

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

«До захисту допущено»

Директор інституту (декан факультету)

Завідувач кафедри

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

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

«__» _____ 2021 р.

«__» _____ 2021 р.

Кваліфікаційна робота

на здобуття освітнього ступеня бакалавра

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

освітньо-професійної програми _____

на тему: Культивування *Sinorhizobium meliloti* для одержання

Ризофіксу

Виконав: здобувач III курсу, групи 1ск Хорольський Сергій Андрійович
(прізвище та ініціали)

Керівник Буценко Людмила Миколаївна _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Корж Ю.В. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

_____ Пирог Т.П.

«28» жовтня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНИЙ ПРОЕКТ (РОБОТУ) ЗДОБУВАЧА

Хорольського Сергія Андрійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема проекту (роботи) Культивування *Sinorhizobium meliloti* для
одержання Ризофіксу

керівник проекту (роботи) Буценко Л.М., к.б.н., доцент

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від «27» жовтня 2020 року № 875

2. Строк подання здобувачем проекту (роботи) 31 січня 2021 року

3. Вихідні дані до проекту (роботи) біологічний агент *Sinorhizobium meliloti*
цільовий продукт: Ризофікс

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які
потрібно розробити) Характеристика цільового продукту; Характеристика
біологічного агента; Техніко-економічне обґрунтування; Обґрунтування
вибору технологічної схеми; Специфікація обладнання; Опис
технологічної схеми; Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень)
Технологічна схема виробництва Ризофіксу – 1 аркуш формату А1 та 1 аркуш
А3. Апаратурна схема виробництва Ризофіксу – 1 аркуш формату А1

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений проектуванню ділянки виробничого біосинтезу для одержання Ризофіксу з використанням продуцента *Sinorhizobium meliloti*.

У проекті наведено обґрунтування умов культивування та вибір допоміжних робіт для культивування продуцента Ризофіксу; характеристика поживних середовищ для вирощування обраного біологічного агента, викладено технологічний процес отримання лізину, який включає блок допоміжних робіт, стадії підготовки посівного матеріалу та вирощування *Sinorhizobium meliloti* у виробничому ферментері.

Наведено склад поживного середовища для отримання ризофіксу культивуванням *Sinorhizobium meliloti*. З урахуванням складу поживного середовища запропоновано схему його підготовки та підібрано режими стерилізації. Розраховано необхідну кількість стадій підготовки посівного матеріалу. Наведено опис основних стадій технологічного процесу із зазначенням параметрів, точок контролю та матеріальних потоків. Складено карту постадійного контролю процесу на наведено методики визначення концентрації біомаси та цільового продукту.

Проект складається зі вступу, семи розділів, графічної частини (технологічної схеми) та списку використаної літератури з 43 найменувань. Загальний обсяг проекту – 90 сторінок, 9 рисунків, 8 таблиць, 2 креслення формату А1.

Ключові слова: Бульбочкові бактерії, азотфіксація, *Sinorhizobium meliloti*, *S. meliloti* AC08, ризобін, ризофікс, біомаса, культивування, біосинтез.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	6
РОЗДІЛ 2. Характеристика біологічного агента.....	9
2.1. Вибір біологічного агенту та поживного середовища для його культивування.....	9
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	15
2.3. Таксономічний статус біологічного агенту.....	20
2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	20
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	22
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	22
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	22
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	24
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	25
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	28
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу...28	
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря	
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	45
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	50
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	70
7.1. Карта постадійного контролю.....	70
7.2. Мікробіологічний контроль	76
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	78
7.3.1. Концентрація біомаси.....	78
7.3.2. Концентрація цільового продукту.....	79
7.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	81
ЛІТЕРАТУРА.....	83
ДОДАТОК	89

ВСТУП

Однією із актуальних проблем сучасності є інтенсифікація процесу симбіотичної азотфіксації. Один із перспективних шляхів її вирішення є збільшення частки симбіотичного азоту в ґрунтах при забезпеченні високоефективного симбіозу бобових культур із відповідними видами бульбочкових бактерій. Останні у симбіозі з бобовими рослинами здатні фіксувати молекулярний азот повітря, забезпечувати потребу в ньому макросимбіонтів і накопичувати його в орному шарі ґрунту в кількості від 40 до 500 кг/га за рік залежно від вирощуваної бобової культури [1].

Тому, актуальним завданням сьогодення в області симбіотичної азотфіксації є створення препаратів біологічної стимуляції росту, розвитку бобових рослин і посилення їх продуктивності за рахунок використання симбіотрофного азоту. Основою цих препаратів є високоактивні штами бульбочкових бактерій [1-3]. Обробка насіння бобових рослин штамами бульбочкових бактерій (ризобіями) сприяє підвищенню продуктивності рослинно-мікробної системи як в типових, так і в несприятливих умовах вирощування, наприклад на деградованих ґрунтах (підданих засоленню, заболочуванню, посушливості тощо). Саме тому отримання біотехнологічних продуктів від штамів продуцентів, здатних формувати високопродуктивні і стресостійкі симбіотичні системи з бобовими рослинами, вкрай затребуване в сільському господарстві [2].

Бульбочкові бактерії *Rhizobium* spp. та *Bradyrhizobium* spp. є грамнегативними ґрунтовими бактеріями, що вступають в азотфіксуючий симбіоз з бобовими рослинами, і мають велике значення для поліпшення родючості ґрунтів [1].

					НУХТ ЗБТЕК 05.02.09 ДП ПЗ			
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Хорольський С. А.			Вступ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Буценко Л. М.						
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

На утворення бульб і фіксацію азоту на бобових сильно впливають різні умови ґрунту, такі як екстремальні температури, сольовий стрес, високий або низький рН ґрунту, низька або високий вміст води, застосування пестицидів і дефіцит поживних речовин [2].

Біопрепарати, створені на основі високоефективних штамів бульбочкових бактерій для інокуляції бобових культур, сприяють збагаченню ґрунту екологічно чистим азотом, підвищують урожай і поліпшують якісний склад рослинної продукції [1, 5]. Детальне вивчення *S. meliloti* та інших ризобій буде додатково інформувати мікробіологів про те, як ці бактерії колонізують кореневі поверхні свого господаря і які механізми складають складні симбіотичні відносини ризобій-бобові.

Тому розробка методів культивування цих мікроорганізмів стає вкрай актуальною проблемою. Також слід вказати, що важливою задачею виробництва продуктів біотехнологічного виробництва в умовах ринкової конкуренції є отримання готового продукту бажаної якості, гарантовано безпечної для споживачів. Все це неможливо без застосування промислової біотехнології. Промислова біотехнологія є однією з основних розділів біотехнології, інтегральною областю науки і техніки, яка спирається на теоретичні та методичні положення молекулярної біології і генетики, мікробіології, біохімії, фізіології і цитології, а також використовує прогресивні хімічні технології [4].

Саме тому метою нашої роботи стало вивчення умов культивування *Sinorhizobium meliloti* (*Rhizobium meliloti*) для одержання Ризофіксу (Ризобіну).

Новизною даної роботи є використання штаму *Sinorhizobium meliloti* AC08, що дає можливість отримувати більший рівень фіксації азоту протягом фаз стеблуння та повного цвітіння порівняно з бактеріями виробничого штаму 425a за рахунок інтенсивнішого утворення бульбочок у ці періоди [4-6].

Об'єкт дослідження – процес культивування *Sinorhizobium meliloti* (*Rhizobium meliloti*) для одержання Ризофіксу (Ризобіну).

- розглянути таксономічний статус *Sinorhizobium meliloti* (*Rhizobium meliloti*);

- вивчити особливості культивування нового штаму *Sinorhizobium meliloti* AC08 та його відмінності в підвищенні врожайності в порівнянні з стандартним виробничим штамом *S. meliloti* 425a;
- розробити технологічну схему виробництва інокулянту з новим штамом *Sinorhizobium meliloti imb* AC08 для добрива під люцерну;
- описати технологічну схему одержання Ризофіксу (Різобіну).

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Деякі бобові культури задовольняють більшу частину потреби в азоті за допомогою азотфіксації. Спроби вносити азотні добрива під бобові культури зазвичай є контрпродуктивними, так як рослини припиняють азотфіксацію при високому вмісті ґрунтового азоту. Тому існує метод обробки насіння спеціальними препаратами, що називають інокулянтами.

За останні 10 років інокулянти бобових культур були значно поліпшені за допомогою методів молекулярної біології та біотехнології. Одним з таких інокулянтів є Ризофікс.

РИЗОБІН (Ризофікс та ін. аналоги, в подальшому Ризобін або препарат) - високоефективний препарат на основі комплементарних симбіотичних азотофіксуючих бактерій родів *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* та *Bradyrhizobium*, нешкідливих для людини і тварин.

Ефективність препарату визначається здатністю бактерій, на основі яких він виготовлений, фіксувати азот атмосфери, покращувати мінеральне живлення рослин, забезпечувати їх біологічно активними речовинами (вітамінами, фітогормонами, амінокислотами та ін.), Підвищувати врожай і якість рослинної продукції. В залежності від бактеріальної культури що використовується, зареєстрованої торгової марки та компанії виробника назва препарату може суттєво мінятись (Ризофікс, Ризобін, Ризоактив, АгріБактер, Ризостим, АТУВА, РІЗОЛАЙН, ХіСтік та ін.) але в значній частині назв даних препаратів збереглося кореневе посилення на Ризобій як основного компонента даного добрива. Українські виробники та постачальники препарату та його аналогів: Агрітема, БіоNorma, Біоінвест Агро, БТУ-Центр, Інституті фізіології рослин і генетики НАН України та ін.. Закордонні виробники препарату: СИНГЕНТА, Lage y Cia.S.A., BASF та ін.

					НУХТ ЗБТЕК 05.02.09 ДП ПЗ			
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Хорольський С. А.						
Перевір.		Буценко Л. М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.			Кафедра БТМ			
8								

Препарат призначений для передпосівної обробки насіння бобових культур (сої, гороху, люцерни, люпину, козлятника, лядвенця, буркуну, вики, кормових бобів, конюшини). Випускають Ризобін в рідкому вигляді, у формі гелю і на торфі або інших носіях, розфасованим в пляшки або поліетиленові пакети. Термін зберігання - 12 місяців при температурі 5-15 °С в місцях захищених від прямого світла. Зберігати від дітей і сільськогосподарських тварин, не дивлячись на те, що інокулянт повністю нетоксичний для людей та худоби. В залежності від продуцента та подальшого призначення для рослини господаря препарат може містити різний титр бактерій від 2×10^9 /г (2 млрд. КУО/г) до 4×10^9 КУО / г живих клітин

Препарат відповідає санітарно-гігієнічним нормам, не викликає забруднення навколишнього середовища.

Передпосівний обробіток насіння бобових культур Ризобіном, в основному, здійснюють за день або в день посіву, проте є препарати, що зберігають свою ефективність протягом половини року після обробки. Насіння обприскують, перемішують (вручну або в машинах для протруювання, очищених від отрутохімікатів) і злегка підсушують на повітрі, уникаючи попадання прямих сонячних променів. Порція препарату на гектар, в середньому, становить 100-200 мл. Для обробки певної партії насіння зазначену дозу препарату розводять водою кімнатної температури до необхідного обсягу.

При дотриманні правил використання бактеріального препарату і технології вирощування бобових Ризобін сприяє підвищенню врожаю зерна на 10-20% при одночасному збільшенні вмісту білка в зерні в порівнянні з насінням, що не оброблялось.

Штам *Sinorhizobium meliloti* використовується також для інокуляції насіння буркуна (лат. *Melilotus*)

Мета застосування: фіксація атмосферного азоту рослинами люцерни

Форма: сухий стерильний препарат високоефективних штамів *Sinorhizobium meliloti* на основі торфу

Титр бактерій: 2×10^9 /г (2 млрд. КУО/г)

Обробка насіння: препарат наноситься на насіння безпосередньо в день висіву

Сумісність: препарат сумісний із оригінальними хімічними протруйниками

Дозування: 4 кг сухого інокулянту РізоФікс®Люцерна та 1 л Біопротектору на 500 кг насіння, або 200 г пакет на 25 кг насіння

Упаковка: ящик 4 кг (20 пакетів по 200 г)

Термін придатності: 24 місяці за температури зберігання від +4 до +10°C

Виробництво: Уругвай

Виробник: Lage y Cia.S.A

РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента *Sinorhizobium meliloti* AC08 та поживного середовища для його культивування

Бактерії роду *Sinorhizobium* відносяться до грамнегативних бактерій, які вільно живуть у ґрунті і вступають в симбіоз з бобовими рослинами. Окремі види сімейства *Rhizobiaceae* характеризуються вибірковістю (специфічністю) по відношенню до рослини-господаря.

Є кілька класифікацій бульбочкових бактерій, засновані на їх здатності заражати бобові рослини, але загальноприйнятою є класифікація Л.М. Доросінського [1]. В основу її покладено перехресна взаємодія і ряд морфолого-культуральних властивостей бульбочкових бактерій [2].

Перші представники роду *Sinorhizobium* були виділені в якості симбіонтів *Medicago* і *Trigonella* spp. [16]. За допомогою нумеричної таксономії було запропоновано виділити отримані ізоляти бактерій в окремий рід – *Sinorhizobium* [15]. На сьогоднішній день рід складається з 4 видів: *S.meliloti*, *S.fredii*, *S.saheli* і *S.terangae*.

Конкурентна здатність бульбочкових бактерій штаму *Sinorhizobium meliloti* imb b-7411 дорівнює 64%, азотфіксуюча здатність дорівнює $12,0 \pm 0,17$ нмоль C_2H_4 / (рослину * год.). Штам проявляє високий рівень продукування на модифікованому середовищі з бобовим відваром, активно фіксує атмосферний азот і має високу конкурентну здатність.

Штам бульбочкових бактерій *Sinorhizobium meliloti* AC08 можна використовувати у мікробіологічному виробництві препаратів як бактеріальну основу добрив під люцерну.

					НУХТ ЗБТЕК 05.02.09 ДП ПЗ		
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Розроб.	Хорольський С. А.				Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Буценко Л. М.						
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.	Пирог Т.П.						

Протягом багатьох років в Україні для виробництва бактеріальних добрив під люцерну використовується штам *S. meliloti* 425a, отриманий методом аналітичної селекції (А.с. СРСР № 549454, С05F 11/08, 25.05.77). Впродовж останніх років методом гібридизації та при застосуванні транспозонового мутагенезу отримані конкурентоспроможні ефективні у симбіозі з різними сортами люцерни штами *S. meliloti*: М4 (пат. України № 13298, 28.02.97, бюл. № 1) і М12 (пат. України № 50851, 15.11. 2002, бюл. № 11) та Т17 (пат. України на корисну модель № 55432, 10.12.2010, бюл. № 23). Зокрема, інокуляція насіння штамом М12 *S. meliloti* забезпечувала надбавку урожаю зеленої маси люцерни від 24 до 36 ц/га (8,1-14,5 %), а насіння від 0,20 до 0,21 ц/га (15,4-22,7 %) порівняно із застосуванням виробничого штаму 425a залежно від ґрунтово-кліматичних умов вирощування згаданої культури. Використання штаму Т17 у формі рідкого бактеріального препарату для інокуляції посівного матеріалу збільшує азотфіксувальну активність люцерни в 1,3-5,3 разів і забезпечує підвищення урожайності надземної маси на 9,6-15,5 % (16,9-48,2 ц/га) порівняно із застосуванням штамів 425a (аналітична селекція) і М12 (отриманий методом гібридизації) у залежності від сорту люцерни і ґрунтово-кліматичних умов її вирощування. Культура бульбочкових бактерій *S. meliloti* АС08 виділена із корневих бульбочок люцерни природних ценозів Полісся України (Житомирська область, Коростенський район, червень, 2008 р., Інститут фізіології рослин і генетики НАН України). Штам ідентифіковано за визначником Бергі і депоновано в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під реєстраційним номером ІМВВ-7411. Культурально-морфологічні особливості штаму: мікроаерофіл, температурний діапазон росту: 20-28 °С. Оптимальна температура росту -27 °С. Діапазон рН 6,2-7,2. Оптимальна рН 7,0. [25]

Переваги *S. meliloti* АС08 над виробничим штамом 425a:

- Відмінною ознакою симбіозу люцерни та ризобій АС08 є більший рівень фіксації азоту протягом фаз стеблуння та повного цвітіння порівняно з бактеріями виробничого штаму 425a за рахунок інтенсивнішого утворення бульбочок у ці періоди.

- Штам AC08 характеризується високою конкурентоздатністю (83 %), яка забезпечує йому пріоритет у процесі утворення бульбочок при вирощуванні люцерни за присутності сторонньої ризобіальної мікрофлори.
- Штам достатньо технологічний, інтенсивно розмножується на сипучому субстраті-носії вермикуліті.
- Використання штаму AC08 для бактеризації насіння районованих сортів люцерни збільшує урожай зеленої маси на 16–20 % порівняно з варіантом без інокуляції та на 11–16 % порівняно з виробничим штамом 425б.
- Штам є стійким до підвищеного вмісту мінерального азоту в ґрунті[24]

Проведення біосинтезу відноситься до найбільш важливої та відповідальної ділянки виробництва біотехнологічної продукції. Спосіб проведення біосинтезу необхідно проводити так, щоб максимально зменшити затрати та отримати максимальну кількість цільової продукції, враховуючи усі особливості біологічного агенту, його потреби для надсинтезу цільової продукції.

Проведення біосинтезу можна реалізовувати різними шляхами, як технічними так і технологічними. Особливості обраних способів впливатимуть на хід усього процесу. Технологічна схема, яка обирається повинна забезпечувати оптимізацію усіх виробничих заходів з точним дотриманням оптимальних умов на кожній стадії, необхідних для синтезу кінцевої продукції.

Згідно з викладеній нижче інформації стосовно продуцента *S. meliloti* AC08 оптимальним значенням температури є 25-28°C протягом 22 годин, рН середовища 6,8-7,2, отже процес біосинтезу потрібно проводити в стерильних умовах.

Бактерії *S. meliloti* AC08 є анаеробами, отож промислове культивування цих мікроорганізмів проводять за умов аерації середовища та глибинного культивування з метою більш ефективного накопичення біомаси.

Згідно даних наведених вище рН середовища культивування складає 6,9, а температура культивування 28°C, які можуть сприяти розвитку сторонньої контамінуючої мікрофлори, тому всі процеси біосинтезу потрібно проводити в

стерильних умовах, а середовище для культивування підлягає обов'язковій стерилізації.

Так як накопичення значних концентрацій цільового продукту негативно впливає на процес ферментації, тому культивування *S. meliloti* AC08 для отримання пектинази доцільно проводити періодичним методом.

Склад поживних середовищ і умови культивування найважливіші критерії як для виробництва продуктів різного мікробного походження, будь то дріжджі, бактерії, так і для виробництва плодових тіл сапрофітних грибів. Живильне середовище, яке використовується, повинне бути повноцінним за своїм складом бюджетне. Отже, живильне середовище повинне містити в своєму складі необхідні джерела живлення: вуглець, азот, фосфор, вітаміни, неорганічні сполуки, що містять в своєму складі калій, натрій, кальцій, магній, залізо, сірку, фосфор, марганець, цинк, кобальт, молібден, мідь, бор і ін. Присутність вітамінів в живильному середовищі позитивно впливає на ростові якості культури, тобто вітаміни є стимуляторами росту культури. Ще однією важливою вимогою до поживного середовища є його стерильність [2]. Стерильним воно повинне бути для того, щоб сторонні мікроорганізми не перешкождали росту досліджуваного мікроорганізму та отриманню цільового продукту, оскільки контамінація сторонніми мікроорганізмами суттєво змінює властивості середовища (склад, рН тощо).

Культура *S. meliloti* AC08 росте на м'ясопептонному агарі, на м'ясопептонному бульйоні при цьому ріст характеризується помутнінням середовища, колір якого не змінюється. Культура також добре культивується на середовищах наступного складу:

- манітно-дріжджовий агар: (МДА) (г/л: K_2HPO_4 -0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; $NaCl$ -0,1; маніт - 10,0; дріжджовий екстракт - 1,0; агар - 15,0-20,0; дист. вода, рН - 7,0);

- синтетичне мінеральне середовище 79: (г/л: K_2HPO_4 -0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; $NaCl$ -0,1; $CaCO_3$ - сліди; казамінокислоти (або гідролізат лактоальбуміну) - 0,1 % (1 г), маніт - 10,0; агар - 17,0; дист. вода) - колонії білі, випуклі, блискучі;

- бобовий агар: (1 л бобового відвару (г/л: горох - 100 г гороху на 1 л водопровідної води), сахароза - 20 г; агар - 15-18 г; NaCl-1 г). У 1 л води кип'ятити 100 г гороху 30 хв., настояти 20 хв.

Згідно літературних даних [25], для промислового культивування продуценту найбільш оптимальним є середовище наступного складу (г/л) :

- кукурудзяний екстракт - 6,0;
- глюкоза-10,0,
- NaCl - 0,2;
- K_2HPO_4 - 0,5;
- $(NH_4)_2SO_4$ -0,5;
- $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,2;
- дріжджовий екстракт- 3,0;
- вода питна - решта; рН середовища - 6,85.

Спираючись на склад поживного середовища, наведений у попередньому підрозділі, готувати поживне середовище потрібно, розділивши його на декілька композицій.

Композиція А складається кукурудзяного екстракту, дріжджового екстракту та глюкози які стерилізують при температурі 112–115 °С і під тиском 0,05 МПа впродовж 20–30 хв, щоб уникнути руйнуванню поживних речовин, що входять до складу цих компонентів.

Композиція Б складається з мінеральних складових поживного середовища, які не являються термолабільними, тому їх стерилізують за наступних умов 131 °С (0,15 МПа) впродовж 40–60 хв.

Таблиця. 2.1.

Склад поживного середовища

Композиція	Компонент поживного середовища	Режим стерилізації
Композиція А	кукурудзяний екстракт - 6,0 г/л,	112–115 °С і під тиском 0,05 МПа впродовж 20–30 хв
	глюкоза-10,0 г/л	
	дріжджовий екстракт- 3,0 г / л	
Композиція Б	NaCl - 0,2 г/л	131 °С (0,15 МПа) впродовж 40–60 хв
	K_2HPO_4 - 0,5 г/л	
	$(NH_4)_2SO_4$ -0,5 г/л	
	$MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,2 г/л	

Стерилізацію доцільно проводити періодичним способом в реакторі, так як об'єм поживного середовища складає менше ніж 10м³.

Висновок. Обраний для виробництва Ризобіну штам *S. meliloti* AC08 характеризується високою конкурентоздатністю (83 %), яка забезпечує йому пріоритет у процесі утворення бульбочок при вирощуванні люцерни за присутності сторонньої ризобіальної мікрофлори. Для культивування *S. meliloti* AC08 обрано періодичне глибинне культивування за таких умов:

- температура культивування 25-28°C
- оберти мішалки 300-400 об./хв
- аерація - 1,0 V/хв
- час культивування - 22-25 год.

Розраховано, що для виробничого культивування продуцента у ферментері об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 процес одержання посівного матеріалу буде проходити у 6 етапів.

Для вирощування *S. meliloti* AC08 обрано поживне середовище складу (г/л): кукурудзяний екстракт - 6,0; глюкоза-10,0, NaCl - 0,2; K₂HPO₄ - 0,5; (NH₄)₂SO₄-0,5; MgSO₄ x 7H₂O - 0,2; дріжджовий екстракт- 3,0; вода питна.

Для приготування його необхідно розділити на дві композиції (залежно від режиму стерилізації та можливого взаємного впливу певних компонентів):

Композиція А складається кукурудзяного екстракту, дріжджового екстракту та глюкози які стерилізують при температурі 112–115 °С і під тиском 0,05 МПа впродовж 20–30 хв, щоб уникнути руйнуванню поживних речовин, що входять до складу цих компонентів.

Композиція Б складається з мінеральних складових поживного середовища, які не являються термолабільними, тому їх стерилізують за наступних умов 131 °С (0,15 МПа) впродовж 40–60 хв.

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Sinorhizobium meliloti є грамнегативною бактерією. Як і інші ризобії, *S. meliloti* можна знайти як нормальні мікроорганізми, що вільно живуть в ґрунті [17]. *S. meliloti* перетворює атмосферний азот в форму, яка може

використовуватися господарем, в якому вони проживають. Крім того, *S. meliloti* важливий тим, що залишає в ґрунті надлишок азоту, що потенційно може знизити потребу в добривах [19].

Величина клітин двох-трьох добової культури на бобовому агарі становить 0,5-0,7 x 1, 2-2,0 мкм. Клітини мають вигляд паличок (перетрихи). У молодому віці рухливі, при старінні втрачають рухливість, утворюють бактероїди. Бактероїди мають вільчатую форму, нерідко утворюючи зірчасті скупчення. Бактерії грамнегативні. Штрих на бобовому агарі рясний, слизований, блискучий, колонії – круглі, однотипні, білуваті, блискучі з чіткими краями до 5 мм в діаметрі.

Геном *S. meliloti* був виділений і секвенований з клубеньків та ґрунту в основному з рослин-господарів, таких як види *Medicago* (люцерна, багаторічні та однорічні бобові), *Melilotus* (солодка конюшина) і *Trigonella* (пажитник) [6]. *S. meliloti* – це швидко зростаючий ризобій з помірно невеликим розміром геному в 6,7 млн. пар основ. Геном досить складний і складається з трьох кільцевих елементів ДНК, також відомих як реплікони [9]. Один з них являє собою одну хромосому довжиною 3,65 Мб, а два інших – мегаплазміди довжиною 1,68 Мб і 1,35 Мб на ділянку [11]. Кожен реплікон сприяє симбіозу бактерій з рослиною-господарем. Найбільший реплікон відповідає за все гени клітин *S. meliloti*, зокрема за гени, відповідальні за метаболічні шляхи. Крім того, він несе гени, що беруть участь у взаємодії рослин, реагуючи на зовнішні стреси, рухливість і хемотаксис. Другий реплікон, названий рSymB, несе гени, що беруть участь в поглинанні поживних речовин і ефективної інвазії рослини-господаря. Третій і найменший реплікон, названий рSymA, відповідає за азотфіксуючу здатність бактерії [20]. Всі три хромосомних компонента були секвеновані дослідниками з усього світу.

Штам є аеробом, температурний інтервал росту 20-28 °С, температурний оптимум 27 °С при рН = 6,2-7,2. Оптимум рН = 7,0. [25]. У бобово-ризобіальному симбіозі бульбочкові бактерії вступають в тісні сигнальні взаємодії з макро-симбіонтом, забезпечуючи їх азотним харчуванням. Обидва компоненти симбіотичної системи, хоча і дистанційно, постачають

один одного матеріалами і енергією в формах, необхідних для кожного з них, і в цілому складають єдину систему вуглецевого і азотного живлення рослин [6, 14]. Бактерії отримують від бобових утворені ними в процесі фотосинтезу вуглеводи та інші сполуки і в свою чергу забезпечують рослину азотом, в основному у вигляді амонію [3, 5, 13], фіксованому ними з повітря. Азот, що фіксується в бульбах, надходить в тканини рослини-господаря і залишається в складі його біомаси [17].

Хоча частина азоту, утвореного в результаті фіксації, і використовується мікросімбіонтом для зростання і підтримки його клітин, більша частина азоту експортується в клітини господаря [3, 5, 11] і може, таким чином, бути використана для підтримки його ростових процесів. Такий симбіоз починається при інфікуванні коренів бобової рослини мікоризою (*Rhizobium*) з утворенням корневих бульбочок, де і відбувається азотфіксація. Процесу азотфіксації потрібен нітрогеназний фермент як каталізатор для реакції розщеплення молекули азоту і перетворення її в амоній [2, 14]. Інокуляція *Rhizobium* та ризобактеріями, можливо, викликає зміни власних гормональних систем рослин-господаря, а самі бактерії виступають як сигнальні молекули змін рівня фітогормонів чи біопрепаратів.

Важливу роль у фіксації атмосферного азоту грають поверхневі полісахариди бактерій, яких відомо чотири типи. Одним з них є ліпополісахариди [19]. Ліпополісахариди формують зовнішній шар зовнішньої мембрани і надходять в бактеріальне мікросередовище в складі ліпополісахарид-білкових і полісахарид-ліпідних комплексів. Внаслідок досить великої клітинної оболонки, ризобії містять більшу кількість ЛПС, в порівнянні з іншими грамнегативними бактеріями [7, 13].

Ліпополісахариди широко вивчені в галузі мікробіології, біохімії, імунології та генетики, так як вони відіграють значну роль як фактор вірулентності грам негативних бактерій і є потужними активаторами вродженого імунної відповіді [Man-Kupisinskaa et al., 2016]. Молекула ЛПС є гліколіпідом і складається з трьох доменів: ліпиду А, центрального

олігосахариду (кора) і O-специфічного полісахаридного ланцюга (O-ПС). Детальніше дивись рисунок нижче (див. рис. 2.1):

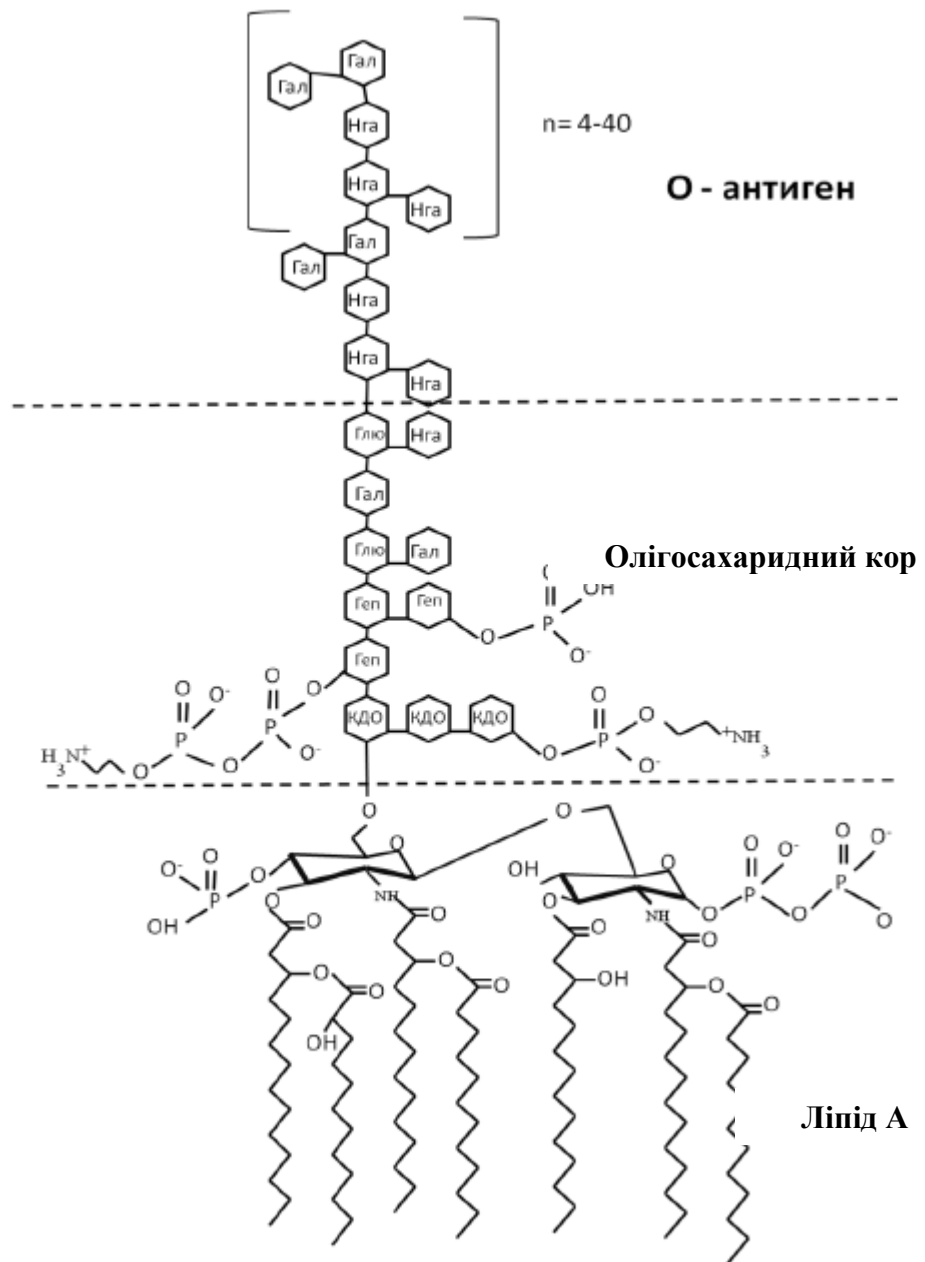


Рис. 2.1. Хімічна структура ліпополісахариду *Sinorhizobium meliloti*

Всі три домену різні як за походженням, так і за антигенними і біохімічними властивостями. Ліпід А є найбільш консервативною ділянкою молекули ЛПС і проявляє властивості ендотоксину. O-полісахаридний ланцюг має властивості O-антигену і визначає бактеріальну сероспецифічність (серовар) [5]

Хімічний склад ліпополісахариду *S.meliloti* був проаналізований багато разів, але їх структура досі відома лише частково. У складі спостерігається високий вміст кислих цукрів – галактуранової кислоти, глюкуронової кислоти.

Аналіз ЛПС з *S. meliloti* показав вміст ДНА (3-дезоксид-2-гептулосарової кислоти), яка вважається одним з компонентів О-полісахаридного ланцюга і може бути також в складі зовнішнього ядра [9].

Ліпід А *S. meliloti* складається з глюкозаміну з двома фосфатними і чотирма ацильними групами (див. рис. 2). Але є межа, яка відрізняє їх ліпід А від ліпідів інших ентеробактерій: наявність довгого жирного ланцюга – 27-оксіоктакозаної кислоти [17, 23], а також відсутність фосфатної групи, частина молекули бета-оксидобутирату (3-ОНС₄:0), і жирних ацильних залишків, приєднаних до проксимального залишку GlcN [19]

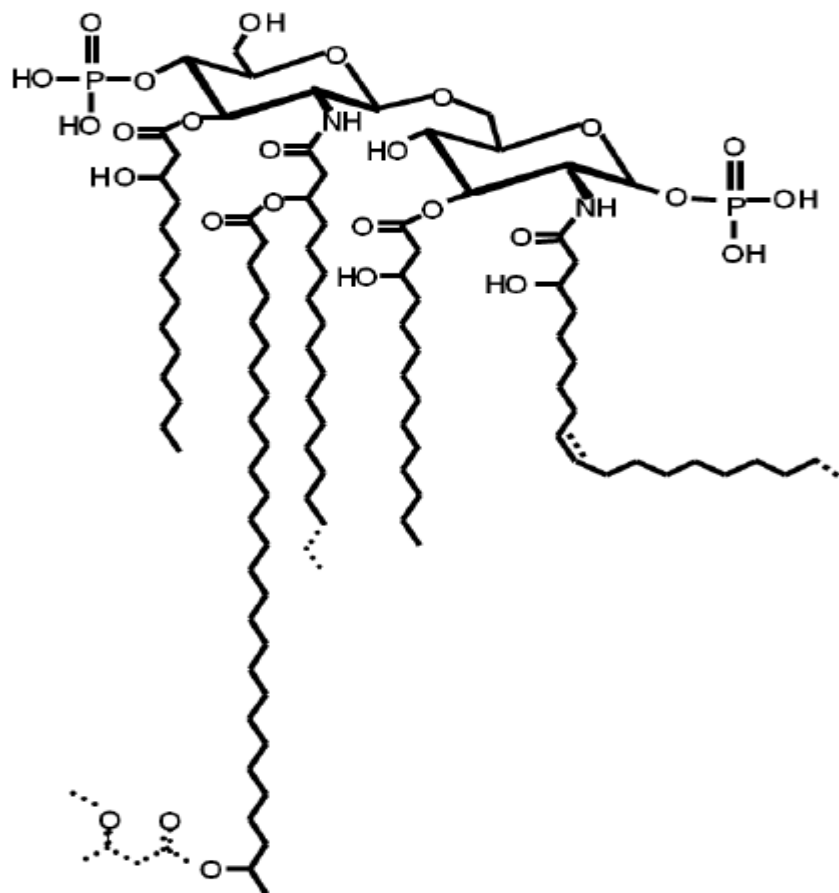


Рис 2.2 Загальна структура ліпиду А *Sinorhizobium meliloti*.

За даними рентгеноструктурного аналізу, жирні кислоти ліпиду А орієнтовані в одному напрямку і знаходяться в щільній гексагональній упаковці. Висока впорядкованість робить структуру ліпиду А стабільною в конфірмаційному відношенні, що є важливою умовою прояви його властивостей і участі у інокуляції бактерії *S. meliloti* на рослинах.

2.3. Таксономічний статус

Таксономічний статус *Sinorhizobium meliloti* наступний:

Домен *Cellular organisms*

Царство *Bacteria*

Підцарство *Proteobacteria*

Клас *Alphaproteobacteria*

Порядок *Rhizobiales*

Родина *Rhizobiaceae*

Рід *Sinorhizobium*

Вид *Sinorhizobium meliloti*

Штам AC08

Sinorhizobium/Ensifer group – містить 65 описаних штамів

2.4. Схема біотрансформації ростового субстрату

Біологічна фіксація азоту здійснюється за допомогою двох різних генетичних систем: одна з них використовується симбіотичними азотфіксаторами, інша вільноживучими. Простежується така закономірність: чим тісніше азотфіксуючі мікроорганізми пов'язані зі своїм макросімбіонтом, тим вище їх азотфіксуюча здатність. У цьому, безсумнівно, важливу роль відіграє генетична регуляція цього процесу.

У зв'язку з деякими особливостями, конкретні механізми регуляції *nif*-генів у бульбочкових бактерій принципово відрізняються від таких у вільноживучих азотфіксаторів. Перша особливість полягає в тому, що більшість швидкозростаючих ризобій (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*) не фіксує азот поза рослин. У лабораторних умовах активацію *nif*-промоторів вдалося спостерігати лише у деяких генетично модифікованих штамів [9]. Друга полягає в тому, що нітрогеназа бульбочкових бактерій функціонує в умовах надлишку азотних сполук.

Концентрація амонію в корневих бульбочках багаторазово перевершує той поріг, вище якого синтез нітрогенази пригнічується у вільноживучих азотфіксаторів. Тому у ризобій немає гена *nifL*, відповідального за репресію її

генів зв'язаним азотом. Регуляцію азотфіксуючої активності бульбашок в залежності від азотного статусу ґрунту здійснює рослина хазяїн з використанням системних механізмів. Третя особливість полягає в тому, що питома (на бактеріальну клітину) активність *nif*-генів у *Sinorhizobium* набагато вище, ніж у вільноживучих азотфіксаторів. У бактероїдах (глибоко спеціалізованих для азотфіксації клітинах) зміст нітрогенази досягає 30% від загального білка [20]. Завдяки цьому мікросімбіонти забезпечують азотом рослину, маса якого на кілька порядків перевищує їх масу [12].

Так як нітрогеназа необоротно відзначається зниженням O_2 , діазотрофи розвинули різні стратегії регулювання процесу азотфіксації. Контроль над цим процесом здійснюється на двох рівнях: трансляційному (за допомогою білків NifA, RpoN / RpoD і ін.) і пострансляційному (завдяки білкам-переносників електронів-FdxD, FeSII, білків-регуляторів активності NifA - GlnB / GlnK, а також білків, які беруть участь в рибозиліруванні нітрогенази DraT / DraG

У вільноживучих азотфіксаторів основною системою, яка контролює роботу усього нітрогеназного комплексу, є двокомпонентна система *nifA-nifL* (див. рис. 2.3). Білки NifA і NifL функціонують разом у відповідь на зміну окисно-відновлюваного, азотного і вуглецевого статусу і запускають сигнал трансдукційного білка GlnK.

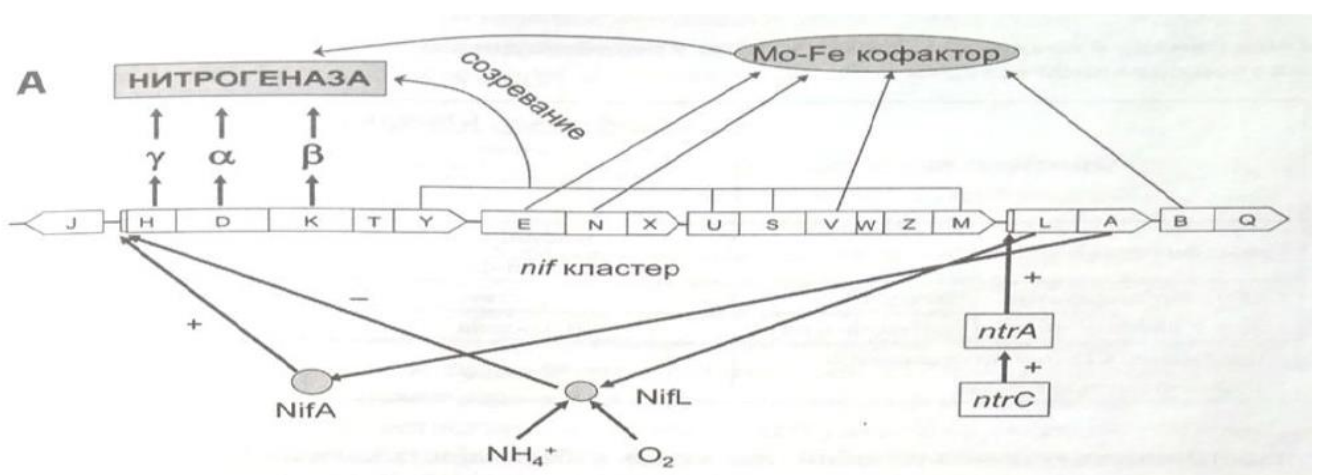


Рис. 2.3. Регуляція експресії *nif*-генів у вільноживучих азотфіксаторів.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

У даному курсовому проекті описано культивування *Sinorhizobium meliloti* (*Rhizobium meliloti*) для одержання Ризофіксу (Ризобіну).

Обґрунтування необхідності застосування азотфіксаторів для поліпшення родючості ґрунтів.

Бульбочкові бактерії *Rhizobium* spp. та *Bradyrhizobium* spp. є грамнегативними ґрунтовими бактеріями, що вступають в азотфіксуючий симбіоз з бобовими рослинами, і мають велике значення для поліпшення родючості ґрунтів [6-9]. На утворення бульб і фіксацію азоту на бобових сильно впливають різні умови ґрунту, такі як екстремальні температури, сольовий стрес, високий або низький рН ґрунту, низька або високий вміст води, застосування пестицидів і дефіцит поживних речовин [4-7].

Актуальним завданням сьогодення у сфері біологічної азотфіксації є розробка препаратів для стимулювання росту, розвитку бобових рослин, посилення їх продуктивності в результаті використання симбіотрофного азоту. Біопрепарати, створені на основі вискоєфективних штамів бульбочкових бактерій для інокуляції бобових культур, сприяють збагаченню ґрунту екологічно чистим азотом, підвищують урожай і поліпшують якісний склад рослинної продукції [7, 8]. Детальне вивчення *S. meliloti* та інших ризобій буде додатково інформувати мікробіологів про те, як ці бактерії колонізують кореневі поверхні свого господаря і які механізми складають складні симбіотичні відносини ризобій-бобові.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

В Україні станом на 2020 рік налічується 1,8 млн га люцерни [10-11]. Але враховуючи, що на ринку добрив для люцерни дуже велика конкуренція серед органічних добрив, слід прийняти площу люцерни 4500 га, яка буде оброблятися лише біодобривом на основі *S. meliloti* [11-12],

					НУХТ ЗБТЕК 05.02.09 ДП ПЗ			
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Хорольський С. А.						
Перевір.		Буценко Л. М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.					Кафедра БТМ	

Тому наступним етапом буде розрахунок кількості препарату, яка необхідна для обробки. Відомо, що на кормові цілі люцерну рекомендовано висівати у нормі 16–18 кг/га [11]. Отже, на 4500 га припадає 72 000 кг насіння.

Встановлено, що на 500 кг насіння необхідно 4 кг сухого інокулянту препарату РізоФікс®Люцерна [12]. Отже, для 72 000 кг необхідно

$$(72\,000 \cdot 4)/500 = 576 \text{ кг препарату}$$

Необхідна кількість сухого інокулянту Ризофікс для обробки 72 000 кг насіння складає:

$$(72\,000 \cdot 4)/500 = 576 \text{ кг препарату}$$

Визначаємо об'єм культуральної рідини, необхідний для отримання 576 кг сухого інокулянту:

$$V_{кр0} = 576000 \text{ г} / 8 \text{ г/л} = 72000 \text{ л}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виробництві (20 %), необхідна кількість культуральної рідини складає :

$$V_{кр} = 72000 \text{ л} / (1-0,2) = 90\,000 \text{ л}$$

Прийmemo кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) 50, тому що даний біопрепарату є сезонним продуктом і немає необхідності випускати його протягом всього календарного рокує. Тоді кількість продукту на добу ($V_{д}$) становитиме:

$$V_{д} = V_{кр}/T_{рд} = 90\,000 / 50 = 1800 \text{ л}$$

Інші 280 днів виробництво буде працювати для синтезу інших сполук.

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{кр} / ((V_{д} \times T_{цф})/24) = 90\,000 / ((1800 \times 78)/24) = 15,3 = 15 \text{ циклів,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 72 год).

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

$$V_{крц} = K1 \times V_{д} \times T_{цф} / 24 = 1,1 \times 1800 \times 78 / 24 \approx 6000 \text{ л}$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій Геометричний об'єм ферментера для отримання 6000 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{крц}}/K_{\text{зап}} = 6000/0,6 = 10\,000 \text{ л} = 10 \text{ м}^3,$$

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

3.3 Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 6000$ л культуральної рідини.

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

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{6000}{1 - 0,1} \approx 6666 \text{ л}$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 6666$ л.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\phi.1} = 6666/0,6 = 11\,110$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 10\,000$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{6666}{10000} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

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

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + X_{\phi}} = \frac{6666}{1 + 0,1} = 6060 \text{ л}$$

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

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 6666 - 6060 = 606 \text{ л}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 1 м³

Для одержання 606 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{606}{1 - 0,1} = 673 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 673/0,6 = 1121$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 1000$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{673}{1000} = 0,67$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{673}{1 + 0,1} = 611 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 673 - 611 = 62 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 100 л

Для одержання 62 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{62}{1 - 0,1} = 68 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 68/0,6 = 113$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 100$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{62}{100} = 0,62$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{68}{1 + 0,1} = 62 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 68 - 62 = 6 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 10 л

Для одержання 6 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = \frac{V_{\text{пм3}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{6}{1 - 0,1} = 6,6 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 6,6/0,6 = 11 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 10 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{6,6}{10} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{6,6}{1 + 0,1} = 6 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 6,6 - 6 = 0,6 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Для одержання 0,6 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,15$. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм4}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{600}{750 \times 0,15} = 5 \text{ шт}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 5 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу препарату Ризофіксу у ферментері об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Для біосинтезу Ризофіксу (Ризобіну) використовують штам *S. meliloti* AC08, грамнегативна аеробна бактерія, оптимальною температурою для культивування якої є 20-28 °С, оптимальне значення рН $7,0 \pm 0,2$ отже можливий ризик контамінації сторонніми мезофільними і нейтрофільними мікроорганізмами, тому необхідно забезпечити асептичні умови під час біосинтезу, чого неможливо досягти при поверхневому культивуванні. Асептичні умови забезпечуються стерилізацією обладнання і комунікацій, поживного середовища та підготовкою аераційного повітря. Для запобігання контамінації в ферментері створюється надлишковий тиск [4, 13].

Технологічно сучасний процес мікробного синтезу ризофіксу складається з ряду послідовних процесів. Головні з них: підготовка необхідної культури *S. meliloti* AC08; підготовка середовища для культивування; вирощування посівного матеріалу; культивування *S. meliloti* AC08 в заданих умовах, в ході якого і здійснюється біосинтез біомаси для отримання ризофіксу [11].

Отже, враховуючи техніко-економічне обґрунтування (див. розділ 1) процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,66 буде проходити у 4 етапи, тому при виборі обладнання слід звернути увагу на виробників, які випускають серію обладнання з можливістю масштабування процесу, а також щоб обладнання мало всі обхідні опції для контролю: температури, рівня рН, концентрація розчиненого кисню у середовищі, швидкість обертання мішалки, тиск, витрати повітря та ін [5, 14].

Тому при виборі безпосередньо ферментера необхідно враховувати щоб були забезпечені наступні параметри:

					НУХТ ЗБТЕК 05.02.09 ДП ПЗ			
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Хорольський С. А.			РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Буценко Л. М.						
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						
					40			

- ефективне перемішування і забезпечення гомогенізації середовища;
- забезпечення вільної і швидкої дифузії газоподібних компонентів системи (аерація в першу чергу);
- теплообмін, що забезпечує підтримання оптимальної температури всередині реактора і його контрольовані зміни;
- стерилізація середовищ, повітря і самого ферментера;
- контроль і регулювання процесу і його окремих етапів [13-15].

Враховуючи, що оптимальна температура культивування *S. meliloti* AC08 становить 20-28 °C тому необхідно, щоб ферментер був оснащений нагрівальним елементом. Це може бути розміщений у апараті змішувик або сорочка. Але при виборі апарата необхідно врахувати, що частину поживного середовища ми будемо стерилізувати безпосередньо у ферментері, тому для швидкого його охолодження після стерилізації зручніше використовувати сорочку, у яку подаватиметься охолоджена або гаряча вода. У зв'язку з цим ми будемо обирати ферментер з сорочкою для підтримання температури культивування та охолодження поживного середовища [16].

Для біосинтезу Ризофіксу потрібна постійна подача повітря для культивування *S. meliloti* AC08, в цьому випадку слід використовувати ферментери барботажного типу. Для забезпечення біосинтезу необхідна така ступінь аерації: 1 об'єм повітря на 1 об'єм середовища за хв., а сам апарат необхідно обладнати датчиком тиску (манометром) для постійного контролю тиску в апараті [16].

Рівномірне розподілення кисню та належний тепло та масообмін по всьому об'єму апарата може забезпечити перемішувачий пристрій. Це може бути мішалка з частотою обертання до 300 об/хв. Для вибору типу мішалки потрібно, зважаючи на частоту обертання, використати мішалку турбінного типу [63]. Також для уникнення застійних зон у ферментері необхідно в апараті встановити відбійники.

На сучасному ринку біотехнологічного обладнання багато виробників, які відповідатимуть переліченим вище вимогам, тому при виборі обладнання головним фактором буде ціна даного обладнання. Серед проаналізованих

варіантів біотехнологічного обладнання слід звернути увагу на фірму ІК «Биотехно», яка є одним із лідерів ринку на території колишнього СНД (Рис. 4.1) [17-18].



Рис. 4.1. Ферментер ІК "Биотехно"[17].

Ферментери фірми ІК «Биотехно» оснащені всіма необхідними для проведення біотехнологічного процесу, функціями та форматними частинами, а саме: PLC-контролером з сенсорним дисплеєм, що дозволяє одночасно керувати двома і більше апаратами, сорочка з ізоляцією для термостатування і подачі пари; частини ферментера контактують з продуктом виготовлені з нержавіючої сталі 304; частини ферментера що не контактують з продуктом виготовлені з нержавіючої сталі 304; Система перемішування ферментера: вал з мішалкою, подвійне механічне ущільнення з паровим затвором, 4 відбійника, 10% від внутрішнього діаметра посудини ферментера, система контролю технологічних параметрів. Також ферментер обладнаний барботером та автоматичним датчиком для виміру рН культуральної рідини [17].

Програмне забезпечення включає в себе платформу, яка гарантує кращу продуктивність, надійність, тривалий термін служби. У промислових установках використовується модульна система комплектації, що дозволяє легко адаптувати систему під новий продукт.

Запропонований апарат має високі технологічні характеристики, можна легко варіювати режими перемішування та масообміну, забезпечується рівномірний розподіл мікроорганізмів та компонентів поживного середовища.

Конструкція повністю герметична та потрапляння атмосферного повітря в апарат не можлива, що є дуже важливим для забезпечення асептичних умов культивування [16-18].

4.2 Обґрунтування вибору стадій підготовки повітря

Культивування продуцента відбувається в аеробних умовах, тому підготовка стерильного аераційного повітря при культивуванні *S. meliloti* AC08 є однією з важливих задач на біотехнологічному підприємстві [19].

Для одержання чистого повітря в боксах та лабораторіях використовуємо ультрафіолетові лампи (опромінення ультрафіолетовими променями), а для знезараження повітря при вирощуванні посівного матеріалу та виробничому біосинтезі – очищене на фільтрах повітря. Так як об'єм апарату має невеликі об'єми то підготовка аераційного повітря здійснюватиметься в окремому приміщенні. Підготовка аераційного повітря складається з таких стадій:

- забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у найвищій точці (Н ~ 30 м) будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря;
- далі необхідно попередня грубе очищення повітря
- очищення повітря від пилу ($5 > 50$ мкм) на плоских тканинних фільтрах грубого очищення, де досягається ступінь його очищення 80 %. Фільтри грубої очистки складаються з каркасу з нержавіючої сталі, в який встановлюється фільтруючий матеріал. Обираємо комірковий фільтр ФяП, Продуктивність по повітрю кожного фільтра не більше 1540 м³/год.;
- стиснення повітря в компресорах або турбоповітрядувках (при цьому повітря нагрівається до температури 120–200 °С) тут проходить стерилізація повітря;
- охолодження стисеного повітря до температури «точки роси», за якої волога повітря конденсується (використовують водяні теплообмінники різного типу: кожухотрубні, «труба в трубі»);
- видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері (ємність великого об'єму); крім того ресивер зменшує

пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря;

- стабілізація показників (тиск, температура) підігріванням до температури 45–50 °С паром у відповідних теплообмінниках;

- очищення у головних ємністних набивних фільтрах до ступеня очищення $E=95\%$. Головні фільтри, зазвичай, встановлюють поблизу ферментаційних відділень, для даного виробництва обираємо фільтр ФПП -15 – виготовлений із волокон перхлорвінілу.[19];

- очищення в індивідуальних фільтрах. Повітря від головних фільтрів через трубопроводи (колектори) подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів встановлених на ферментері, наприклад Фільтр тонкої очистки «ЛАЙК» фільтруючим матеріалом якого є ФП (фільтр Петрянова), призначені для тонкої і надтонкого очищення повітря від бактеріальних аерозолів При цьому повітря очищають до ступеня очищення $E 99,9\%$. [18-19].

На кожному рівні очищення слід передбачити штучери з метою відбору проб повітря для визначення концентрації механічних часток до та після фільтрації.

Повітряні фільтри використовуються для підтримки заданої чистоти повітря, відповідно до технологічних вимог. У зв'язку з цим їх поділяють, залежно від ефективності дії – фільтрувальної здатності, на 3 класи:

- грубого очищення (вловлюють частинки розміром більше 10 мкм);
- тонкого очищення (вловлюють частинки розміром більше 1 мкм);
- «абсолютні» фільтри високого очищення (індивідуальні фільтри).

Фільтри тонкого очищення найбільш часто застосовують в якості другого ступеня очищення. Вони застосовуються в системах вентиляції та кондиціонування повітря і відрізняються досить високою ефективністю і продуктивністю.

Фільтр тонкого очищення забезпечує найбільш високоефективну затримку забруднюючих частинок в системах аспірації та вентиляції. Головною особливістю даного виду фільтрів є наявність спеціального фільтрувального

матеріалу. Він складається з тонких синтетичних волокон за допомогою яких і відбувається затримка найдрібніших частинок.

Абсолютні фільтри або фільтри частіше використовують з метою створення антибактеріального повітряного середовища, захисту від різних шкідливих викидів, а також для підтримки чистоти у виробничих приміщеннях.

Відпрацьоване повітря через колектори подається на аналогічні головні фільтри для очищення та знешкодження. У разі невеликих витрат повітря такі фільтри встановлюють безпосередньо на ферментері [19].

4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Для того, щоб обрати мийний та/або дезінфікуючий засіб, необхідно знати загальну площу миття, концентрацію робочого засобу та його витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Окрім цього слід звернути увагу і на саму вартість цих засобів [19-20].

Наступним етапом необхідно розрахувати витрати мийних та/або дезінфікуючих засобів. Приблизно на 1 м² витрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікуючого засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502). Прийmemo, що обладнання та комунікації потрібно мити перед кожним виробничим циклом, тобто 42 разів (див. вище); підлога миється кожного робочого дня, тобто 180 разів (див. вище); а стіни, вікна та двері – раз на місяць (6 раз). Загальна площа оброблюваних об'єктів за весь період виробництва вказана у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва ризобіну

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (л)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) оброблюваного об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)
Обладнання, інвентар, комунікації*	100	42	4200
Підлога**	60	180	10800
Стіни, двері, вікна**	35	6	210

Примітка: * – загальний об'єм обирається як сума всіх об'ємів ємнісного обладнання; ** – розрахунок загальної площі миття проведений на основі даних, наведених у табл. 8.1.

Рекомендується чергувати дезінфекційні та антисептичні засоби кожні 1–3 місяці з метою запобігання розвитку та розповсюдженню стійких варіантів мікроорганізмів.

Миючі та дезінфікуючі засоби слід контролювати на мікробіологічну чистоту. Їх розчини потрібно зберігати у попередньо очищеній тарі та суворо дотримуватись строків зберігання. Дезінфікуючі засоби мають відповідати таким вимогам: володіти бактерицидною дією, бути хімічно стійкими та не ушкоджувати поверхні обладнання. До мийних засобів висуваються інші вимоги, а саме: повинні виявляти високу мийну здатність, забезпечувати повне змочування поверхонь із різних конструкційних матеріалів, пом'якшення жорсткої води, забезпечувати повне видалення механічного, білкового та жирового забруднень шляхом їх диспергування та емульгування, забезпечувати нейтралізувати кислі забруднення та омилення жирів (для лужних мийних засобів) та виявляти низьку агресивність щодо конструкційних матеріалів, які використовують для виготовлення технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю [20].

Миття ємнісного обладнання проводиться методами циркуляції робочого розчину в системі (CIP – мийка), заповнення резервуара (біореактора) робочим розчином засобу складатиме близько половини кожного з відповідним об'ємом обладнання (тобто $60/2 = 30$ л миючих розчинів використовується для миття ємнісного обладнання) [20].

Дезінфекцію зовнішніх поверхонь проводять шляхом нанесенням або розпилення робочого розчину дезінфікуючого засобу на поверхню обладнання. Тривалість контакту дезінфікуючого засобу з поверхнею повинна складати не менше 20 хв. Після закінчення обробки залишки засобу змивають і промивають устаткування водою.

Як мийні засоби використовують лужні (кальцинована сода, каустична сода) та кислотні (азотна, фосфорна, соляна, оцтова, сульфамінова кислоти)

мийні засоби, а також мийні засоби на основі синтетичних поверхнево-активних речовин (синтетичні порошки типу А, Б, В) і мийні засоби з протеолітичними ферментами («Біомой») [19-21].

Проаналізувавши вітчизняний ринок миючих та дезінфікуючих засобів слід звернути на ефективні, порівняно дешеві та найбільш вживані, серед таких засобів слід виділити каустичну і кальциновану соду, «Біомой», «Гембар», «Хлорантоїн» та «Дезактін» .

«Біомой» – багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом (ТУ У 22902465.005–96). Рекомендований Міністерством здоров'я України.

Препарат являє собою порошок, світлих тонів (допускається присутність забарвлених включень ензимів). Добре розчиняється у воді (розчинність не менше 30 г/дм³); робочі розчини Біомою безбарвні, не ушкоджують оброблювані вироби і володіють вираженими емульгуючими і миючими властивостями, легко видаляють білково-жирову плівку, добре змиваються, не залишаючи нальоту на оброблюваних поверхнях. Не сумісний з катіонами поверхнево-активних речовин.

Для приготування робочого розчину Біомою використовується концентрація 0,15–0,5%. Робочий розчин Біомою готують у тарі будь-якого матеріалу шляхом розчинення у питній[20].

Каустична сода (їдкий натр, NaOH) являє собою безбарвну кристалічну речовину. Гігроскопічна. Добре розчиняється у воді. Водні розчини мають лужну реакцію. Гарячі % розчини каустичної соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. При зменшенні температури розчину мийні властивості засобу падають. Розчини каустичної соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію.

Засіб належить до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). При попаданні на шкіру викликає хімічний опік. Подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів [21].

Кальцинована сода являє собою зневоднений вуглекислий натрій (Na₂CO₃). Має вигляд білого дрібнокристалічного порошку, який добре розчиняється

у воді. У водних розчинах кальцинована сода частково розкладається з утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату, які зумовлюють мийні властивості. Гарячі (55 ± 5 °С) розчини кальцинованої соди добре обмилюють жирові забруднення на поверхнях та руйнують білки. При зменшенні температури розчинів до 45 ± 5 °С їх мийна здатність різко падає.

Через помірну небезпеку (3 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007) простоту приготування і невисоку ціну, ми обираємо кальциновану соду у якості миючого засобу для ферментаційного обладнання [19].

Для проведення дезінфекційних заходів використовують дезінфекційні засоби, що містять в якості активно діючої речовини (АДР) окислювачі (перекис водню), глутаровий альдегід (корзолін іД), глутаровий альдегід у суміші з четвертинними амонійними сполуками (деконекс 50 ФФ), похідні гуанідину (гембар), та мийно–дезінфекційні засоби, які містять в якості АДР хлорпохідні гідантоїну (дезактін, хлорантоїн) [20].

Гембар - дезінфекційний засіб виробництва фірми НВЦ "Біоцид" (Україна). В якості АДР містить полігексаметиленгуанідин фосфат. Являє собою безбарвну або жовтувату прозору рідину. Не має запаху. Добре розчиняється у воді. Не ушкоджує об'єкти, виготовлені з металу, скла, полімерних матеріалів та гуми. Після висихання розчину на оброблених поверхнях утворюється плівка.

Засіб належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007), не подразнює шкіру, не виявляє шкіряно-резорбтивних, сенсibiliзуючих, кумулятивних, мутагенних та канцерогенних властивостей. Подразнює слизову оболонку очей [21].

«**Дезактін**» – дезінфекційний засіб, що використовується для очищення і дезінфекції та одночасного миття твердих поверхонь приміщень, предметів та обладнання і комунікацій.

«Дезактін» являє собою порошок від білого до жовтуватого кольору з помірним запахом хлору. Розчинність у воді становить не менше 20 мг/дм³. Водні розчини прозорі, безбарвні, мають слабкий запах хлору. Робочі розчини засобу не пошкоджують об'єкти, які виготовлені із металу, скла, гуми,

полімерних матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни і устаткування з лакофарбовим, гальванічним та полімерним покриттям, не фіксують білкові забруднення на поверхні обладнання, добре змиваються, не залишають нальоту [22].

«Хлорантоін» - хлорактивний, багатокomпонентний, поліфункціональний дезінфекційний засіб з миючим ефектом стабільний при зберіганні протягом 3-х років (ТУ У 22902465.004-95). Препарат являє собою: сипучий порошок, світлих тонів зі слабким запахом хлору. Розчинність у воді - не менше 20 г/дм³. Водні розчини Хлорантоїну прозорі, безбарвні, мають слабкий запах хлору. Допускається помірна опалесценція водних розчинів Хлорантоїну.

Спектр антимікробної дії: Хлорантоін має бактерицидні, туберкульозні, віруліцидні (включаючи збудника поліомієліту, всіх типів грипу, парагрипу, коронарної респіраторно-синцитіальних, ротавірусної, аденовірусної інфекцій, гепатитів, ВІЛ, вірусних гастроентеритів і інших), спороцидні та фунгіцидні (включаючи збудників кандидозів, дерматомікозів, цвілевих грибів) властивості.

За дезінфікуючою активністю Хлорантоін перевищує в 5-10 разів звичайні дезінфікуючі засоби та виключає застосування лужних миючих засобів. Використання Хлорантоїну дозволяє поєднати в одній операції стадії миття, дезінфекції та предстерілізації, скоротити тривалість санітарної обробки [22].

Узагальнена характеристика витрат мийних та/або дезінфікуючих засобів для виробництва ризобіну

Назва мийного/ дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва м ² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л (кг) мийного або дезінфікуючого засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн	Джерело (1, 2, 3,4,5)*
Біомой	Обладнання, інвентар, комунікації	0,3	11100	5550	34	566	1
Кальцинована сода		2,0	11100	5550	9	999	2
Каустична сода		2,0	11100	5550	14	1990	3
«Дезактін»	Стіни, вікна, двері, підлога, тара, інвентар, обладнання, комунікації	0,2	9100	1800	135	245	1
«Гембар»		0,5	1835	910	150	550	4
Хлорантоїн		0,2	9100	910	110	198	5

Примітка: * – ціни наведено станом на жовтень 2020: 1. <http://www.farmakos.ua/ua/price>; 2. http://kiev.prom.ua/Soda-kaltsinirovannaya.html?no_redirect=1; 3- <http://prom.ua/Soda-kausticheskaya.html> ; 4. <http://biocide.kiev.ua/?Produkty:Gembar> ; 5. http://dezmed.com.ua/ua/store/produkcija/disinfektants/chlorine-containing_agents/Cloratoin

Варто відмітити, що усім засобам притаманні як високі миючі, так і дезінфікуючі властивості. Також слід зазначити, що Хлорантоїн та Біомой належать до 4 класу небезпеки, а це дозволяє їх використовувати у присутності персоналу, який не причетний до прибирання. А от каустична сода належить до речовин 2 класу небезпеки.

Перевагами усіх вище зазначених дезінфікуючих засобів є стабільність при зберіганні, зручне приготування робочих розчинів, повний спектр знезаражуючої дії, екологічна безпека та легкість змивання з поверхонь. Але при виборі дезінфікувальних засобів увагу слід звертати також і на їх вартість.

Отже, проаналізувавши дані, наведені у табл. 4.2, можна зробити такі висновки:

– для миття обладнання, інвентарю, комунікацій, тари доцільно використовувати кальциновану соду;

– для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей – «Хлорантоїн», оскільки він є мийно-дезінфікувальним засобом, що дає змогу заощадити кошти, але слід змінювати засоби раз на 3 місяці на Біомой і Дезактін, щоб запобігти виникнення резистентності мікроорганізмів [19-21].

4.4. Особливості приготування поживного середовища для культивування

У біотехнологічному виробництві всі операції з приготування поживного середовища відбуваються в спеціалізованому цеху, який обладнаний ємностями для зберігання рідких і твердих речовин, засобами їх транспортування, апаратами з перемішувачами для приготування розчинів або суспензій. При цьому хімічні солі, які є компонентами поживних сумішей, зберігаються зазвичай у твердому стані [17].

При запуску біореактора приготування їх розчинів із заданим співвідношенням компонентів проводиться за наступною схемою. Кожний компонент поживного середовища в необхідній кількості згідно з рецептурою зважують на технічних терезах і окремо розчиняють у воді в спеціальних

ємностях, постійно перемішуючи за допомогою мішалок. Приготовані розчини мінеральних солей по черзі вносять у реактор і ретельно перемішують [18].

Головними факторами, які впливають на стабільність поживного середовища, є природа його компонентів, здатність їх взаємодіяти один з одним, температура, рН, освітленість, забезпечення киснем.

Культура *S. meliloti* AC08 росте на м'ясопептонному агарі, на м'ясопептонному бульйоні при цьому ріст характеризується помутнінням середовища, колір якого не змінюється. Культура також добре культивується на середовищах наступного складу:

- манітно-дріжджовий агар: (МДА) (г/л: K_2HPO_4 -0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; $NaCl$ -0,1; маніт - 10,0; дріжджовий екстракт - 1,0; агар - 15,0-20,0; дист. вода, рН - 7,0);

- синтетичне мінеральне середовище 79: (г/л: K_2HPO_4 -0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; $NaCl$ -0,1; $CaCO_3$ - сліди; казамінокислоти (або гідролізат лактоальбуміну) - 0,1 % (1 г), маніт - 10,0; агар - 17,0; дист. вода) - колонії білі, випуклі, блискучі;

- бобовий агар: (1 л бобового відвару (г/л: горох - 100 г гороху на 1 л водопровідної води), сахароза - 20 г; агар - 15-18 г; $NaCl$ -1 г). У 1 л води кип'ятити 100 г гороху 30 хв., настояти 20 хв.

Згідно літературних даних [25], для промислового культивування продуценту найбільш оптимальним є середовище наступного складу (г/л) :

- кукурудзяний екстракт - 6,0;
- глюкоза-10,0,
- $NaCl$ - 0,2;
- K_2HPO_4 - 0,5;
- $(NH_4)_2SO_4$ -0,5;
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2;
- дріжджовий екстракт- 3,0;
- вода питна - решта; рН середовища - 6,85.

Спираючись на склад поживного середовища, готувати поживне середовище потрібно, розділивши його на декілька композицій.

Композиція А складається кукурудзяного екстракту, дріжджового екстракту та глюкози які стерилізують при температурі 112–115 °С і під тиском 0,05 МПа впродовж 20–30 хв, щоб уникнути руйнуванню поживних речовин, що входять до складу цих компонентів.

Композиція Б складається з мінеральних складових поживного середовища, які не являються термолабільними, тому їх стерилізують за наступних умов 131 °С (0,15 МПа) впродовж 40–60 хв.

Таблиця 4.3

Режим стерилізації Компонент поживного середовища

Композиція	Компонент поживного середовища	Режим стерилізації
Композиція А	кукурудзяний екстракт - 6,0 г/л,	112–115 °С і під тиском 0,05 МПа впродовж 20–30 хв
	глюкоза-10,0 г/л	
	дріжджовий екстракт- 3,0 г / л	
Композиція Б	NaCl - 0,2 г/л	131 °С (0,15 МПа) впродовж 40–60 хв
	K ₂ HPO ₄ - 0,5 г/л	
	(NH ₄) ₂ SO ₄ -0,5 г/л	
	MgSO ₄ x 7H ₂ O - 0,2 г/л	

Стерилізацію доцільно проводити періодичним способом в реакторі, так як об'єм поживного середовища складає менше ніж 10м³.

2.5. Підготовка та стерилізація піногасника

Враховуючи склад поживного середовища під час культивування може бути процес піноутворення. Це є вкрай небажаним процесом, так як надмірне утворення піни в ферментері обмежує корисну ємність апарату, часто є причиною контамінації середовища, а також призводить до втрат культуральної рідини, що йде із піною з апарату [69].

Для створення стійких режимів піноутворення застосовують механічні й хімічні піногасники, а також їх комбінації. В даному випадку можна використати хімічний піногасник, а саме речовини синтетичної природи: силікони, пропіноли, поліформаль і тд. Тому при виборі ферментера необхідно обладнати його піногасником, враховуючи фізико-біохімічні особливості продуцента в якості піногасника потрібно взяти синтетичний піногасник, так як використання природного піногасника може призвести до асиміляції останнього мікроорганізмом [60].

Звернувши увагу на сучасний український ринок піногасників, можна обрати піногасник Xiameter AFE-1510 Antifoam Emulsion, через те, що він має ряд переваг: чудова антипінна дія, високоефективний контроль за піноутворенням при мінімальній концентрації піногасника (наприклад 0,05%) [64], ефективний в гарячих та холодних системах, простий у використанні а також ефективний у низьких концентраціях. Склад: 10% силіконова емульсія (симетикон).

Піногасник буде вноситися автоматично (доза одного внесення – 0,04% від робочого об'єму ферментера або інокулятора) при спрацьовуванні датчика рівня піни. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

Для приготування такої кількості піногасника для культивування на всіх етапах культивування необхідно 6 л. піногасника.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу Ризофіксу

Позиція	Найменування	Кількість	Виробник, марка	Технічна характеристика
1	2	3	4	5
ПЗ 1	Повітрозабірник	1	Власне виробництво	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Вентиляторний завод «Укрвентсистеми»	Фільтруючий матеріал – волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, Е=90%.
К 3	Компресор	1	Компресор гвинтовий ESM 5–500 ООО «Компресорс Інтернешнл»	Потужність 55 кВт Продуктивність 0,67 м3/хв Робочий тиск 0,1 МПа.
Т 4	Теплообмінник-охолоджувач	1	AFR 11 «Урапкомпрессормаш»,	продуктивність 66 м3/год
Р 5	Ресивер	1	Р 900.800.01, Ярославський завод «Красный маяк»	об'єм 900 л, робочий тиск 10 атм.
Т 6	Теплообмінник-нагрівач	1	Корпус Теплообмінника ВОП_N фірми Аігопе	Виготовлений із оцинкованої сталі товщиною 1,0 - 1,5 мм
Ф 7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр (P)-GS VE Donaldson Filtration solutions	Ефективність очищення 95% швидкість фільтрування 25 м/с.

					НУХТ ЗБТЕК 05.02.09 ДП ПЗ					
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ					
Розроб.	Хорольський С. А.							Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Буценко Л. М.									
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.	Пирог Т.П.									

Продовження таблиці 5.1

1	2	3	4	5
Д-8; Д-11; Д-23; Д-26; Д-31; Д-34;	Дозатор	6	НВП «Техноваги»	Об'ємно-ваговий дозатор
3б-9	Реактор- змішувач для приготуван ня та стерилізації розчину хлорантоін	1	Promvit, РК ChP	Реактор-змішувач оснащений перемішуючим пристроєм.
3б-12	Реактор- змішувач для приготуван ня та стерилізації розчину соди	1	Promvit, РК ChP	Реактор-змішувач оснащений перемішуючим пристроєм.
3б-13	Реактор- змішувач для приготуван ня та стерилізації піногасника	1	Promvit, РК ChP	Реактор-змішувач оснащений перемішуючим пристроєм.
3б-14	Реактор- змішувач для приготуван ня та стерилізації NaOH	1	Promvit, РК ChP	Реактор-змішувач оснащений перемішуючим пристроєм.
3б-15	Реактор- змішувач для приготуван ня HCl	1	Promvit, РК ChP	Реактор-змішувач оснащений перемішуючим пристроєм.

Закінчення таблиці 5.1

1	2	3	4	5
Н-10; Н-13; Н-25; Н-28; Н-33 Н-36	Насос	6	Герметичні насоси серії FMB.	Відцентрові герметичні насоси з магнітним приводом. Продуктивність - від 15 до 70 л/хв. Напор - макс. до 8 м.
3б-14 3б -19 3б -24 3б -32	Реактор–змішувач для приготування та стерилізації Композиції А	4	ТОВ"МНВК "Станко Груп" - Stanco Group, Литва	Реактор-змішувач оснащений перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм від 10 л до 5000 л.
3б -15 3б -20 3б - 27 3б -35	Реактор–змішувач для приготування та стерилізації Композиції Б	4	ТОВ"МНВК "Станко Груп" - Stanco Group, Литва	Реактор-змішувач оснащений перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм від 10 л до 5000 л.
Ін-17; Ін-21 Ін-29	Інокулятор	3	Ферментер ІК "Биотехно"	Загальний об'єм інокулятора від 10 л до 1000 л.
3бч-16	Засівний бачок	1		Засівний бачок для посівного матеріалу об'ємом 3л.
Ф-18 Ф-22 Ф-30 Ф-38	Фільтри індивідуальної очистки	4	Фільтри марки Vonoco A7014 (Швейцарія)	Фільтруючий матеріал - фторопласт, E = 99,999 %
Фр-37	Ферментер	1	Ферментер ІК "Биотехно"	Матеріал неражавіюча сталь 12Х18Н10Т, швидкість перемішування До 220 об/хв

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема виробництва бактеріального препарату Ризобіну складається з допоміжних робіт (підготовка персоналу та комунікацій, приготування поживного середовища) та технологічного процесу (підготовка посівного матеріалу, біосинтез цільового продукту).

Технологічну схему біосинтезу бактеріального препарату Ризобіну наведено в графічній частині цього проекту. Креслення (дод. 2) зроблене на двох аркушах формату А1 та А2, де зображені допоміжні роботи та технологічний процес.

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка персоналу

При влаштуванні на роботу та щорічно персонал, який безпосередньо зайнятий у виробництві біотехнологічних препаратів, повинен пройти медичний огляд, пройти систематичне навчання щодо санітарно-гігієнічних вимог, а також дотримуватися правил особистої гігієни.

Кожен працівник виробничого цеху повинен бути забезпечений 4 комплектами санітарного одягу, заміна одягу проводиться щоденно і у міру забруднення. Працівники перед початком роботи повинні одягти чистий санітарний одяг, підібрати волосся під хустинку або ковпак, зняти з себе прикраси, змити лак з нігтів, ретельно вимити руки теплою водою з милом і продезінфікувати їх.

Кожен працівник на підприємстві несе відповідальність за виконання правил особистої гігієни, за стан робочого місця, за виконання технологічних і санітарних вимог на своїй ділянці.

					НУХТ ЗБТЕК 05.02.09 ДП ПЗ		
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Хорольський С. А.				РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ		
Перевір.	Буценко Л. М.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Пирог Т.П.						
					Літ.	Арк.	Аркушів
					Кафедра БТМ		

ДР. 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів.

ДР 1.2.1 Приготування розчину Хлорантіону

Препарат Хлорантіон використовують для дезінфекції та ополіскування. Для приготування розчину Хлорантіону необхідно через об'ємно-ваговий дозатор (Д-8) у збірник (Зб-9) завантажити 12 кг концентрованого препарату та 6 м³ води, перемішують у збірнику (Зб-9). Зберігати готовий розчин слід не більше 7 діб.

ДР. 1.2.2. Приготування розчину Біомой.

Рекомендується використовувати 0,5 % розчини кальцинованої соди температурою 45±5 °С для ручного миття технологічного обладнання та інвентарю, а також 2 % розчини температурою 55 ±5 °С та для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій.

Готують у полімерних або нержавіючих ємкостях (неприпустимо застосування ємкостей з алюмінію, тому що кальцинована сода викликає його корозію) . Готується в розрахунку 20 г діючої речовини (ГОСТ 2263–79) на 1 л води безпосередньо у СІР-мийці.

ДР 1.3. Підготовка приміщень.

ДР 1.3.1. Генеральне прибирання.

При генеральному прибиранні виробничого приміщення застосовується розчин Хлорантоїну 0,5 %. Прибирання здійснюється один раз на місяць. Розчином обробляють поверхні лабораторних приміщень: стіни, підлогу, вікна та двері. Стіни, двері і інші поверхні протирають паролоновою губкою, яка змочена дезінфікуючим розчином, потім цим же розчином миють підлогу.

Після закінчення прибирання необхідно провести мікробіологічний контроль.

ДР 1.3.2. Щоденне прибирання приміщень.

Здійснюється 1 раз на зміну, і включає в себе миття підлоги. Прибирання проводять у гумовому взутті, гумових рукавичках і фартуху.

При проведенні вологого прибирання приміщень використовують розчин Хлорантіону (від ДР 1.3.1.). Відпрацьований розчин направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікацій.

ДР 1.4.1. Миття.

Миття обладнання здійснюється водопровідною водою із застосуванням кальцинованої соди від ДР 1.2.2. Миття відбувається при температурі 50-60 °С упродовж 20–30 хв. Відпрацьований розчин подається на знешкодження відходів.

ДР 1.4.2. Технічний огляд.

Проводять для виявлення нещільностей в комунікаціях та запірній арматурі на обладнання. У разі їх знаходження проводять підтягнення різьбових з'єднань.

ДР 1.4.3. Ополіскування.

Зовнішні частини обладнання обробляють дезінфікуючим розчином Хлорантоїном 0,3 % (від ДР 1.2.1) Після миття ферментер ополіскують водопровідною водою при температурі 30-40 °С упродовж 10 хв. Відпрацьований розчин зливається і направляється на стадію знешкодження відходів.

ДР 1.4.4. Перевірка на герметичність.

Перевірка на герметичність ферментера проводиться за допомогою стисненого повітря. Перед набором тиску в апарат вносять (поміщають) невелику кількість легкої галогенвмісної речовини, зазвичай чотирихлористий карбон (ССЦ), закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80°С. збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через нещільності і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість перевірки одного апарату цим методом становить 1,5-2 год.

ДР 1.4.5. Стерилізація.

Після перевірки обладнання та комунікацій на герметичність у рубашку подають глуху пару, а у ферментер подають гостру пару за температури і стерилізують упродовж години.

При досягненні в апараті температури стерилізації $T_{ст} = 130-135 \text{ }^{\circ}\text{C}$ закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують не менше 1,5–2 год. при тиску 0,3 МПа

По закінченні стерилізації зупиняють подачу гострої пари $P=0,28 \text{ МПа}$, ставлять всі вузли під паровий захист та знижують тиск. При зниженні тиску проводять охолодження до температури 40°C .

ДР 2. Підготовка стерильного технологічного повітря

Повітря, яке використовується для аерації у процесі культивування посівного матеріалу в інокуляторі та в процесі біосинтезу в ферментері, повинно бути стерильним та мати температуру $30-35^{\circ}\text{C}$.

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря відбувається через повітрозбірник (ПЗ–1), який розташовується у зоні чистого повітря, віддаленої від зон технологічних шкідливих викидів або викидів систем витяжної вентиляції. Вхід повітря розміщується на висоті не менше 30 м від землі і закривається залізними ґратами. Повітря через повітрозабірну шахту під дією вентилятора потрапляє до фільтру грубого очищення [5].

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток

Попередню очистку повітря здійснюють у чарунковому фільтрі. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення (Ф–2), пил та механічні частки з повітря осідають, а очищене повітря надходить у компресор (К–3). Ступінь очищення становить $E = 80 \%$.

ДР 2.3. Стиснення (копреміювання) повітря

При стисканні повітря у компресорі (К-3) його температура підвищується з 15–25 °С на вході в повітродувку до 120-200 °С на виході з неї. Перед подачею в головний фільтр повітря охолоджують.

Після компресора повітря має наступні характеристики: $P = 0,35-0,5$ МПа, $w = 60 \%$.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Після стисканні у компресорі (К-3) повітря надходить до теплообмінника (Т-4) для охолодження до температури 60 °С. Після охолодження повітря подають у ресивер (Рс-5) для відділення вологи та стабілізації термодинамічних показників. Щоб запобігти випаданню вологи в ресивері–вологовідділювачі, повітря «переохолоджують» до температури 25–30 °С при тиску 0,2 МПа у теплообмінному апараті (Т-4). У ресивері–вологовідділювачі (Р-5) . Відбувається видалення вологи, яке становить близько 70 %.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Для забезпечення надійної роботи фільтрів, повітря нагрівають до температури 50 °С. З цією метою повітря після ресивера (Р-5) підігрівають у теплообміннику (Т-6), при цьому допускається часткове підмішування гарячого повітря після компресора. Кількість підмішуваного гарячого повітря визначається умовами відносної вологості, яка не повинна перевищувати 50%.

ДР 2.6. Очищення в головному фільтрі

Після охолодження очищення подається до головного фільтру (Ф-7) для забезпечення ефективності очищення 95%. Головний фільтр представляє собою циліндричну ємність з сферичним дном та кришкою. В середині фільтру знаходяться дві решітки, між якими розміщують фільтруючий матеріал. Заміна фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. У разі забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну.

ДР 2.7. Очищення в індивідуальному фільтрі

Заключна стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальних фільтрах (Ф-18, Ф-22, Ф-30, Ф-38), які розташовані безпосередньо біля ферментера.

Як фільтруючий матеріал використовують фторопластові втулки, товщиною 4 мм. Фільтр являє собою металевий циліндр з кришкою та конічним дном $E=99,9\%$. Заміну фільтра проводять раз в місяць

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

Розрахунок компонентів для приготування 600 мл середовища представлено в таблиці 6.1

Таблиця 6.1.

Розрахунок компонентів для приготування 600 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 600 мл поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
кукурудзяний екстракт	6	3,6	А	350
глюкоза	10	6		
дріжджовий екстракт	3	1,8		
Вода		до 350 мл		
NaCl	0,2	0,12	Б	250
K ₂ HPO ₄	0,5	0,3		
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	0,3		
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2	0,12		
Вода		до 250 мл		

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 3,6 г кукурудзяного екстракту, 6 г глюкози та 1,8г дріжджового екстракту.

Наважки поміщають в колбу об'ємом 1000 мл та додають 300 мл води питної, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища. Доводять об'єм приготованого розчину до 350 мл водою питною та контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 6,7-6,9. У разі невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1 М розчину соляної кислоти або 0,1 М розчином NaOH. Готову композицію закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температур 112°C упродовж 30 хвилин. Готова композиція направляється до ТП 6.4.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На аналітичних вагах зважують 0,12 г натрію хлориду, 0,3 г дикалію гідрофосфату, 0,3 г амонію сірчанокислого двозаміщеного та 0,12 г магнію срчанокислого. Наважки поміщають в колбу об'ємом 500 мл та додають 200 мл води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 250 мл водою питною. Готовий розчин закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температур 131°C упродовж 40 хвилин.

По закінченню стерилізації проводять контроль середовища на стерильність. Посіви інкубують у термостаті при $(38\pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 24 годин.

У контрольних посівах повинен бути відсутній ріст мікроорганізмів.

Готова композиція направляється до ТП 6.4.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для I етапу біосинтезу Ризобіну.

Для першого етапу біосинтезу в посівному апараті, було розраховано необхідну кількість компонентів щоб приготувати 6 л поживного середовища (10% від об'єму середовища для другого етапу біосинтезу). Основним джерелом поживних речовин в середовищі являється кукурудзяний екстракт.

Враховуючи, що для засіву посівного апарату використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого складає 600 мл, загальна кількість води яку необхідно додати для приготування середовища становить 5,4 л.

Вміст компонентів для приготування 6 л поживного середовища наведено в таблиці 6.2.

Таблиця 6.2.

Розрахунок компонентів для приготування 6 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6,0 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
кукурудзяний екстракт	6	36	А	3,40
глюкоза	10	60		
дріжджовий екстракт	3	18		
Вода		до 3,40 л		
NaCl	0,2	1,2	Б	2,00
K ₂ HPO ₄	0,5	3,0		
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	3,0		
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2	1,2		
Вода		до 2,0 л		

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 36 г кукурудзяного екстракту, 60 г глюкози та 18г дріжджового екстракту.

Наважки поміщають в збірник (Зб-14) об'ємом 5 л та додають 3л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища протягом 20 хв. Доводять об'єм приготованого розчину до 3,4л водою питною та контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 6,7-6,9. У разі невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1 М розчину соляної кислоти або 0,1 М розчином NaOH.

Стерилізують композицію А з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у збірник. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С, тиску 0,15МПа упродовж 30 хв. Після

стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку реактора при перемішуванні та самоплином подають до ТП 6.5.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На вагах зважують 1,2 г натрію хлориду, 3 г дикалію гідрофосфату, 3 г амонію сірчанокислого двозаміщеного та 1,2 г магнію срчанокислого. Наважки поміщають в збірник (Зб-15) об'ємом 5 л та додають 1,8 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 2,0 л водою питною та стерилізують з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у збірник. Стерилізацію проводять при температурі 131°C, тиску 0,2 МПа упродовж 40 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку реактора при перемішуванні та самоплином подають до ТП 6.5.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для II етапу біосинтезу Ризобіну.

Для другого етапу біосинтезу в інокуляторі, було розраховано необхідну кількість компонентів щоб приготувати 60 л поживного середовища. Основним джерелом поживних речовин в середовищі являється кукурудзяний екстракт.

Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал, отриманий на I етапі біосинтезу, об'єм якого складає бл, загальна кількість води яку необхідно додати для приготування середовища становить 54 л.

Вміст компонентів для приготування 60 л поживного середовища наведено в таблиці 6.3.

Таблиця 6.3.

Розрахунок компонентів для приготування 60 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 60,0 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
кукурудзяний екстракт	6	360	А	34,0
глюкоза	10	600		
дріжджовий екстракт	3	180		
Вода		до 34,0 л		
NaCl	0,2	12	Б	20,0
K ₂ HPO ₄	0,5	30		
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	30		
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2	12		
Вода		до 20,0 л		

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 360 г кукурудзяного екстракту, 600 г глюкози та 180 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають в збірник (Зб-19) об'ємом 40л та додають 20 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища. Доводять об'єм приготованої розчину до 34 л водою питною та контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 6,7-6,9. У разі невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1 М розчину соляної кислоти або 0,1 М розчином NaOH.

Стерилізують композицію А з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у збірник. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С, тиску 0,15МПа упродовж 30 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку реактора при перемішуванні та самоплином подають в інокулятор (Ін-32) до ТП 6.6.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На вагах зважують 12 г натрію хлориду, 30 г дикалію гідрофосфату, 30 г амонію сірчанокиислового двозаміщеного та 12 г магнію сірчанокиислового. Наважки поміщають в збірник (Зб-20) об'ємом 25 л та додають 10л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 20 л водою питною та стерилізують з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у збірник. Стерилізацію проводять при температурі 131°C, тиску 0,2 МПа упродовж 40 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку реактора при перемішуванні та самоплином подають в інокулятор (Ін-21) до ТП 6.6.

У контрольних посівах повинен бути відсутній ріст мікроорганізмів.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для III етапу біосинтезу Ризобіну.

Для вирощування інокуляту, було розраховано необхідну кількість компонентів щоб приготувати 600,0 л поживного середовища. Основним джерелом поживних речовин в середовищі являється кукурудзяний екстракт.

Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал, отриманий на II етапі біосинтезу, об'єм якого складає 60 л, загальна кількість води яку необхідно додати для приготування середовища становить 540 л.

Вміст компонентів для приготування 600,0 л поживного середовища наведено в таблиці 6.4.

Таблиця 6.4.

Розрахунок компонентів для приготування 600,0 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 600,0 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
кукурудзяний екстракт	6	3600	А	340,0
глюкоза	10	6000		
дріжджовий екстракт	3	1800		
Вода		до 340,0 л		
NaCl	0,2	120	Б	200,0
K ₂ HPO ₄	0,5	300		
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	300		
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2	120		
Вода		до 200,0 л		

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-23) в збірник (Зб-24) об'ємом 400 л вносять 3,6 кг кукурудзяного екстракту, 6,0 кг глюкози та 1,8 кг дріжджового екстракту та додають 200 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища. Доводять об'єм приготованої розчину до 340 л водою питною та контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 6,7-6,9. У разі невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1 М розчину соляної кислоти або 0,1 М розчином NaOH. Стерилізують композицію А з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у збірник. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С, тиску 0,15МПа упродовж 30 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку реактора при перемішуванні та за допомогою насоса (Н-25) подають в інокулятор (Ін-34) до ТП 6.7.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На вагах зважують 120 г натрію хлориду, 300 г дикалію гідрофосфату, 300 г амонію сірчаноокислого двозаміщеного та 120 г магнію сірчаноокислого. Наважки поміщають в збірник (Зб-27) об'ємом 250 л та додають 150 л води

питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 200 л водою питною та стерилізують з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у збірник. Стерилізацію проводять при температурі 131°C, тиску 0,2 МПа упродовж 40 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку реактора при перемішуванні та за допомогою насоса (Н-28) подають в інокулятор (Ін-29) до ТП 6.7.

ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для основного етапу біосинтезу Ризобіну.

Для основного етапу біосинтезу в ферментері було розраховано необхідну кількість компонентів щоб приготувати 6,0 м³ поживного середовища. Основним джерелом поживних речовин в середовищі являється кукурудзяний екстракт. Враховуючи, що для засіву ферментеру використовують рідкий посівний матеріал, отриманий на III етапі біосинтезу, об'єм якого складає 600 л, загальна кількість води яку необхідно додати для приготування середовища становить 5400 л. Вміст компонентів для приготування 6000,0 л поживного середовища наведено в таблиці 6.5.

Таблиця 6.5.

Розрахунок компонентів для приготування 6000,0 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6000,0 л поживного середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
кукурудзяний екстракт	6	36	А	3400,0
глюкоза	10	60		
дріжджовий екстракт	3	180		
Вода		до 3400,0 л		
NaCl	0,2	1,2	Б	2000,0
K ₂ HPO ₄	0,5	3		
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	3		
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2	1,2		
Вода		до 2000,0 л		

ДР 3.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-31) в збірник (ЗБ-32) об'ємом 5 м³ вносять 36 кг кукурудзяного екстракту, 60 кг глюкози та 180 кг дріжджового екстракту та додають 3000 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища. Доводять об'єм приготованої розчину до 3400 л водою питною та контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 6,7-6,9. У разі невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1 М розчину соляної кислоти або 0,1 М розчином NaOH.

Стерилізують композицію А з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у збірник. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С, тиску 0,15МПа упродовж 30 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку реактора при перемішуванні за допомогою насоса (Н-33) подають в ферментер (Фр-36) до ТП 7.1.

ДР 3.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-34) в збірник (ЗБ-35) об'ємом 2,5 м³ вносять 1,2 кг натрію хлориду, 3,0 кг дикалію гідрофосфату, 3,0 кг амонію сірчаноокислого двозаміщеного та 1,2 кг магнію сірчаноокислого та додають 1500 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованої розчину до 2000 л водою питною та стерилізують з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у збірник. Стерилізацію проводять при температурі 131°С, тиску 0,2 МПа упродовж 40 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку реактора при перемішуванні за допомогою насоса (Н-36) подають в ферментер (Фр-37) до ТП 7.1.

ДР 4 Підготовка і стерилізація титрувальних агентів

ДР 4.1 Підготовка титрувального агенту НСІ

Для попередження реакцій залуження, а для підтримання оптимального рН при біосинтезі, у ферментер додають 6% розчин HCl з розрахунком 0,002 л на 1 л середовища. Таким чином, загальна потрібна кількість HCl на всі етапи біосинтезу :

$$6666 * 0,002 = 13,33 \text{ л}$$

Такої кількості розчину сповна вистачить для контролю рН середовища при біосинтезі. Готовий розчин не потребує стерилізації.

В асептичних умовах відміряють 36% розчину HCl, та поміщають у збірник об'ємом 20 л, і додають дистильовануводи, ретельно перемішують.

ДР 4.2 Приготування і стерилізація титрувального агенту NaOH

Для корегування рН необхідно приготувати титрувальний розчин з розрахунку 0,002 л/л культуральної рідини.

Таким чином, загальна потрібна кількість NaOH на всі етапи біосинтезу :

$$6666 * 0,002 = 13,33 \text{ л}$$

На технічних вагах зважують NaOH. Наважку поміщають збірник об'ємом 20 л, і додають водопровідної води, перемішують. Стерилізують розчин з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у збірник. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С, тиску 0,15МПа упродовж 40 хв. Після стерилізації розчин охолоджують подачею холодної води у сорочку реактора при перемішуванні.

ДР 5. Підготовка та стерилізація піногасника

ДР 5.1. Приготування емульсії піногасника

При вирощуванні культури на середовищах, що утворюють піну в процесі ферментації для її гасіння в апарати подається рідкий піногасник.

Для отримання 0,05% –ної емульсії піногасника Xiameter AFE–0310 Antifoam Emulsion, відміряють у мірному циліндрі 0,075 л концентрату піногасника та вносять в колбу об'ємом 3л, потім розбавляють піногасник до 1,49 л питною водою.

ДР 5.2. Стерилізація піногасника

Емульсію піногасника Xiameter AFE-0310 Antifoam Emulsion стерилізують у автоклаві при температурі $123\pm 2^{\circ}\text{C}$ впродовж 30 хв, щоб уникнути внесення з ним контамінації в середовище. Після стерилізації піногасник охолоджують в цьому ж апараті до температури $30\text{--}32^{\circ}\text{C}$ і в асептичних умовах переносять у ємність для піногасника (P-14), розташований над ферментером, потім подають у ферментер за допомогою автоматичної системи піногасіння.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу.

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури.

Колекційну культуру *S. meliloti* AC08 зберігають у пробірках з скошеним м'ясо-пептонним агаром в холодильнику при температурі $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$. Пересіви здійснюють кожні 2-3 місяці. Всі роботи з культурою проводять в строго асептичних умовах.

ТП 6.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах.

Колекційну культуру *S. meliloti* AC08, що зберігається у пробірках з скошеним м'ясо-пептонним агаром, розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром і вирощують в термостаті при 25°C протягом 24 годин.

ТП 6.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах.

Отримані ізолювані колонії *S. meliloti* AC08 за допомогою петлі (від ТП 6.2.) висівають на пробірки з скошеним м'ясо-пептонним агаром (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки) і вирощують в термостаті при 25°C протягом 24 годин.

ТП 6.4. Вирощування інокуляту в колбах з рідким поживним середовищем на качалках.

Для вирощування інокуляту отримані стерильні композиції для приготування поживного середовища (від ДР 3.1) в стерильних умовах

об'єднують, перемішують та розливають по 120 мл в 5 стерильні качалочних колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *S. meliloti* AC08, вирощену на скошеному м'ясо-пептонному бульйоні, вносять 5 мл фізіологічного розчину та суспендують клітини в розчині, піпеткою відбирають одержану клітинну суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують клітинну суспензію отриману з однієї пробірки.

Посівний матеріал вирощують протягом 96 годин при температурі 27°C та швидкості перемішування 200 об/хв. Кожні 8 години відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

ТП6.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10л.

Для першого етапу вирощування посівного матеріалу у попередньо простерилізований інокулятор (Ін-17) об'ємом 10 л зі стерильним поживним середовищем (від ДР 3.2). В інокулятор у полум'ї факела через засівний бачок (Збч- 16) вносять посівний матеріал, вирощений в колбах на качалках (від ТП 6.4).

Вмикають мішалку, подають в інокулятор аераційне повітря через індивідуальний фільтр (Ф-17) (від ДР 2.7), культивування здійснюють при температурі 27 °С, швидкість перемішування 250 об/хв., тривалість культивування 72 год, при зміні рН спрацьовує датчик і відбувається подача титрувальних агентів від ДР 4.

Температуру підтримують поданням у сорочку пари та холодної води. Кожні 8 години відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

ТП6.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л.

Для другого етапу вирощування інокуляту у попередньо простерилізований інокулятор (Ін-21) об'ємом 100 л зі стерильним поживним

середовищем (від ДР 3.3) подають посівний матеріал (від ТП 6.5) по трубі перетискування за допомогою стерильного стисненого повітря..

Вмикають мішалку, подають в інокулятор аераційне повітря через індивідуальний фільтр (Ф-22) (від ДР 2.7), культивування здійснюють при температурі 27 °С, швидкість перемішування 200 об/хв., тривалість культивування 72 год, при зміні рН спрацьовує датчик і відбувається подача титрувальних агентів від ДР 4.

Температуру підтримують поданням у сорочку пари та холодної води. Кожні 8 години відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

ТП6.7. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1м³.

Для третього етапу вирощування інокуляту у попередньо простерилізований інокулятор (Ін-29) об'ємом 1м³ зі стерильним поживним середовищем (від ДР 3.4) подають інокулят (від ТП 6.6) по трубі перетискування за допомогою стерильного стисненого повітря..

Вмикають мішалку, подають в інокулятор аераційне повітря (від ДР 2.7) через індивідуальний фільтр (Ф-30), культивування здійснюють при температурі 27 °С, швидкість перемішування 170 об/хв., тривалість культивування 72 год, при зміні рН спрацьовує датчик і відбувається подача титрувальних агентів від ДР 4.

ТП 7. Біосинтез

ТП 7.1.Виробниче культивування

При основному культивуванні у ферментер (Фр-37) об'ємом 10 м³ зі стерильним поживним середовищем (від ДР 3.5) подають інокулят (від ТП 6.7) по трубі перетискування за допомогою стерильного стисненого повітря.

Вмикають мішалку, у ферментер подають аераційне повітря через індивідуальний фільтр (Ф-38) (від ДР 2.7) зі швидкістю аерації 1л/хв, культивування здійснюють при температурі 27 °С, швидкість перемішування

підтримують на рівні 110 об/хв. Температуру підтримують поданням у сорочку пари та холодної води, при зміні рН спрацьовує датчик і відбувається подача титрувальних агентів від ДР 4.

Культивування здійснюють протягом 72 год.

Кожні 4 години відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

ЗВ 6. Знешкодження відходів

ЗВ 6.1 Знешкодження рідких відходів

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

ЗВ 6.2 Знешкодження газоподібних відходів

Очищення газоподібних відходів (від ТП 6.5, ТП 7.1) здійснюють за допомогою фільтрів з попереднім охолодженням та зниженням вологості відпрацьованого повітря.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Упродовж усіх стадій отримання посівного матеріалу та під час основного етапу біосинтезу проводять контроль за технологічними показниками процесу та періодично (кожні 8 годин) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси та також вмісту глюкози.

7.1. Карта постадійного контролю

Для забезпечення відповідності готової продукції вимогам НТД на підприємстві забезпечується постадійний контроль процесу. Перелік найважливіших контрольних точок наведено в таблиці 7.1.

Таблиця 7.1.

Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх, Кт 1.2.1.Перевірка правильності підготовки дезінфікуючих та миючих засобів	Хлорантоїн, концентрація	Перевірка концентрації; хімічний метод	Після приготування розчину	Концентрація розчину становить 0,5%,
Кх,Кт 1.2.2. Перевірка правильності підготовки дезінфікуючих та миючих засобів	кальцинована сода, концентрація	Перевірка концентрації, температури, термометр технічний, хімічний метод	Після приготування розчину	Концентрація розчину соди повинна становити 0,5%, Температура 20°C

НУХТ ЗБТЕК 05.02.09 ДП ПЗ				
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Хорольський С. А.			
Перевір.	Буценко Л. М.			
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.	Пирог Т.П.			
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ				
Літ.		Арк.		Акрушів
Кафедра БТМ				

Продовження табл. 7.1.

1	2	3	4	5
Км 1.3.1. Перевірка мікробіологічної чистоти приміщень	Приміщення	Перевірка мікробіологічної чистоти	Після генерального прибирання	КУО<1
Кт 1.4.1. Перевірка підготовки обладнання до роботи	Миття ферментера, температура мийного розчину,	Перевірка температури, термометр.	Під час операції	Температура дорівнює 50–60°C
Кт 1.4.2. Перевірка підготовки обладнання до роботи	Ополіскування ферментатора, температура води	Перевірка температури, термометр	Під час операції	Температура дорівнює 70–80°C
Кт 1.4.3. Перевірка на герметичність обладнання	Вентилі, місця з'єднання, герметичність роботи обладнання,	Перевірка тиску, манометр, годинник.	Перед початком роботи та проведенням стерилізації	Тиск повинен дорівнювати 0,15–0,2МПа
Кт,Км 1.4.4. Перевірка стерилізації обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації	Перевірка тиску, температури, манометр технічний, термометр технічний, годинник	Перед початком роботи та під час проведенням стерилізації	P=0,15 МПа, t=125–130°C, КУО=0
Кт 2.1. Перевірка висоти забору повітря	Повітрозабір на труба	Перевірка висоти забору повітря	Під час приготування повітря	H=30 м
Кт 2.2. Перевірка попереднього очищення повітря	Фільтр, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E=90%

Продовження табл. 7.1.

1	2	3	4	5
Кт 2.3. Перевірка компресування	Повітря	Перевірка тиску та температури, манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	$t=220-250^{\circ}\text{C}$, $P=0,35-0,5\text{МПа}$
Кт 2.4. Охолодження стиснутого повітря	Охолоджене повітря,	Перевірка температури, термометр технічний	Після охолодження повітря	$T = 25 - 40^{\circ}\text{C}$
Кт 2.5. Нагрівання повітря	Нагріте повітря,	Перевірка температури, термометр технічний	Після нагрівання повітря	$T = 45 - 50^{\circ}\text{C}$
Кт. 2.6. Перевірка повітря очищеного в головному фільтрі	Повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в головному фільтрі	$E=95\%$, тиск згідно паспорту
Кт,Км 2.7. Перевірка стерилізованого повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря в індивідуальному фільтрі	$E=99,99\%$
Кт,Км 3.1.1 Кт,Км 3.2.1 Кт,Км 3.3.1 Кт,Км 3.4.1 Кт,Км 3.5.1 Перевірка правильності приготування та стерилізації Композиції А	температура, тиск, час, стерильність	Перевірка температури, тиску, часу, мікробіологічної чистоти; манометр технічний, температурний сенсор, годинник	Температура та тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$T = 112^{\circ}\text{C}$; $P=0,05\text{МПа}$; $t = 30\text{хв}$; $KУО < 1$

Продовження табл. 7.1.

1	2	3	4	5
Кт,Км 3.1.2 Кт,Км 3.2.2 Кт,Км 3.3.2 Кт,Км 3.4.2 Кт,Км 3.5.2 Перевірка правильності приготування та стерилізації Композиції Б	температура, тиск, час, стерильність	Перевірка температури, тиску, часу, мікробіоло- гічної чистоти	Температура та тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль після стерилізації	$T = 131 \text{ } ^\circ\text{C}$; $P=0,15$ МПа; $t = 40$ хв; $KУО < 1$
Км 4.1. Перевірка активності музейної культури	Робоча культура, температура, час зовнішній вигляд під час інкубації, мікробіологіч на чистота	Температурни й сенсор, годинник, візуально, мікробіологіч ний контроль	Температура, ч ас і зовнішній вигляд під час виробничого процесу, Мікробіологіч ний контроль по закінченню процесу	$t = 2-8 \text{ } ^\circ\text{C}$ $\tau = 2-3$ міс Наявність росту культури. Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 Вирощу-вання культури в колбах на качалці	Посівний матеріал, Тривалість вирощування, температура, швидкість перемішуванн я, мікробіологіч на чистота	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологіч ний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	$t = 27 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\tau = 96$ год 200 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.5. Кт, Км, Кх 4.6. Кт, Км, Кх 4.7. Перевірка вирощування інокуляту	Культуральна рідина, температура, час, рівень піни, кількість обертів мішалки, м/б чистота,	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологіч- ний контроль	Під час вирощування культури у ферментері.	$t=27^\circ\text{C}$; $T=72$ год; $KУО < 1$; $n=170$ об/хв; Відсут- ність сторо- нньої мікро- біоти

Закінчення табл. 7.1.

1	2	3	4	5
Кт, Км, Кх 5.1. Перевірка виробничого культивуванн я	Культуральна рідина, температура, час, кількість обертів мішалки, м/б чистота,	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологіч- ний контроль	Під час вирощування культури у ферментері.	t=27°C; T=72 год; КУО<1; n=110 об/хв; Відсут- ність сторо- нньої мікро- біоти

7.2. Мікробіологічний контроль

Якість посівного матеріалу визначають як методом прямого мікроскопіювання, так і висівом на чашки Петрі.

Для визначення кількості бактеріальної флори 1 мл відповідного розведення вносять в стерильну чашку Петрі із м'ясо-пептонним агаром. Посіви інкубують при 37 °С протягом 24 год, після чого підраховують кількість утворених колоній.

Для визначення дріжджів, 1 мл відповідного розведення вносять в стерильну чашку Петрі з сусло-агаром. Посіви інкубують при 30 °С протягом 72 год, після чого підраховують кількість утворених колоній. Після цього отримані зразки колоній аналізують мікроскопіюванням [23].



Рис. 7.1. *Sinorhizobium meliloti* AC08 на поживному середовищі (МПА)

Результатом мікроскопіювання посівного матеріалу має бути відсутність сторонньої мікробіоти в полі зору препарату. А також відсутність на чашках Петрі сторонніх мікробних контамінацій. На мясопептонному агарі колонії точкові, бежеві.

Культуральні ознаки продуцента: штрих на агаризованому середовищі рясний, слизувий, блискучий, колонії - круглі, однотипні, білуваті, блискучі з чіткими краями до 5 мм в діаметрі.

При наявності сторонньої мікробіоти, що не відповідає за морфолого-культуральними ознаками, в посівному матеріалі його не використовують для засіву.

Для мікроскопіювання використовують препарати «роздавлена крапля». Приготування препарату «роздавлена крапля». Препарат готується на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю дистильованої води. З дотриманням правил асептики бактеріологічною петлею у воду вносять невелику кількість культуральної рідини, розмішують і накривають покривним скельцем. Не слід вносити велику кількість культури, оскільки препарат буде густим і малоприсадним для спостереження. Не можна допускати утворення бульбашок повітря під покривним склом. За надлишку води її видаляють фільтрувальним папером. Мікроскопування здійснюють без імерсії, збільшення x40 [23].

При відсутності у зразку сторонньої мікрофлори можна побачити клітини *Sinorhizobium meliloti* AC08 (рис. 7.2).

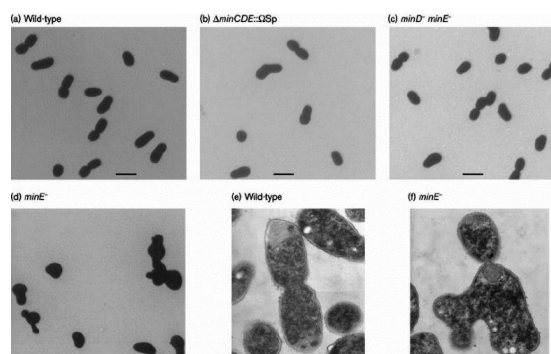


Рис. 7.2. Морфологічні особливості *Sinorhizobium meliloti* AC08

7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.3.1 Концентрація біомаси.

Біомасу визначають непрямим методом, а саме за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка, але через складність середовище і специфіку кінцевого продукту, біомасу вимірюємо на етапі одержання посівного матеріалу [48].

Основою методу є вимірювання інтенсивності світла при його проходженні через суспензію мікроорганізмів. Клітини мікроорганізмів поглинають і розсіюють світло, причому інтенсивність цих процесів залежить від числа клітин і їх розмірів [24].

Техніка визначення: відбирають проби по 10 мл культуральної рідини. Зміну інтенсивності світла при проходженні через суспензію клітин вимірюють за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК) або спектрофотометра, вибираючи довжину хвилі (зазвичай в інтервалі 540-650 нм), за якої поглинання світла даною суспензією клітин є мінімальним. За високих концентрацій клітин в культуральній рідині відбувається вторинне розсіювання світла, що призводить до отримання занижених результатів. Тому суспензії великої щільності перед вимірюванням необхідно розводити водою. Розведення проб однієї і тієї ж культури різними рідинами неприпустимо, так як набухання і стиснення клітин впливає на величину світлорозсіювання. Для побудови калібрувальної вимірюють величину світлорозсіювання суспензій з різним вмістом клітин і в кожній з них визначають одним із застосовуваних методів кількість клітин або біомасу. Отриману залежність виражають графічно, відкладаючи на осі ординат значення ФЕК, а на осі абсцис - кількість клітин, що містяться в 1,0 мл суспензії, або біомасу в г/л [24].

7.3.2 Визначення концентрації цільового продукту

Нашим цільовим продуктом є біомаса мікроорганізмів. Тому для визначення концентрації проводять підрахунок кількості колоніє утворюючих одиниць на твердих середовищах. Концентрація мікробних клітин виражається числом клітин мікроорганізмів (включаючи нежиттєздатні і пошкоджені) на одиницю об'єму суспензії. При визначенні концентрації мікробних клітин встановлюється процентний вміст життєздатних клітин, яке визначається числом живих клітин на одиницю об'єму суспензії (число колонієутворюючих одиниць в мл КУО / мл).

Процедура підрахунку концентрації мікробних клітин в лабораторних умовах може виконуватися вручну або за допомогою автоматичних пристроїв. Розрізняють методи прямого візуального підрахунку, визначення кількості колоній після висіву мікроорганізмів на поживні середовища, а також облік мікробних клітин під мікроскопом після їх фарбування певними барвниками. Крім того, можуть застосовуватися комерційні водорозчинні системи, що містять стандартизовану кількість мікробних клітин. Сучасні комерційні системи прості у використанні і дозволяють знизити випадкову похибку при визначенні концентрації мікробних клітин, пов'язану з людським фактором.

Методи прямого підрахунку дають можливість найбільш повно врахувати чисельність мікроорганізмів. Їх ефективність набагато вище, ніж методу посіву на поживні середовища, так як багато мікроорганізмів вимогливі до умов культивування і якості поживного середовища. Крім того, методи прямого підрахунку дають можливість отримати додаткову інформацію про розміри і морфології досліджуваних клітин.

Найбільш поширеним методом визначення загального числа клітин в 1 мл суспензії є їх підрахунок під мікроскопом з використанням лічильної камери. Існує кілька видів рахункових камер, принциповий пристрій яких

однаково: Тома-Цейсса, Бюркера, Горяєва, камера підрахунку з сіткою Нейбауера.

Рахункова камера Горяєва – це предметне скло з нанесеними на нього поперечними прорізами, що утворюють три поперечно розташовані плоскі майданчики. Середній майданчик поздовжньою прорізом розділена ще на дві площадки, кожна з яких має вигравірувану на ній сітку з квадратами певної площі. По обидва боки середньої площадки в камері Горяєва розташовані дві інших на 0,1 мм вище середньої. Площині цих майданчиків служать для притирання покривного скла до появи так званих Ньютонівських кілець.

Після притирання покривного скла створюється камера, закрита з двох бічних сторін, а з двох інших має капілярні простори, через які за допомогою пастерівської піпетки камеру заповнюють розведенням суспензії мікроорганізму.

Підрахунок клітин проводять під мікроскопом, який налаштовують таким чином, щоб була видна нанесена на камеру сітка і клітини мікроорганізму, рівномірно розподілені на ній. Вважають число клітин в 5 горизонтальних і 15 діагональних великих квадратах, після чого визначають число клітин (x) в 1 мл досліджуваної суспензії за формулою:

$$x = \frac{a}{20} \cdot N \cdot k \cdot b = \frac{a \cdot 225 \cdot 1111}{20} \cdot b = a \cdot 12499 \cdot b,$$

де: a – число клітин в 20 квадратах;

N = 225 – число великих квадратів в камері Горяєва;

$k = \frac{1}{v} = \frac{1}{0,0009} = 1111$ – коефіцієнт, що дорівнює величині, зворотнім

обсягом камери Горяєва ($v = 0,9 \text{ мм}^3 = 0,9 \cdot 10^{-3} \text{ мл}$);

b – розведення вихідної суспензії мікроорганізму.

При підрахунку з використанням камери Горяєва необхідно дотримуватися таких основних правил:

– використовувати тільки стандартні покривні скла;

- проводити підрахунок тільки чистих культур;
- уникати недостатнього заповнення і переповнення камери;
- уникати наявності бульбашок повітря в камері;
- враховувати всі клітини, що лежать в квадраті сітки, а також

перетинають верхню і праву сторони квадрата;

підрахунок клітин виробляти з об'єктивом $8 \times (10 \times)$, рідше $40 \times [3, 16]$.

7.3.3 Концентрації джерела вуглецю і азоту.

Метод засновано на блокуванні формальдегідом при $\text{pH}=7,0$ вільних аміногруп і титруванні лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп. Початок і кінець титрування визначають потенціометрично [11]. В стакан об'ємом 50 мл наливають 2 мл дослідного розчину поживного середовища і доводять об'єм водою очищеною до 20 мл. Коригують pH потенціометрично до значення 7,0 за допомогою розчину NaOH 0,1М або HCl 0,1М. До нейтрального розчину додають 2,0 мл нейтрального формаліну (pH доводять до 7,0 10 %-им розчином NaOH), перемішують і титрують потенціометрично до pH 9,1 за допомогою розчину NaOH 0,1М.

Вміст амінного азоту у зразку (в мг%) визначають за формулою:

$$X = V \cdot K \cdot 1.4 \cdot 100 / 2$$

де, V – кількість розчину NaOH 0,1М в мл, що пішла на титрування проби;

K – поправка до титру розчину NaOH 0,1М, що використовувався;

1.4 – кількість амінного азоту в мг, еквівалентна 1 мл розчину NaOH 0,1М;

2 – об'єм зразка, мл.

Концентрацію глюкози визначають в супернатанті культуральної рідини.

Для його одержання культуральну рідину (100 мл) центрифугують 20 хв при 3000 об/хв для видалення біомаси.

Визначення проводять **глюкозооксидазним методом** [24].

Принцип методу: глюкоза в присутності ферменту глюкозооксидази окислюється киснем повітря з утворенням перекису водню. Перекис водню в

присутності ферменту пероксидази окиснює ортополідин з утворенням забарвленої сполуки, інтенсивність забарвлення якій пропорційна вмісту глюкози.

Робочий реактив: в 80 мл ацетатного буфера розчиняють 2 мг глюкозооксидази та 1 мг пероксидази, додають 1 мл 1%-ного розчину ортополідину, перемішують і доводять об'єм буферним розчином до 100 мл.

До 1 мл супернатанту додають 3 мл робочого реактиву і обережно перемішують. Поступово починає розвиватися забарвлення, яке при звичайній кімнатній температурі досягає максимуму через 13-15 хв. Фотометрують при довжині хвилі 625 нм проти контрольного розчину (замість культуральної рідини містить фізіологічний розчин).

Розрахунок проводять за калібрувальним графіком, на одній осі якого відкладено концентрацію глюкози (ммоль/л), а на іншій – величину екстинкції. [24].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Доросинский Л. М. Бактериальные удобрения – дополнительное средство повышения урожая // М.: Россельхозиздат. 1965. 171 с.
2. Емцев В. Т., Мишустин Е. Н. Микробиология: учебник для вузов // 2005. Изд. 5-е. М.: Дрофа. 445 с.
3. Зайцев, Г. А., et al. Молекулярно-генетическая паспортизация производственных штаммов микроорганизмов, используемых в производстве биопрепаратов-стимуляторов роста сельскохозяйственных растений. Биотехнология: состояние и перспективы развития. 2018.
4. Ібрагімова М. В., Румянцева М. Л., Онищук О. П. і ін., Симбіоз бульбочкових бактерій *Sinorhizobium meliloti* з люцерною *Medicago sativa* в умовах засолення. Мікробіологія. 2006, Т.75. №1. с.1-6.
5. Маркина А. А. Липополисахаридная кандидат-вакцина для профилактики эндотоксического и септического шока // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологической степени. Москва. 2013.
6. Мартиросян Ю. Ц. современные биотехнологии в сельскохозяйственном производстве (modern biotechnology in agriculture). Биотехнология: состояние и перспективы развития 23 (2018): 797.
7. Румянцева, М. Л., Мунтян, В. С., Черкасова, М. Е., Андронов, Е. Е., Саксаганская, А. С., Дзюбенко, Е. А., ... & Симаров, Б. В. (2017). Сравнительный анализ геномных характеристик у референтных штаммов *Sinorhizobium meliloti*-симбионтов люцерны. Сельскохозяйственная биология, 52(5).
8. Румянцева М. Л., Степанова Г. В., Мунтян В. С., Онищук О. П., Кожемяков А.П., Симаров Б.В. Создание симбиотической системы на основе производственных сортов *M. varia*, *M. lupulina* и генетически охарактеризованного эффективного штамма *Sinorhizobium meliloti* RCAM01775, устойчивой к неблагоприятным почвенно-климатическим факторам. В сб.: Актуальные направления селекции и использования люцерны в кормопроизводстве. М., 2014: 133-142.

9. Саданов А. К., Гаврилова Н.Н., Даданова Т.Н., Ратникова И. А. Критерии отбора штаммов клубеньковых бактерий в состав биопрепаратов для обогащения почвы биологическим азотом и повышения урожайности бобовых культур. Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Серия биологическая и медицинская, 2015, 1: 115-124.

10. Суховицкая, Л. А., Г. М. Клышко. Ризобияльные и фосфатмобилизующие инокулянты: выживаемость и конкурентоспособность в почвах двухкомпонентных агрофитоценозов // Современные проблемы использования почв. ресурсов и повышения их производит. способности: материалы междунар. науч.-произ. конф./Белорус. гос. с.-х. акад.–Горки. 1997.

11. Умаров Б. Р. Ризобіальні бактерії роду *Sinorhizobium fredii* і *Bradyrhizobium japonicum* вступають в симбіоз з рослинами сої // *Universum: Хімія і біологія*: електрон. наук. журн. 2019. № 4 (58).

12. Шамсутдинов С. Д. Селекція кормових культур: досягнення і завдання. Сільськогосподарська біологія, 2014 року, 6: 36-45 (doi: 10.15389 / agrobiology.2014.6.36).

13. Шкодина, Е. П. Использование микробиологических препаратов на бобовых культурах. Современные проблемы биологической интенсификации земледелия (2018): 250.

14. Draghi, Walter Omar, et al. "A metabolomic approach to characterize the acid-tolerance response in *Sinorhizobium meliloti*." *Metabolomics* 13.6 (2017): 71.

15. Chen W. X., Han G. H., Li. J. L. Numerical taxonomic study of fastgrowing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1988. V.38. P. 392-397.

16. Crow V. L., Jarvis B. ID. W., Greenwood R. M.. Deoxyribonucleic acid homologies among acid-producing strains of *Rhizobium* // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1981. V. 31. P. 152-172.

17. Fedonenko Y. P., Konnova O. N., Zatonsky G. V., Shash-kov A. S., Konnova S. A., Zdrovenko E. L., Ignatov V. V., Knirel Y. A. Structure of the Opolysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum irakense* KBC1 // *Carbohydr. Res.* 2014. V. 339. P. 1813–1816.
18. Kajić S., Hulak N., Sikora S. Environmental stress response and adaptation mechanisms in Rhizobia. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 2016, 81(1): 15-19.
19. Man-Kupisinskaa A., Bobkoa E., Gozdziwicza T. K., Maciejewska A., Jachymek W., Lugowski C., Lukasiewicz J. Fractionation and analysis of lipopolysaccharide-derived oligosaccharides by zwitterionic-type hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray ionisation mass spectrometry // *Carbohydrate Research*. 2016. P. 2-6.
20. Margaret I., Lucas M. M, Acosta-Jurado S., Buendí'a-Claverí'a A. M., Fedorova E., Hidalgo A., Rodriguez-Carvajal M.A., Rodriguez-Navarro D. N., Ruiz-Sainz J. E., Vinardell J. M. The Sinorhizobium Lipopolysaccharide is not only relevant at early soybean nodulation stages but also for symbiosome stability in mature nodules // 2013. V. 8. P. 1-3.
21. Ruiz, Bryan, et al. "The nitrate assimilatory pathway in Sinorhizobium meliloti: contribution to NO production." *Frontiers in microbiology* 10 (2019).
22. Wedlock, D. N., Jarvis, B. D. W. DNA homologies between Rhizobium and Bradyrhizobium species // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1986. V. 36. P.550-580.
23. Wilkinson S. G. Bacterial lipopolysaccharides – themes and variation // *Prog. Lipid Res.* 2016. V. 35. No. 3. P. 283-343.
24. Коць С. Я. Воробей Н. А. Кириченко О. В. Мельникова Н. М. Михалків Л. М. Пухтаєвич П. П. "Мікробіологічні препарати для сільського господарства" Головний редактор академік НАН України В.В. Моргун Українською мовою Підп. до друку. 28.11.2016. Київ. Наукове видання Інститут

фізіології рослин і генетики національної академії наук України Віддруковано у ТОВ-Видавництві “ЛОГОС”

25. Патент України на винахід № 111391, 25.04.2016, бюл. № 8
26. Коць С. Я. Сучасний стан досліджень біологічної фіксації азоту // Физиология и биохимия культ. растений. – 2011. – Т. 43, № 3. – С. 212—225
27. Моргун В.В. Симбіотична азотфіксація та її значення в азотному живленні рослин: стан і перспективи досліджень. //Фізіологія і біохімія рослин. – 2008. – Т. 40, № 3. – С. 187-205.
28. Игнатов В.В. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями // М.: Наука. – 2005. – 262 с.
29. Коць С.Я., Михалків Л.М. Фізіологія симбіозу та азотне живлення люцерни. — К.: Логос, 2005. — 300 с.
30. Воробей Н.А., Коць С.Я., Бутницький І.М. Ефективність симбіотичних систем люцерни за інокуляції Tn5-мутантами *Sinorhizobium meliloti* // Фізіологія і біохімія рослин. — 2007. — 39, № 2. — С. 105—113.
31. Пат. 50851 Україна СО5F 11/08, С12№1/20. Штам бактерій *Rhizobium meliloti* для одержання бактеріального добрива під люцерну // Коць С.Я., Воробей Н.А., Старченков Ю.П. — Опубл. 15.11.02. Бюл. № 11
32. Доросинский Л. М. Бактериальные удобрения – дополнительное средство повышения урожая // М.: Россельхозиздат. 1965. 171 с.
33. Емцев В. Т., Мишустин Е. Н. Микробиология: учебник для вузов // 2005. Изд. 5-е. М.: Дрофа. 445 с.
34. Румянцева, М. Л., Мунтян, В. С., Черкасова, М. Е., Андронов, Е. Е., Саксаганская, А. С., Дзюбенко, Е. А., Симаров, Б. В. (2017). Сравнительный анализ геномных характеристик у референтных штаммов *Sinorhizobium meliloti*-симбионтов люцерны. Сельскохозяйственная биология, 52(5)
35. 4. Draghi, Walter Omar, et al. "A metabolomic approach to characterize the acid-tolerance response in *Sinorhizobium meliloti*." *Metabolomics* 13.6 (2017): 71.

36. Основні питання вирощування люцерни [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://agro-business.com.ua/agro/ahronomiia-sohodni/item/11982-osnovni-pytannia-vyroshchuvannia-liutserny.html> .

37. ИНОКУЛЯНТ РИЗОФИКС® ЛЮЦЕРНА / RHIZOFIX® ALFALFA [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://agritema.com/ru/product/95-ynokuliantryzofyksliutsernarhizofixalfalfa/> .

38. Герасименко В.Г., Герасименко М.О., Цвіліховський М.І. та ін. Біотехнологія. Підручник; Під общ. ред. В.Г.Герасименко.-К.:Фірма «ІНКОС»,2006.-647с.

39. Коломиец Э.И., Лобанок А.Г. Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – М.: Логвин, 2007. – 402 с.

40. Пирог Т.П., Игнатова О.А. Загальна біотехнологія. – Київ: НУХТ, 2009. – 336 с.

41. Пилотные ферментеры | Пилотная ферментация – БИОТЕХНО [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://biotechno.ru/catalog/pilotnie-fermentery/>

42. Божков А.И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты. – Харьков, 2005. – 364 с.

43. Винаров А.Ю., Кухаренко А.А., Панфилов В.И. Лабораторные и промышленные ферментеры. – М.: РХТУ, 2004. – 487 с.

44. Люлина Н. В. Стандарты подготовки помещений // Чистые помещения и технологические среды. – 2014. – №1 (53).

45. Міщиряк В.Г. Сучасні гігієнічні вимоги до миття та дезинфекції на харчових підприємствах//Підручник. – Донецьк. – 2012. – 33 с.

46. Продукция ТДВ «ПХЗ «КОАГУЛЯНТ» [Електронний ресурс] // Режим доступу:http://www.coagulantroducer.com/reagent/mittya_ta_dezinfekciya_u_cip_sistemah?category=cat1&group=reagents-for-cleaning-and-disinfection-in-cip-systems

47. *Продукція* НПП «Биоцид» [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://biocide.com.ua/p10341693-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-gembar.html>
48. *Біологія клітин* [Електронний ресурс]. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навчання / уклад.: В.О. Красінько, І.М. Волошина. – К.: НУХТ, 2014. – 147 с.
49. *Навчальний посібник* для студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації «Фармацевтична хімія. Аналіз препаратів біотехнологічного виробництва» / За загальною редакцією професора В.А. Георгіянц. – Харків: 2013. – 215 с.
50. Аналізатор азота, белка LOIP LK-500 по Кьельдалю [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.dia-m.ru/lab/belkaazota-analizatory/loip-loip-lp-500-analizator-azotabelka-loip-lp-500-avt/>



УКРАЇНА (19) UA (11) 111391 (13) C2 (51) МПК

C12N 1/20 (2006.01) C05F 11/08 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2014 06481</p> <p>(22) Дата подання заявки: 11.06.2014</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними 25.04.2016 права на винахід:</p> <p>(41) Публікація відомостей 27.10.2014, Бюл.№ 20 про заявку:</p> <p>(46) Публікація відомостей 25.04.2016, Бюл.№ 8 про видачу патенту:</p>	<p>(72)</p> <p>Винахідник(и): Коць Сергій Ярославович (UA), Воробей Надія Анатоліївна (UA)</p> <p>Власник(и): ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ НАН УКРАЇНИ, вул. Васильківська, 31/17, м. Київ-22, 03022 (UA)</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Воробей Н. А. и др. Фізіологічні особливості розвитку люцерни за інокуляції змішаними культурами азотфіксувальних мікроорганізмів //Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т.41, №4. – С.344-352 Воробей Н. А., Коць С. Я. Азотфіксувальна активність і ріст вегетативних органів люцерни за сумісної інокуляції активним і неактивним штамами <i>Sinorhizobium meliloti</i> //Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т.41, №2. – С.162-167</p>
--	--

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ SINORHIZOBIUM MELILOTI IMB B-7411 ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО ДОБРИВА ПІД ЛЮЦЕРНУ

(57) Реферат:

Винахід стосується штаму бульбочкових бактерій *Sinorhizobium meliloti*, який депоновано в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під реєстраційним номером B-7411, для одержання бактеріального добрива під люцерну.

Винахід належить до мікробіологічних засобів підвищення урожайності бобових культур.

Штам бульбочкових бактерій *Sinorhizobium meliloti* AC08 можна використовувати у мікробіологічному виробництві препаратів як бактеріальну основу добрив під люцерну.

Актуальним завданням сьогодення в області симбіотичної азотфіксації є створення препаратів біологічної стимуляції росту, розвитку бобових рослин і посилення їх продуктивності за рахунок використання симбіотрофного азоту. Основою цих препаратів є високоактивні штами бульбочкових бактерій.

Оскільки аналітична селекція є найбільш вживаним (традиційним) методом отримання різних штамів бульбочкових бактерій із господарсько-цінними властивостями, вона не втратила практичного значення і в теперішній час. Вихідним матеріалом слугують ізоляти *Rhizobiaceae*, виділені з корневих бульбочок рослин або безпосередньо з мікробних ценозів ґрунту. Нові штами бульбочкових бактерій ізольовані з природних ценозів нерідко поступаються за азотфіксувальною активністю та ефективністю виробничим. Виділити з біоценозів ризобії з азотфіксувальною активністю більшою за активність колекційних та виробничих штамів стає все важче. Втім суттєвою перевагою "природних" культур є пристосованість до ґрунтовокліматичних умов тієї чи іншої географічної зони їх походження, стійкість до біотичних і абіотичних чинників. Це свідчить про те, що ці бактерії мають потенційно високу конкурентоздатність і екологічну пластичність (властивість швидко приживатись при інтродукції їх у відповідну екологічну нішу не впливаючи на структуру мікробної спільноти ґрунту).

Особливо цінним є екологічна безпечність аналітично селекціонованих ризобій при інтродукції їх в природне середовище.

Впровадження у сільськогосподарське виробництво нових сортів люцерни, розширення посівів у регіонах, зниження азотфіксувальної активності з плином часу у бульбочкових бактерій зумовлює необхідність отримання нових високоєфективних, конкурентоздатних штамів 25 *Sinorhizobium meliloti*.

Протягом багатьох років в Україні для виробництва бактеріальних добрив під люцерну використовується штам *S. meliloti* 425a, отриманий методом аналітичної селекції (А.с. СРСР № 549454, С05F 11/08, 25.05.77). Впродовж останніх років методом гібридизації та при застосуванні транспозонового мутагенезу отримані конкурентоспроможні ефективні у симбіозі з

30 різними сортами люцерни штами *S. meliloti*: М4 (пат. України № 13298, 28.02.97, бюл. № 1 і М12 (пат. України № 50851, 15.11. 2002, бюл. № 11) та Т17 (пат. України на корисну модель № 55432, 10.12.2010, бюл. № 23). Зокрема, інокуляція насіння штамом М12 *S. meliloti* забезпечувала надбавку урожаю зеленої маси люцерни від 24 до 36 ц/га (8,1-14,5 %), а насіння від 0,20 до 0,21 ц/га (15,4-22,7 %) порівняно із застосуванням виробничого штаму 425a залежно

35 від ґрунтово-кліматичних умов вирощування згаданої культури. Використання штаму Т17 у формі рідкого бактеріального препарату для інокуляції посівного матеріалу збільшує азотфіксувальну активність люцерни в 1,3-5,3 разів і забезпечує підвищення урожайності надземної маси на 9,6-15,5 % (16,9-48,2 ц/га) порівняно із застосуванням штамів 425a (аналітична селекція) і М12 (отриманий методом гібридизації) у залежності від сорту люцерни і 40 ґрунтово-кліматичних умов її вирощування.

Задачею винаходу є одержання нового конкурентоздатного штаму бульбочкових бактерій люцерни адаптованого до ґрунтово-кліматичних умов Полісся України з високою азотфіксувальною активністю і вірулентністю, який би дозволяв підсилити процес симбіотичної азотфіксації у районованих сортах люцерни, підвищити їх продуктивність і покращити якість 45 надземної маси.

Спосіб отримання штаму. Культура бульбочкових бактерій *S. meliloti* АС08 виділена із корневих бульбочок люцерни природних ценозів Полісся України (Житомирська область, Коростенський район, червень, 2008 р., Інститут фізіології рослин і генетики НАН України).

Виділення бульбочкових бактерій із корневих бульбочок люцерни (ізоляція) здійснена згідно з методичними рекомендаціями ВНДІСГМ РАСГН [Методы исследований клубеньковых бактерий / Методические рекомендации для курсов повышения квалификации научных сотрудников по сельскохозяйственной микробиологии - Л., 1981. - 48 с].

Штам ідентифіковано за визначником Бергі (Краткий определитель Берги. - М.: Мир, 1980. -

495 с.) і депоновано в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під 55 реєстраційним номером ІМВВ-7411.

Культурально-морфологічні особливості штаму: мікроаерофіл, температурний діапазон росту: 20-28 °С. Оптимальна температура росту -27 °С. Діапазон рН 6,2-7,2. Оптимальна рН - 7,0. Культура бактерій швидкоросла, не спороносна, грамнегативна, клітини мають форму дрібних паличок. Палички рухливі, мають перитрихіальні джгутики. Бактерії пігмент не продукують. Розмір клітин дводобової культури 0,5×1,2 мкм. У молодому віці палички рухливі.

На 4-5 добу на бобовому агарі колонії слизисті сірувато-молочного кольору, легко знімаються з поверхні агару, на 5-7 день продукують багато слизу. При старінні клітини утворюють бактероїди вильчатої форми.

Фізіолого-біохімічні ознаки. Молоко з лакмусом пептонізує, желатину не розріднює, клітковину не використовує. Відношення до вуглеводів - культура активно засвоює з утворенням кислоти арабінозу, сахарозу, мальтозу і фруктозу. Слабше цукроспирти - маніт і сорбіт. Полісахариди - крохмаль, глікоген не гідролізує. Відношення до джерел азоту - культура росте на середовищах з азотнокислими і амонійними солями. Ознаки штаму стійкі.

Діагностичними особливостями культури є ріст на середовищах 79, МДА, МДА + KNO₃ (150

10 мМоль/л), здатність утворювати бульбочки на корнях інокульованих рослин люцерни за присутності у субстраті вирощування 1 н мінерального азоту за Гельрігелем (1 норма відповідає 708 мг Ca(NO₃)₂·4H₂O на 1 кг піску). Культура росте на м'ясопептонному агарі, на м'ясопептонному бульйоні при цьому ріст характеризується помутнінням середовища, колір якого не змінюється.

15 Культура також добре культивується на середовищах наступного складу:
манітно-дріжджовий агар: (МДА) (г/л: K_2HPO_4 -0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2;
 $NaCl$ -0,1; маніт - 10,0;

дріжджовий екстракт - 1,0; агар - 15,0-20,0; дист. вода, рН - 7,0);
синтетичне мінеральне середовище 79: (г/л: K_2HPO_4 -0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -
0,2; $NaCl$ -0,1; $CaCO_3$

- сліди; казамінокислоти (або гідролізат лактоальбуміну) - 0,1 % (1 г),
маніт - 10,0; агар - 17,0;

20 дист. вода) - колонії білі, випуклі, блискучі; бобовий агар: (1 л бобового
відвару (г/л: горох - 100 г гороху на 1 л водопровідної води), сахароза - 20
г; агар - 15-18 г; $NaCl$ -1 г). У 1 л води кип'ятити 100 г гороху 30 хв.,
настояти 20 хв.

Відвар відцідити, розчинити добавки. Стерилізувати при 1 атм 30 хв.,
рН 6,8-7,2; середовище ТУ (г/л): триптон - 5,0; дріжджовий екстракт -
3,0; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - 0,94.

25 Генетичні особливості: прототроф, стійкий до 150 мМоль/л
мінерального азоту у формі KNO_3 . Штам непатогенний, нетоксичний.
Бактерії *S. meliloti* AC08 здатні фіксувати атмосферний азот і
забезпечувати ним рослини, що є суттєвим джерелом азотного живлення
люцерни. Запропонований штам AC08 проявляє високий рівень
азотфіксувальної активності у симбіозі з районованими в Україні сортами
люцерни Ярославна (селекції Інституту землеробства

30 Південного регіону НААН України), Зарниця (селекції Селекційно-
генетичного інституту НААН) та перевищує за цим показником
виробничий штам 425а *S. meliloti*. Сорти люцерни Ярославна та Зарниця є
сортами сінокісного і кормового спрямування та рекомендовані для посіву
у Степу, Лісостепу та Поліссі України).

У лабораторних дослідах межу стійкості штаму AC08 до мінерального азоту
оцінювали за

35 інтенсивністю росту та кількістю колоній на середовищі МДА, збагаченого
 KNO_3 в чашках Петрі після вирощування протягом 5-7 діб при + 28 °С за різних
способів посіву культури: а) посів штрихом бактеріальною петлею, б) за
використання методу граничних розведень [Методы исследований

клубеньковых бактерий / Методические рекомендации для курсов повышения квалификации научных сотрудников по сельскохозяйственной микробиологии - Л., 1981. - 48 с.]. 40 Встановлено, що мінеральний азот у формі KNO_3 у концентраціях більше за 100 мМоль/л середовища пригнічував ріст і розвиток бульбочкових бактерій штамів 425а та Т17 *S. meliloti*. У той же час відмічено наявність бактеріальних колоній на поверхні мінерального середовища МДА+ KNO_3 (100-200 мМоль/л), що свідчить про здатність до репродукції штаму *S. meliloti* АС08 за даних умов.

45

Таблиця 1

9

Кількість колонієутворюючих одиниць ($KYO \cdot 10$) за впливу різних концентрацій KNO_3 на ріст

бульбочкових бактерій *S. meliloti*

Штам-інокулянт	Концентрація KNO_3 , мМоль/л середовища							
	0	15	30	50	75	100	150	200
425а (виробничий)	174,2	117,70	102,4	11,0	10,0	0	0	0
Т17 (базовий)	145,5	139,2	128,2	123,5	98,2	54,2	0	0
АС08 (запропонований)	132,2	130,4	118,7	63,0	83,0	48,0	32,0	6,0

Високі концентрації азоту в середовищі вирощування бактерій, чинять вплив на біохімічні, фізіологічні процеси, які протікають у бактеріальній клітині, що в кінцевому результаті призводить до порушення нормальної репродуктивної діяльності бактерій, результатом чого є 50 помітне зниження кількості клітин, які виживають на середовищах із вмістом іонів NO_3 . Проте той факт, що бульбочкові бактерії люцерни АС08 витримують у чистій культурі більш високі концентрації азоту порівняно із штамми Т17 і 425а не викликає сумніву.

Азотфіксувальну активність штаму, що пропонується, визначали в мікровегетаційних, вегетаційних і польових дослідах за редукцією ацетилену в етилен за методом Харді із співавт. (Hardy R.W.F., Holsten R.D, Jackson E.K., Burns R.C. 1968) на газовому хроматографі Agilent

Technologies 6850 Network GC System із полум'яно-іонізаційним детектором.

Ефективність штаму AC08 *S. meliloti* перевіряли на люцерні сортів Ярославна та Зарниця в умовах вегетаційних (промийтий річковий пісок, збагачений сумішшю Гельрігеля із різними дозами азоту у формі $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,25, 0,75, 1,0 та 1,5 норми (1 норма відповідає 708 мг

$10 \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ на 1 кг піску за Гельрігелем) і польових дослідів (на чорноземі опідзоленому, середньосуглинковому, вміст гумусу 3,0 %, N-11,4, P_2O_5 -10,4, K_2O - 8,1 мг/100 г ґрунту) у зоні Західного лісостепу України (Тернопільська обл.).

9

Передпосівну інокуляцію насіння проводили бактеріальною суспензією із титром 10 клітин

/мл. Для її отримання запропонований штам AC08 вирощували на МДА при +28 °С протягом 4-15 діб у пробірках. Культуру із поверхні агаризованого середовища змивали стерильною водою. Готували густу суспензію (50 мл), якою засівали качалочні колби із 350 мл середовища. Культивування проводили протягом 3-4 днів при +28 °С із використанням стаціонарної качалки, яка забезпечувала постійну аерацію середовища вирощування.

Посів люцерни в польових дослідах проводили у другій декаді квітня з шириною міжрядь 45

20 см і глибиною загортання насіння 1,5-2,0 см. Передпосівну обробку проводили за 1 годину до висіву насіння в ґрунт бактеріальною суспензією. Насіння висівали із розрахунку 15 кг/га.

Штам AC08 вивчали протягом 5 років за симбіотичними показниками, та відібрали за здатністю формувати активні азотфіксувальні бульбочки на коренях рослин. Показники штаму

AC08 - кількість бульбочок та загальна їх маса на 1 рослині коливаються в межах відповідних

25 показників штамів - виробничого 425а та T17, а в окремі фази розвитку люцерни їх перевищують (табл. 2).

Відмінною ознакою симбіозу люцерни та ризобій *S. meliloti* AC08 є більший рівень фіксації N_2 протягом фаз стеблуння і повного цвітіння

(формування генеративних органів) у порівнянні із бактеріями виробничого штаму 425а за рахунок інтенсивнішого утворення бульбочок у ці 30 періоди вегетативного розвитку рослин (табл. 3).

Відомо, що оптимальною нормою мінерального азоту у субстраті вирощування бобових рослин, за якої активно формується симбіотичний апарат є 0,25 н за Гельрігелем. В умовах вегетаційного дослідження збільшення норми азоту в субстраті вирощування рослин пригнічує формування бульбочок та їх азотфіксуючу активність залежно від мікросимбіонта. Однак,

35 при вирощуванні на піщаному субстраті з 0,75 н азоту рослин, інокульованих штамом АС08, у фазу бутонізація-цвітіння кількість корневих бульбочок, їх маса та азотфіксуюча активність, була більшою відповідно в 1,4, 2,21 і 1,31 разу у порівнянні з аналогічними показниками штаму 425а. При вирощуванні рослин за 1,0 норми азоту за Гельрігелем вказані показники штаму

АС08 домінували в 3,8, 1,76 і 2,07 разу відповідно проти симбіотичних показників штаму 425а

40 (табл. 4). Таким чином, встановлена толерантність симбіотичної системи люцерни за участю ризобій АС08 до впливу азотних сполук у порівнянні із використанням виробничого штаму 425а

S. meliloti.

Із метою встановлення ефективності інокуляції люцерни штамом АС08 нами проведено два укоси зеленої маси люцерни: перший - у фазу початку цвітіння, другий - у цю ж фазу після

45 відновлення вегетативного росту надземних органів після скошування. Із рослин, інокульованих аналітично-селекціонованими бульбочковими бактеріями АС08 за два укоси зібрали відповідно на 19,1, 10,0 та 16,9 % більше зеленої надземної маси у порівнянні з рослинами, інокульованими штамом 425а залежно від дози азоту в субстраті вирощування, що засвідчує ефективність функціонування симбіотичної системи люцерна - ризобії *S. meliloti* за даних умов

50 (табл. 4)

Таблиця 2

Динаміка утворення бульбочок у люцерни за інокуляції бактеріями *S. meliloti* (вегетаційні досліді,

середні значення за 3 роки)

Штам-інокулянт	Фаза розвитку рослин, дні після появи сходів				
	стеблування, 25-й	стеблування, 32-й	бутонізація, 40-й	цвітіння, 50-й	повне цвітіння, 58-й
Без інокуляції	0	0	0	0	6,0±0,5
425a (виробничий)	3,6±0,6	3,5±0,8	10,2±1,9	24,0±1,7	87,3±7,2
T17 (базовий)	3,3±0,7	2,2±0,6	8,0±0,5	36,0±2,0	43,0±4,4
АС08 (запропонований)	6,7±0,5	7,5±0,4	27,3±2,0	27,5±2,2	81,7±2,4

Таблиця 3

Азотфіксувальна активність (мкмоль C_2H_4 / (рослину·год.) люцерни сорту Ярославна за інокуляції бульбочковими бактеріями *S. meliloti* (вегетаційні досліді, середні значення за 3 роки)

Штам-інокулянт	Фаза розвитку рослин, дні після появи сходів					Сумарна за період визначень
	стеблування, 25-й	стеблування, 32-й	бутонізація, 40-й	цвітіння, 50-й	повне цвітіння, 58й	
425а (виробничий)	0,61±0,02	0,95±0,03	2,76±0,78	7,80±0,88	7,28±0,92	18,45
T17 (базовий)	2,24±0,15	2,99±0,62	5,30±0,71	5,60±0,63	17,84±0,23	33,97
АС08 (запропонований)	3,39±0,14	4,47±0,15	3,96±0,98	2,23±0,29	10,11±0,47	24,16

Таблиця 4

Ефективність симбіозу люцерни сорту Ярославна, інокульованої бульбочковими бактеріями *S. meliloti*, за впливу підвищених доз мінерального азоту (вегетаційні досліді, фаза - бутонізація-цвітіння)

Штам-інокулянт	Норма азоту	Кількість бульбочок, шт	Маса бульбочок, г	Азотфіксувальна активність, мкмоль C_2H_4 / (рослину·год.)	Урожай зеленої маси, сумарний за 2 два укуси	
				г/посудину	прибавка до штаму 425а, %	
425а(виробничий)	0,25	12,6±1,7	0,145±0,026	0,350±0,01	64,32±0,52	-
АС08 (запропонований)		17,0±1,5	0,219±0,023	0,380±0,04	76,61±0,28	19,1
425а(виробничий)	0,75	9,0±0,51	0,019±0,012	0,118±0,05	65,83±0,23	-
АС08 (запропонований)		12,7±1,5	0,042±0,017	0,155±0,019	72,43±0,63	10,0
425а (виробничий)	1,0	3,7±0,3	0,025±0,002	0,064±0,008	66,50±0,44	-

АС08 (запропонований)		14,3±0,1	0,044±0,001	0,133±0,003	77,76±0,38	16,9
НІР ₀₅					4,6	

У період бутонізації-початку цвітіння у зеленій масі бобових трав, зокрема у люцерни, 5 синтезується значний вміст сухої речовини та нагромаджується максимальна кількість білка. Особливе значення має вміст у білках рослин так званих незамінимих амінокислот (валіну, лейцину, ізолейцину, треоніну, метіоніну, гістидину, лізину, триптофану й фенілаланіну), які не можуть синтезуватися в організмі людини і тварин. За оптимальних умов (0,25 н) у рослин, інокульованих штамом АС08 відмічено найбільший показник загального амінокислотного

10 складу, який складав 16,31 мг/1 г сухої надземної маси рослин. Вміст незамінимих амінокислот при цьому становив 5,97, що складало 36,6 % від загального вмісту амінокислот. Найбільше рослини накопичували у зеленій масі лейцину 1,42 мг/1 г зразка проти 1,05 за інокуляції штамом 425а (табл. 5)

Таблиця 5

Вміст амінокислот у зеленій масі люцерни сорту Ярославна за інокуляції аналітичноселекціонованими бульбочковими бактеріями *S. meliloti*

Штам-інокулянт	Норма азоту	Вміст амінокислот мг/ в 1 г		
		загальний	незамінимі	
			мг в 1 г	%
Без інокуляції	0,25	10,28	3,43	33,36
425а (виробничий)		11,75	4,03	34,30
T17 (базовий)		14,19	4,94	34,78
АС08 (запропонований)		16,31	5,97	36,61

В умовах польового дослідження вивчена ефективність бобово-ризобіального симбіозу люцерни сорту Зарниця першого та другого року вегетації за штучної передпосівної інокуляції бактеріями

5 АС08 у порівнянні із використанням штамів-інокулянтів 425а та T17 *S. meliloti* на фоні ризобіальної мікрофлори ґрунту. Показано, що в

люцерни першого року вегетації, за інокуляції запропонованим штамом АС08, азотфіксація корневих бульбочок була в 3,8 та 2,3 разу більшою порівняно з бульбочками неінокульованих рослин (спонтанна інокуляція місцевими расами ризобій) та утворених штамом 425 відповідно. У рослин другого року вегетації аналогічні

10 показники були відповідно у 7,0, і 2,7 більшими, а також у 1,7 разу - у порівнянні з штамом Т17 *S. meliloti* (табл. 6). Отже, інтенсивність фіксації N₂ бульбочками утвореними штамом Т17 у люцерни другого року вегетації мала тенденцію до зниження, а штучна бактеризація АС08 *S. meliloti* стабільно забезпечувала достатньо високий рівень азотфіксації, що обумовлюється фізіологічною активністю, пристосувальним потенціалом та конкурентоздатністю в умовах

15 докільля цих ризобій (табл. 6).

Таблиця 6

Азотфіксувальна активність бульбочок люцерни сорту Зарниця за інокуляції бактеріями *S.*

meliloti (польовий дослід, Тернопільська обл., фаза бутонізація-початок цвітіння)

Штам-інокулянт	Азотфіксувальна активність, мкмоль С ₂ Н ₄ / (рослину · год.)	
	перший рік вегетації	другий рік вегетації
Без інокуляції	0,21±0,03	0,16±0,00
425а (виробничий)	0,35±0,08	0,42±0,01
Т17 (базовий)	0,91±0,02	0,64±0,02
АС08 (запропонований)	0,81±0,02	1,12±0,13

За результатами дослідів, проведених у ґрунтово-кліматичних умовах Тернопільської області, прибавка урожаю (сумарно за два укоси) зеленої маси люцерни сорту Зарниця

20 становила 11,3 та 16,9 % порівняно із урожаєм рослин при застосуванні виробничого штаму 425а та за спонтанної інокуляції (табл. 7)

Вплив інокуляції бульбочковими бактеріями *S. meliloti* на продуктивність люцерни сорту Зарниця в ґрунтово-кліматичних умовах Полісся України (середні дані за 3 роки дослідження)

Штам-інокулянт	Урожай надземної маси, ц/га								
	I укіс		II укіс		Сумарний за II укоси				
	ц/га	% до контролю	ц/га	% до контролю	ц/га	прибавка до контролю штаму 425а			
						ц/га	%	ц/га	%
Без інокуляції	194,0±2,5	100,0	67,2±7,8	100,0	261,2	-	100	-	-
425а (виробничий)	201,1±8,0	103,6	78,3±1,3	116,5	279,4	18,2	105,0		100
T17 (базовий)	234,9±7,2	121,1	78,1±1,5	116,2	313,0	51,8	114,3	33,6	108,8
АС08 (запропонований)	241,6±2,6	124,5	80,7±2,6	120,1	322,3	61,6	116,9	42,6	111,3
НІР05					11,3				

Це є свідченням того, що інтродуковані ризобії здатні приживатись у ґрунті, інфікувати корені рослин та активно функціонувати у симбіозі з рослинами люцерни протягом першого та другого років вегетації. Підтвердженням цього є також різниця за азотфіксувальною активністю між інокульованими та неінокульованими (зазнали впливу місцевої ризобіальної мікрофлори 5 ґрунту) рослинами.

У рослин, бактеризованих штамом АС08, відмічено збільшення концентрації хлорофілів а і b та каротиноїдів порівняно із показниками контрольних варіантів, що підтверджує стимулюючий вплив даних мікроорганізмів на формування фотосинтетичного апарату у порівнянні з інокуляцією люцерни штамом аналітичної селекції 425а (табл. 8).

Вміст фотосинтетичних пігментів у листках люцерни, інокульованої
бульбочковими бактеріями *S.*
meliloti

Штам-інокулянт	Хлорофіл, мг/г сирії речовини		Каротиноїди, мг/г сирії речовини
	a	b	
Без інокуляції	0,71±0,05	0,24±0,01	0,15±0,01
425a (виробничий)	1,14±0,05	0,36±0,01	0,25±0,01
T17 (базовий)	1,32±0,03	0,47±0,01	0,24±0,01
АС08 (запропонований)	1,29±0,09	0,39±0,03	0,28±0,02

Додатковою перевагою штаму АС08 є його висока конкурентоздатність, яка забезпечує йому пріоритет у процесі утворення бульбочок при вирощуванні люцерни за присутності сторонньої ризобіальної мікрофлори. Конкурентоздатність штаму АС08 визначали непрямым методом (за 15 надземною масою інокульованих рослин) і розраховували за формулою Амаргер (Amarger N., 1981). На люцерні сорту Зарниця запропонований штам АС за показником конкурентоздатності перевищував еталонний виробничий штам 425a та базовий T17 *S. meliloti* (табл. 9). Відповідні показники дорівнювали - 83 % (АС08) проти - 75 % (425a) і 79 % (T17).

Таблиця 9

Ефективність азотфіксації та конкурентоздатність бульбочкових бактерій люцерни *S. meliloti* (вегетаційний дослід)

20

Штам-інокулянт	Абсолютно суха речовина, г/посудину		Конкурентоздатність, %
	інокуляція штам + (шт.)	інокуляція сумішшю (шт. + - шт.)	
Без інокуляції	1,60±0,02		
СХМ1-48 (неактивний)	1,48±0,04		
К 425а (виробничий)	1,88±0,03	1,79±0,02	75,0
Т17 (базовий)	2,37±0,05	2,19±0,03	79,0
АС08 (запропонований)	2,50±0,03	2,43±0,04	83,0

н

д

ований штам АС08 *S. meliloti* достатньо технологічний і його можна використовуватися у виробництві бактеріального добрива під люцерну, оскільки добре приживається і інтенсивно розмножується на сипучому субстраті-носії - вермикуліті, збагаченому поживними домішками (кукурудзяний екстракт, меляса, глюкоза). Протягом 45 діб

25 зберігання бактеріальний титр препаратів виготовлених на основі штаму АС08 мав тенденцію до збільшення порівняно із препаративними формами на основі штамів 425а і Т17.

Отже, запропонований штам AC08 *Sinorhizobium meliloti* відрізняється від виробничого штаму 425 а генетичними ознаками та фізіолого-біохімічними показниками, є стійким до мінерального азоту, утворює ефективний симбіоз із районованими в умовах Полісся сортами

30 люцерни Ярославна та Зарниця і не поступається за симбіотичними показниками високоактивному базовому штаму T17. Використання запропонованого штаму AC08 для бактеризації районованих сортів люцерни у ґрунтово-кліматичних умовах Західного Поділля збільшує урожай зеленої маси в середньому на 16,9 % (61,6 ц/га) порівняно з варіантом без інокуляції та на 11,3 % (42,6 ц/га) порівняно з виробничим штамом 425а *S. meliloti*. Таким чином, запропонований штам AC08 за основними господарсько-корисними властивостями ефективністю симбіозу, конкурентоздатністю та технологічністю переважає штами 425а і T17 *S. meliloti*.

Для забезпечення формування активного бобово-ризобіального симбіозу
люцерни

5 районованих в Україні сортів Ярославна, Зарниця за дії стресових чинників довкілля (зокрема, підвищеного вмісту мінерального азоту) ефективним буде застосовувати бульбочкові бактерії AC08, які характеризуються стійкістю до впливу екзогенного мінерального азоту і пропонуються як бактеріальна основа для виготовлення бактеріальних добрив під люцерну.

Штам AC08 є екологічно безпечним, має пріоритетне значення за
господарсько-цінними

10 властивостями та рекомендується використовувати для створення високоефективного бобоворизобіального симбіозу *Medicago sativa*-*Rhizobium*. Раціональне використання властивостей природних бульбочкових бактерій *S. meliloti*, зокрема, AC08, у перспективі, без сумніву, є важливим елементом біологізації землеробства і створення адаптивно-інтенсивної стратегії розвитку луківництва в Україні.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Штам бактерій *Sinorhizobium meliloti* ІМВ В-7411 для одержання бактеріального добрива під люцерну.
