24$ год, При $OD_{600} = 0,5$ вносимо посівний матеріал бактеріофагу $c(\text{бактеріофагу Хссф1}) = 1 \times 10^8$ (БУО/мл) відсутність сторонньої мікробіоти
Кт 7.2 Центрифугування культуральної рідини	Частота обертів барабана, час	Візуально на дисплеї центрифуги, годинник	Визначається під час центрифугування	$w = 5000$ об/хв; $\tau = 15$ хв,
Кт 8.1 Мікрофільтрація	Тиск Діаметр пор фільтруючого матеріалу	Манометр технічний	Під час проведення процесу мікрофільтрації	$P=0,1-0,2$ МПа $d = 0.22$ мкм

Кт 8.2 Ультрафільтрація	Тиск Діаметр пор фільтруючого матеріалу	Манометр технічний	Під час проведення процесу ультрафільтрації	$P=0,1\text{МПа}$ $d = 0.05\text{ мкм}$
Кт 9 Наповнення та закупорка ємностей	Повнота наповнення ємностей, якість закупобювання ємностей	Об'ємно ваговий дозатор	Кожну операцію	$V = 2000\text{ мл}$ , ємності мають бути герметично закупорені

## Список використаної літератури:

---

1. Wang X, Wei Zh, Yang Keming et al. Phage combination therapies for bacterial wilt disease in tomato. *Nature Biotechnology*. 2019, 37: 1513–1520.
2. Ткаленко Г.М. Поширення і шкідливість бактеріозів білоголової капусти в лісостепу України. *Захист і карантин рослин*. 2008. 54:396-404
3. Шевченко Т.П., Будзанівська І.Г., Поліщук В.П. Віруси мікроорганізмів. Курс лекцій: Навчальний посібник. –К.: ДП «Видавничий дім «Персонал», 2013. -150 с.
4. Дуда О.К., Бойко В.О., Коцюбайло Л.П. Сучасні можливості запобігання антибіотикорезистентності: бактеріофаги як антимікробні агенти. *Семейная медицина*. 2017 4(72):16-21
5. Шаловило Ю.І., Ковальова В.А. Типи бактеріальних хвороб хвойних рослин. *Науковий вісник НЛТУ України*. 2011. 21.13:68-72
6. Ross R. P., Hill Colin, O'Mahony Jim, Coffey Aidan Bacteriophages and bacterial plant diseases *Frontiers in Microbiology* 2017 8:34 doi:10.3389/fmicb.2017.00034
7. Papaiani, M.; Ricciardelli, A.; Casillo, A.; Corsaro, M.M.; Borbone, F.; Della Ventura, B.; Velotta, R.; Fulgione, A.; Woo, S.L.; Tutino, M.L.; Parrilli, E.; Capparelli, R. The union is strength: the synergic action of long fatty acids and a bacteriophage against *Xanthomonas campestris* Biofilm. *Microorganisms* 2021, 9:60. doi.org/10.3390/microorganisms9010060
8. Papaiani, M.; Cuomo, P.; Fulgione, A.; Albanese, D.; Gallo, M.; Paris, D.; Motta, A.; Iannelli, D.; Capparelli, R. Bacteriophages promote metabolic changes in bacteria biofilm. *Microorganisms* 2020, 8:480. doi.org/10.3390/microorganisms8040480
9. Орынбаев А.Т., Кабанова А.П., Образцова Е.А. Выделение бактериофагов *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* и их использование для защиты капусты от сосудистого бактериоза *Известия ТСХА* 2019 2:35-48 doi: 10.34677/0021-342X-2019-2-35-48

---

10. Schaad N.W., Ignatov A. N. Role of Cruciferous weeds in the epidemiology and biological control of seedborne *Xanthomonas campestris*. Fourth international symposium on biological control of bacterial plant diseases (July 2019 Viterbo, Italy). p. 3-4

11. Fernanda Pereira da Silva, André da Silva Xavier, Fernanda Prieto Bruckner Biological and molecular characterization of a bacteriophage infecting *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, isolated from brassica fields. *Archives of Virology*. 2019. 164: 1857–1862 doi.org/10.1007/s00705-019-04263-4

12. Vo Thi Ngoc Ha, Dzhalilov, Ignatov A.N. Biological properties of bacteriophages specific to blackrot pathogen of brassicas *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Известия ТСХА* 2015. №6: p. 28-36

13. Jensen, B. D., Vicente, J. G., Manandhar, H. K., and Roberts, S. J. Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable Brassica fields in Nepal. *Plant Dis*. 2010. .94: p.298-305. doi:10.1094/ PDIS-94-3-0298

14. Igor Villela Marroni, José Carlos Germani. New Technique to Create a Suspension Containing Bacteriophages and How It Can Be Used to Control Cabbage Leaf Spot Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Scientific Research*. 2014. 5:286-297 doi.org/10.4236/as.2014.54031

15. Botond Balogh, Nguyen Thi Thu Nga, Jeffrey B. Jones. Relative Level of Bacteriophage Multiplication in vitro or in Phyllosphere May Not Predict in planta Efficacy for Controlling Bacterial Leaf Spot on Tomato Caused by *Xanthomonas perforans*. *Frontiers in Microbiology*. 2018. 9:1-10 doi.org/10.3389/fmicb.2018.02176

16. Hirofumi Nagai, Noriyuki Miyake, Shinro Kato. Improved control of black rot of broccoli caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using a bacteriophage and a nonpathogenic *Xanthomonas* sp. strain. *J Gen Plant Pathol*. 2017 83:373–381 DOI 10.1007/s10327-017-0745-4

- 
17. Майоров П.С., Феокистова Н.А., Васильев Д.А. Разработка схемы выделения бактериофагов *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Естественные и технические науки*. 2019. 6:20-25
18. Renu, Bhoyar M.S., Singh U.B., Sahu D.T. Characterization of lytic bacteriophage xcc9sh3 infecting *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Plant Pathology*. 2017 99(1):233-238 DOI: 10.4454/jpp.v99i1.3817
19. Aspen T. Orynbayev, Fevzi Seid Umerovich Dzhalilov & Alexander N. Ignatov Improved efficacy of formulated bacteriophage in control of black rot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage seedlings, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2020. DOI: 10.1080/03235408.2020.1745487
20. Саблук В.Т., Дворак К.П., Буценко Л.М. та ін. Чутливість збудників бактеріозів цукрових буряків до пестицидів. «Цукрові буряки» 2013 4:20-21 [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Cb\\_2013\\_4\\_8](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Cb_2013_4_8).
21. Вдовенко С.А., Щиголь В.І. Урожайність гібридів капусти брюссельської залежно від застосування біопрепаратів. *Вісник уманського національного університету садівництва*. 2015 2:20-23 <https://cyberleninka.ru/article/n/urozhaynist-gibridiv-kapusti-bryusselskoyi-zalezno-vid-zastosuvannya-biopreparativ/viewer>
22. Буценко Л.М., Булеца Н.М., Пасічник Л.А. Збудники бактеріальних хвороб пшениці за дії абіотичних факторів. *Вісник аграрної науки*. 2015 с.31-35 [https://agrovisnyk.com/pdf/ua\\_2015\\_09\\_06.pdf](https://agrovisnyk.com/pdf/ua_2015_09_06.pdf)
23. Захарова О.М., Мельничук М.Д., Данкевич Л.А. та ін. Бактеріальні хвороби ріпаку. *Мікробіол. журн*. 2012. 74(6):46-52
24. Буценко Л.М., Пасічник Л.А., Коломієць Ю.В. та ін. Збудник базального бактеріозу в агрофітоценозі пшениці. *Миронівський вісник*. 2019 8:91-107 <http://mvis.mip.com.ua/article/view/207415/207516>
25. Патица В.П., Гнатюк Т.Т., Житкевич Н.В. Збудники бактеріальних хвороб сої та їх моніторинг. *Вісник аграрної науки*. 2015. [https://agrovisnyk.com/pdf/ua\\_2015\\_06\\_03.pdf](https://agrovisnyk.com/pdf/ua_2015_06_03.pdf)

- 
26. Булеца Н.М., Буценко Л.М., Пасічник Л.А. та ін. Чутливість фітопатогенних бактерій до стрептоміцину за дії пестицидів. *Мікробіол. журн.* 2015. 77(6):62-69 [http://nbuv.gov.ua/UJRN/MicroBiol\\_2015\\_77\\_6\\_9](http://nbuv.gov.ua/UJRN/MicroBiol_2015_77_6_9).
27. Коломієць Ю.В., Григорюк І.П., Буценко Л.М. Системна дія мікробних препаратів на збудники бактеріальних хвороб рослин томатів *Агроекологічний журнал* 2016 3:83-88
28. Петриченко В.Ф., Корнійчук О.В., Пасічник Л.А. Бактеріальні хвороби сільськогосподарських рослин і пестициди *Вісник аграрної науки* 2013 21-26
29. Майоров П. С., Феоктистова Н. О., Васильев Д. А. Основные технологические параметры изготовления биопрепарата для борьбы с возбудителем сосудистого бактериоза крестоцветных. *Вестник Ульянов. госуд. сельскохозяйств. акад.* 2020, 06.01.00: 60-64. DOI 10.18286/1816-4501-2020-1-60-64
30. Papaiani Marina, Paris Debora, Woo Sheridan L. Plant dynamic metabolic response to bacteriophage treatment after *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* infection *Frontiers in Microbiology* 2020 11:723 DOI=10.3389/fmicb.2020.00732
31. Орынбаев А.Т., Джалилов Ф.С-У., Рuzимурадова Л.Р Защита капусты от сосудистого бактериоза с использованием бактериофагов. *Сборник трудов международной научно-практической конференции.* 2019 35-40
32. Sofie Rombouts Management of the bacterial pathogens *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Pseudomonas syringae* pv. *porri* in cabbage and leek production using novel bacteriophages. 2017
33. Герасимович А.Д., Новик Г. И., Коломієць Е.И.. Характеристика бактериофагов фитопатогенных бактерий. 2012 150-167
34. Lange H. W., Tancos M. A., Carlsonan O. Diversity of *Xanthomonas campestris* isolates from symptomatic crucifers in new york state. *Bacteriology.* 2016 114-122 [doi.org/10.1094/PHYTO-06-15-0134-R](https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-15-0134-R)
35. Katarina Gašić, Nemanja Kuzmanovic, Milan Ivanovic. Complete Genome of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Specific Bacteriophage K81, Its

---

Survival and Potential in Control of Pepper Bacterial Spot. *Frontiers in Microbiology*. 2018. 9:1-15

36. Jeong-A Lim, Samnyu Jee, Dong Hwan Lee. Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Using Bacteriophage PP1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2013. 23(8):1147–1153 doi.org/10.4014/jmb.1304.04001

37. Kalpage M. D. and De Costa D. M. Isolation of Bacteriophages and Determination of their Efficiency in Controlling *Ralstonia solanacearum* Causing Bacterial Wilt of Tomato. *Tropical Agricultural Research*. 2014. 26(1):140-150

38. Moran, Thomas Edward. Isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* virus Bfi1: a biofilm inhibiting phage. *College of Science and Health Theses and Dissertations*. 2018 [https://via.library.depaul.edu/csh\\_etd/318](https://via.library.depaul.edu/csh_etd/318)

39. R. Czajkowski, Z. Ozymko and E. Lojkowska. Isolation and characterization of novel soilborne lytic bacteriophages infecting *Dickeya* spp. biovar 3 (*D. solani*). *Plant Pathology* 2014. 63:758–772 Doi: 10.1111/ppa.12157

40. Sofie Rombouts, Anneleen Volckaert, Sofie Venneman. Characterization of Novel Bacteriophages for Biocontrol of Bacterial Blight in Leek Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri*. *Frontiers in Microbiology*. 2016 7:1-15 doi.org/10.3389/fmicb.2016.00279

41. Koji Azegami Suppressive effect of bacteriophage on bacterial palea browning of rice caused by *Pantoea ananatis*. *J Gen Plant Pathol*. 2013. 79:145–154 DOI 10.1007/s10327-013-0435-9

42. Воронина М. В., Бугаева Е. Н., Васильева Д. М. Характеристика бактериофага *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* PP16, перспективного для биоконтроля мягкой гнили картофеля. *Микробиология*, 2019, 88(4):1–12

43. Беккалиева А.К., Феоктистова Н.А., Васильев Д.А. Подбор параметров культивирования бактериофагов *Pseudomonas syringae* *Актуальные вопросы ветеринарной медицины, биотехнологии, биологии и экологии* 2020 252-255

---

44. Andrew Day, Jiyeon Ahn, George P. C. Jumbo Bacteriophages Are Represented Within an Increasing Diversity of Environmental Viruses Infecting the Emerging Phytopathogen, *Dickeya solani* Front. Microbiol. 2018 9:15 doi.org/10.1080/07060661.2011.588250

45. Robert Czajkowski, Zofia Ozymko, Szymon Zwirowski. Complete genome sequence of a broad-host-range lytic *Dickeya* spp. bacteriophage D5 Arch Virol 2014 159:3153-3155 DOI 10.1007/s00705-014-2170-8

46. Alič Špela, Naglič Tina, Tušek-Žnidarič Magda Newly isolated bacteriophages from the podoviridae, siphoviridae, and myoviridae families have variable effects on putative novel *Dickeya* spp. Frontiers in Microbiology 2017. 8:1-14 doi.org/10.3389/fmicb.2017.01870

47. Бойко А.А., Жуминская А.И., Кушкина А.И. Характеристика КЕУ-подобных бактериофагов *Erwinia amylovora*. Допов. Нац. акад. наук Укр 2017 12:97-103 doi: https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.12.097

48. Орловская П.И., Гирилович Н.И., Пилипчук Т.А. Оптимизация условий культивирования фитопатогенных бактерий и лизиса их бактериофагами 2019 136-139

49. Бесараб Н.В., Лагоненко А.Л., Евтушенков А.Н., Моховиков М.А., Мильчанин О.В. Выделение и характеристика культур бактериофагов, специфичных в отношении фитопатогенной бактерии *Erwinia amylovora*. Аграрная наука. 2019. 1:127-130. doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-1-127-130.

50. Васильев Д.А., Беккалиева А.К., Феоктистова Н.А.. Конструирование бактериофагового препарата для биоконтроля *Pseudomonas syringae* в растениеводстве Ветеринария и зоотехния. 2020. 130-137 DOI 10.18286/1816-4501-2020-2-130-137

51. Зябрева А.А. Использование бактериофагов в растениеводстве. 2017 63-68

---

52. Пилипчук Т.А., Герасимович А.Д., Рахуба Д.В. Биопрепарат на основе бактериофагов для защиты растений от фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas*. *Микробиология*. 2013 8(1): 131-137

53. Фальковская У.В., Калинина А.Н., Синеокий С.П. Идентификация фитопатогенных бактерий – хозяев бактериофагов для разработки препаратов для биозащиты сельскохозяйственных растений. *Инфекция и иммунитет*. 2014 с.116

54. Орынбаев А.Т., Джалилов Ф.С., Рузимурадова Л.Р. Защита капусты от сосудистого бактериоза с использованием бактериофагов. *Сборник трудов международной научно-практической конференции* 2019. 31-33

55. Герасимович А.Д., Новик Г.И., Коломиец Е.И. Характеристика бактериофагов фитопатогенных бактерий. 2012, 140-152

56. Монахос Г.Ф., Джалилов Ф.С. Проявление симптомов сосудистого бактериоза у капустных растений с различными генами устойчивости в зависимости от концентрации инокулюма *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* *Известия ТСХА*, 2015. 1:26-34

57. Мазурин Е.С., Игнатов А.Н., Матвеева Е.В. та ін. Оцінка штамового різноманіття збудника судинного бактеріозу капусти. *Известия ТСХА*. 2010. 5:66-75

58. Орынбаев А.Т., Джалилов Ф.С. Защита рассады капусты от сосудистого бактериоза. *Современные технологии и средства защиты растений – платформа для инновационного освоения в АПК России*. 2018. 115-116

59. Орынбаев А.Т., Джалилов Ф.С., Масленникова С.Н. Биологическая эффективность различных препаратов против семенной инфекции сосудистого бактериоза капусты. *Овощи России*. 2019. 2(46):88-91

60. Лазарев А.М., Мысник Е.Н., Игнатов А.Н. Арал и зона вредоносности сосудистого бактериоза капусты. *Вестник защиты растений*. 2017. 1(91):52-55

- 
61. Agriphage [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.agriphage.com/>
62. Прокопенко О.М. Рослинництво України. 2018. с. 71-93
63. Мирошников К.А. Проблемы и перспективы применения бактериофагов в растениеводстве. *Бактериофаги: враги наших врагов*. 2016. 70(4)
64. Вдовенко С.А., Щиголь В.І. Урожайність гібридів капусти брюссельської залежно від застосування біопрепаратів. *Вісник уманського національного університету садівництва*. 2015 2:20-23
65. Майоров П.С. Разработка фагового препарата бактерий *Xanthomonas campestris* и область его практического применения. 2021.
66. Jensen, B. D., Vicente, J. G., Manandhar, H. K., and Roberts, S. J. Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable Brassica fields in Nepal. *Plant Dis.* 2010. .94: p.298-305. doi:10.1094/ PDIS-94-3-0298
67. Igor Villela Marroni, José Carlos Germani New Technique to create a suspension containing bacteriophages and how it can be used to control cabbage leaf spot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Agricultural Sciences* 2014 5:286-297
68. Papaiani M., Paris D., Sheridan L. Plant Dynamic Metabolic Response to Bacteriophage Treatment After *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* infection. *J Plant Pathol.* 2020
69. Igor Villela Marroni, José Carlos Germani New Technique to create a suspension containing bacteriophages and how it can be used to control cabbage leaf spot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Agricultural Sciences* 2014 5:286-297
70. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов. –М.: Пищевая промышленность, 1975. – 391 с.

---

71. Забор – атмосферный воздух. Большая Энциклопедия Нефти и Газа. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ngpedia.ru/id20748p1.html>

72. Блейхер И.Г. Компрессорные станции: учеб./ И.Г. Блейхер, В.П. Лисеев – М.: Машгиз, 1959. – 323 с.

73. Егорова Н.С. Промышленная микробиология. - 1989. – 688с.

74. Д.А. Новиков Выделение и очистка продуктов биотехнологии. - 2014. – 256 с.

75. Ю.В. Карлаш. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В.Карлаш - К: НУХТ, 2013 – 143 с.

76. Касаткин А.Г. Основные процессы и аппараты химической технологии. — М., 1971; Плановский А.Н., Николаев П.И. *Процессы и аппараты химической и нефтехимической технологии.* — М., 1972.

77. Пат. 2573934. Способ получения штамма бактериофага, специфических штаммов бактериофагов и их применение/ Дзядек Я. А и др. – Оpubл 03.05. 2016

78. Пат. 2016897. Способ концентрации и очистки вирусов/ Гирич В.Н и др. – Оpubл. 04.03.2013

79. Вирусология. Методы: Пер.с англ./Под. ред.. Б.Мей – В52 хи. – М.: Мир, 1988. – 344.

80. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ...д-ра биологических наук: 03.00.23, 03.00.07 / С.Н. Золотухин. – Ульяновск, 2007. – 39с.

81. Тихоненко Т.И. Бактериофаг: получение, очистка и свойства компонентов : автореферат дис. ... кандидата биологических наук / Тихоненко Т.И.; [Место защиты: Институт радиационной и физико-химической биологии АН СССР]. - Москва, 1962. - 22 с.

---

82. Пилотная проточная центрифуга СЕРА Z 61/Z 61 GP [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/сeparatsiya/pilotnaya-protochnaya-tsentrifuga-сера-z-61/>

83. Process Technologies Markets [Электронный ресурс] Режим доступа // Режим доступа: <https://multimedia.3m.com/mws/media/4936270/3m-biopharmaceutical-catalog.pdf>

84. *Лич I.B.* Промислова технологія лікарських засобів: конспект лекцій. – К.: НУХТ, 2017. – 323 с.

85. Инжиниринг и комплексные поставки биотехнологического оборудования [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://biotechno.ru/>

86. *Калуныц К.А.* Микробные ферментные препараты: учеб./ *К.А. Калуныц, Л.И. Голгер* – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 302 с.

87. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: лаб. практикум / *Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н.В. Зобова и др.* – Электрон. дан. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.

88. Методичні рекомендації до спецпрактикуму «Віруси мікроорганізмів» для студентів денної форми навчання ННЦ «Інститут біології» / Київський національний університет імені Тараса Шевченка. - Київ – Упорядники: *О.М. Андрійчук, Т.П. Шевченко, А.В. Харіна, В.П. Поліщук* - 2011. - 45 с.