

Центральноукраїнський національний технічний університет
Агротехнічний факультет
Кафедра екології, охорони навколишнього середовища
та здорового способу життя

“Допущено до захисту”
Зав. кафедрою ЕОНС та ЗСЖ
к.б.н., доцент
_____ Ольга МЕДВЕДСВА
“ ____ ” _____ 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
за другим (магістерським) рівнем вищої освіти
на тему
“ Екологічне обґрунтування ефективності
використання мікроорганізмів при виробництві
біопрепаратів”

Виконав здобувач вищої освіти
II курсу, групи ЕО-23 М
ОПП «Екологія»
спеціальності 101 «Екологія»
_____ Дяків А.М.
« ____ » _____ 2024 р.

Керівник роботи
к.б.н., доцент
_____ Ольга МЕДВЕДСВА
« ____ » _____ 2024 р.

Рецензент _____ Микола КОВАЛЬОВ
« ____ » _____ 2024 р.

Центральноукраїнський національний технічний університет

Факультет АТ

Кафедра ЕОНС та ЗСЖ

Рівень вищої освіти магістр

Галузь знань 10 – Природничі науки

Спеціальність 101 - екологія

Освітньо-професійна програма: Екологія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Зав. кафедрою ЕОНС та ЗСЖ

к.б.н., доцент

Ольга МЕДВЕДЄВА

“ ” 2024 р.

**ЗАВДАННЯ НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗА
ДРУГИМ (МАГІСТЕРСЬКИМ) РІВНЕМ ВИЩОЇ
ОСВІТИ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ**

Дяків Аліни Миколаївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи

Екологічне обґрунтування ефективності використання мікроорганізмів при виробництві біопрепаратів

2. Керівник роботи

Медведєва О.В., кандидат біологічних наук, доцент

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

затверджений наказом ЦНТУ “ 27 ” вересня 2024 року № 68 - 13

3. Строк подання роботи до захисту _____

4. Мета та завдання кваліфікаційної роботи

Полягає в обґрунтування екологічної доцільності використання мікроорганізмів у виробництві біопрепаратів, оцінка їх впливу на довкілля та визначення перспектив їх впровадження.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі завдання:

- Вивчення біологічних властивостей бактерій *Paenibacillus* штами 560 та 574

- Розробка оптимальних умов культивування бактерій;

- Порівняння ефективності біопрепаратів на основі штамів 574 та 560 з іншими доступними біопрепаратами;

- Розробка рекомендацій ефективності утилізації вуглеводів клітковини однорічних і багаторічних рослин бактеріями на основі штамів 574 та 560.

3. Консультанти по роботі, із зазначенням розділів роботи

| Розділ | Консультант | Підпис, дата | |
|----------------------|-----------------------|----------------|------------------|
| | | Завдання видав | Завдання прийняв |
| Технологічна частина | Доцент Медведєва О.В. | | |
| Охорона праці | Доцент Лузан П.Г. | | |

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

| № П/П | Строк виконання етапів роботи | Назва етапів кваліфікаційної роботи |
|-----------|-------------------------------|---|
| Перший | 14.10.2024 року | Розділ 1.Огляд літератури, |
| Другий | 21.10.2024 року | Розділ 2. Технології переробки ПЕТ відходів Розділ 3.Методика досліджень |
| Третій | 15.11.2024 року | Розділ 4. Результати досліджень |
| Четвертий | 21.11.2024 року | Розділ 5. Охорона праці |
| П'ятий | 27.11.2024 року | Висновки, список літератури, вступ. |

Дата видачі завдання « ____ » _____ 2024 р.

Підпис керівника

_____ Медведєва О.В.
(прізвище та ініціали)

Завдання прийнято до виконання « ____ » _____ 2024р.

Підпис здобувача

_____ Дяків А. М.
(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

На тему: «Екологічне обґрунтування ефективності використання мікроорганізмів при виробництві біопрепаратів».

Кваліфікаційна робота магістра виконана на 72 сторінках, включає 7 таблиць, 21 рисунок, 68 літературних джерел.

Об'єкт дослідження: біологічні процеси за участю мікроорганізмів у виробництві біопрепаратів.

Предмет дослідження: екологічна ефективність застосування мікроорганізмів для створення біопрепаратів.

Мета кваліфікаційної роботи: обґрунтування екологічної доцільності використання мікроорганізмів у виробництві біопрепаратів, оцінка їх впливу на довкілля та визначення перспектив їх впровадження.

Результати та їх новизна: у роботі проаналізовано екологічні переваги використання мікроорганізмів у виробництві біопрепаратів, включаючи біоферментативні процеси, мікробні добрива, біопестициди та біодеградатори. Отримано експериментальні дані щодо ефективності окремих штамів мікроорганізмів у порівнянні з традиційними хімічними аналогами. Новизна роботи полягає у комплексному підході до оцінки екологічної доцільності, що включає не лише біологічну активність, але й вплив на ґрунтову мікрофлору, біорізноманіття та відновлення природних екосистем.

Основні наукові та практичні результати:

1. Визначено оптимальні параметри вирощування мікроорганізмів для отримання високоякісних біопрепаратів.
2. Розроблено рекомендації щодо інтеграції біопрепаратів у сільськогосподарське виробництво.

Значення роботи: дослідження сприяє розвитку екологічно безпечних технологій, які знижують негативний вплив хімічних препаратів на екосистеми.

Висновки: застосування мікроорганізмів у біопрепаратах забезпечує екологічну сталість і сприяє оптимізації сільськогосподарських процесів.

Ключові слова: мікроорганізми, біопрепарати, екологія, сталий розвиток, мікробіологія, біоінженерія.

Перелік умовних позначень

PGPR – Plant Growth-Promoting Rhizobacteria,
АТФ – аденозинтрифосфат,
АЦК-деаміназа – 1-аміноциклопропан-1-карбоксилат деаміназа
ФПЯ – ферментовані пальмові ядра,
КОС – ксиланаза ксилоолігосахариди,
ТФФ – твердофазна ферментація,
РФФ – рідкофазна ферментація,
ПХК – порошок хорди кальмару,
РВ – редукуючі речовини,
ДНСК - 3,5-динітросаліцилова кислота,
РФА - рентгенофлуоресцентний аналіз,
КР - культуральна рідина,
ЕПС – екзополісахарид,
ІОК – індолілоцтова кислота,
ГРХ – газорідинна хроматографія,
OFAT – one factor at a time,
КУО – колонієутворюючі одиниці,
Na-КМЦ – натрій карбоксиметилцелюлоза,
АСВ – абсолютна суха речовина.

ЗМІСТ

| | Стої |
|---|------|
| Реферат | 4 |
| Перелік умовних позначень | 5 |
| Вступ | 8 |
| РОЗДІЛ 1. ОСНОВНІ МЕХАНІЗМИ ПОЗИТИВНОГО ВПЛИВУ РИЗОСФЕРНИХ БАКТЕРІЙ НА РОСЛИНИ. | 11 |
| 1.1. Загальні відомості про ризобактерії | 11 |
| 1.2. Стимуляція росту рослин за допомогою мікроорганізмів | 11 |
| 1.3. Біоконверсія вторинних ресурсів переробки рослинної сировини | 13 |
| 1.4. Вплив умов культивування на ріст та продукування метаболітів ризобактерій роду <i>Raenibacillus</i> | 15 |
| РОЗДІЛ 2 ХАРАКТЕРИСТИКА ТОВ «ЕМ УКРАЇНА» | 20 |
| 2.1. Технологія отримання біопрепаратів на основі штаму <i>P. mucilaginosus 574</i> та <i>P. mucilaginosus 560</i> | 20 |
| 2.2. Опис технологічного процесу | 22 |
| РОЗДІЛ 3. МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ | 26 |
| 3.1. Приготування поживних середовищ для культивування бактерій | 26 |
| 3.2. Визначення вмісту редуруючих речовин у поживному середовищі та концентраті біопрепарату | 27 |
| РОЗДІЛ 4. ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ БАКТЕРІЙ <i>P. MUCILAGINOSUS</i> НА ПОЖИВНОМУ СЕРЕДОВИЩІ, ПРИГОТУВАНОЇ НА ОСНОВІ МЕЛЯСИ | 28 |
| 4.1. Вибір ефективного продуцента біомаси та ЕПС при культивуванні на живильному середовищі з мелясою | 28 |
| 4.2. Дослідження біотехнологічної активності штаму <i>P. mucilaginosus 574</i> при культивуванні на живильному середовищі з мелясою | 30 |
| 4.3. Вплив вмісту меляси в живильному середовищі на синтез біомаси та ЕПС штаму <i>P. mucilaginosus 574</i> | 32 |

| | | |
|--------------------------------|--|-----------|
| 4.4. | Вплив температури культивування та рН живильного середовища на синтез біомаси та ЕПС штамом <i>P. mucilaginosus</i> 574 | 34 |
| 4.5. | Вплив джерела та вмісту азоту на синтез біомаси та ЕПС штамом <i>P. mucilaginosus</i> 574 | 35 |
| 4.6. | Вплив віку та дози інокуляту на синтез біомаси та ЕПС штамом <i>P. mucilaginosus</i> 574 | 37 |
| 4.7. | Вплив аерації на синтез біомаси та ЕПС штамом <i>P. mucilaginosus</i> 574 | 39 |
| 4.8. | Оцінка ефективності утилізації вуглеводів клітковини однорічних і багаторічних рослин бактеріями <i>P. mucilaginosus</i> і <i>P. salinicaeni</i> | 40 |
| 4.9. | Культивування бактерій <i>P. mucilaginosus</i> і <i>P. salinicaeni</i> на живильному середовищі з ферментолізат клітковини рисового лушпиння | 46 |
| РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ | | 52 |
| 5.1. | Аналіз небезпечних і шкідливих виробничих факторів, які можуть виникнути при виробництві біопрепаратів з використанням мікроорганізмів | 52 |
| 5.2. | Розробка заходів по запобіганню дії небезпечних та шкідливих виробничих факторів і покращенню умов праці | 54 |
| 5.2.1. | Заходи запропоновані для усунення небезпечних та шкідливих виробничих факторів | 54 |
| 5.2.2. | Вибір і обґрунтування засобів індивідуального захисту | 56 |
| 5.2.3. | Розробка інструкції з охорони праці | 59 |
| 5.3. | Розробка заходів з пожежної профілактики | 61 |
| | ВИСНОВКИ | 64 |
| | СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ | 66 |

ВСТУП

Актуальність теми. Однією з основних тенденцій сучасної екологічно безпечної технології є застосування біологічно активних речовин, що синтезуються мікроорганізмами. Вони сприяють росту, розвитку рослин та тварин, а також покращенню їх фізіологічного стану. Біопрепарати на основі мікроорганізмів мають широкі спектри дії, що дозволяє застосовувати їх як регулятор росту рослин, біофунгіциду, імуномодулятора та біодобрива. Мікроорганізми можуть використовуватись для отримання протимікробних препаратів медичного та ветеринарного призначення.

Світове зростання обсягу виробництва мікробіологічних добрив зумовлене частковою заміною в агротехнології мінеральних добрив, з яких азот, фосфор та калій ефективно не засвоюються рослинами, що призводить до засолення ґрунту. Вітчизняний ринок біопрепаратів та добрив інтенсивно зростає до 30% на рік. В Україні зареєстровано більше 700 видів біологічних препаратів, які виготовлені на основі *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Rhizobium sp.*, *Azotobacte sp.*, *Trichoderma sp.* та ін. Однак збільшення споживання органічної продукції, такої як молоко, м'ясо, овочі та інші харчові продукти, викликає необхідність розширення асортименту біопрепаратів із задовольняючими споживчими властивостями для організації органічного сільського господарства. У зв'язку з цим необхідний пошук нових видів та штамів мікроорганізмів з господарськими цінними ознаками, такими як потужна ферментативна система, фунгіцидна активність та стимулюючі ріст та розвиток рослин фосфат-мобілізуюча та азотфіксуюча здібності та подальше їх впровадження у технологію захисту агроценозів від несприятливих факторів середовища. Це є перспективним напрямом, пов'язаним з екологізацією рослинництва та тваринництва [1].

Метою роботи обґрунтування екологічної доцільності використання мікроорганізмів у виробництві біопрепаратів, оцінка їх впливу на довкілля та визначення перспектив їх впровадження.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі завдання:

1. Вивчення біологічних властивостей бактерій *Paenibacillus* штами 560 та 574
2. Розробка оптимальних умов культивування бактерій;
3. Порівняння ефективності біопрепаратів на основі штамів 574 та 560 з іншими доступними біопрепаратами;
4. Розробка рекомендацій ефективності утилізації вуглеводів клітковини однорічних і багаторічних рослин бактеріями на основі штамів 574 та 560.

Об'єкт дослідження – біологічні процеси за участю мікроорганізмів у виробництві біопрепаратів.

Предмет дослідження – екологічна ефективність застосування мікроорганізмів для створення біопрепаратів.

Методи дослідження. Культивування бактерій *Paenibacillus* штамів 560 та 574 проводили прийнятими в біотехнології та мікробіології методами. У роботі використано фізико-хімічні методи аналізу, у тому числі фотоелектроколориметрію, спектрофотометрію. Статистичну обробку експериментальних даних проводили з використанням програм Microsoft Excel, Prism і Statistica 6.0.

Інформаційною базою роботи є законодавчі та інші нормативно-правові акти України з питань охорони навколишнього середовища, матеріали науково-практичних конференцій з проблем екологічної політики та захисту довкілля, матеріали державних органів статистики, сільськогосподарських та промислових підприємств і установ Кіровоградської області, а також власні дослідження та спостереження.

Наукова новизна. За результатами проведеного скринінгу властивостей та підбору умов культивування на живильних середовищах з мелясою та мелясою показано, що штам *Paenibacillus* 574 має найбільшу здатність азотфіксації, максимальне накопичення індолілоцтової кислоти, максимальний вихід біомаси та екзополісахаридів. Встановлено, що цей штам ефективно культивується на живильному середовищі з мелясою без додаткового джерела солей та азоту. В результаті підбору умов культивування

на живильному середовищі, що містить мелясу, штам *Paenibacillus 574* здатний асимілювати 96% вуглеводів меляси, синтезувати до 9,6 г/л екзополісахаридів при вмісті в культуральній рідині 6×10^8 КУО/мл. Показано виживання продуцента в отриманому продукті після сушіння та при зберіганні протягом 3 місяців не менше $10^7 \times$ КУО/г.

Особистий внесок здобувача в наукові дослідження. Викладені в роботі результати отримано автором самостійно. Щодо розглянутих в магістерській роботі задач, котрі розв'язані в працях, спільних з науковим керівником, Медведєвою О.В., їй належить постановка проблеми досліджень і загальне керівництво роботою.

Наукова і практична значимість. Обґрунтовано умови для культивування штаму *Paenibacillus 574* на поживному середовищі, що містить мелясу, для отримання високого виходу біомаси та екзополісахаридів.

Запропоновано технологічний процес отримання біодобрива на основі відходів цукрового виробництва, у тому числі меляси та дефекату з мінімальною втратою кількості життєздатних клітин штаму *574 Paenibacillus* в отриманому сухому препараті.

Апробація результатів дослідження Основні положення випускної роботи доповідалися на міжнародній конференції: матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні технології агропромислового виробництва» (м. Кропивницький, 14-15 листопада 2024 р).

Публікації. Результати проведених досліджень в даній магістерській роботі опубліковані у вигляді тез доповідей: Ольга Медведєва, Аліна Дяків. Екологічна оцінка ефективності використання бактерій роду *Paenibacillus* при виробництві біопрепаратів: матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні технології агропромислового виробництва» (м. Кропивницький, 14-15 листопада 2024 р), ЦНТУ, 2024 С. 35-36 [3].

РОЗДІЛ 1

ОСНОВНІ МЕХАНІЗМИ ПОЗИТИВНОГО ВПЛИВУ РИЗОСФЕРНИХ БАКТЕРІЙ НА РОСЛИНИ (Огляд літератури)

1.1. Загальні відомості про ризобактерії

Ризобактерії (*Rhizobacteria*) є важливими мікроорганізмами, які живуть у ризосфері – зоні навколо коренів рослин. Вони належать до PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) – бактерій, які сприяють росту рослин через різні механізми. Ці мікроорганізми відіграють важливу роль у сільському господарстві завдяки своїй здатності покращувати живлення рослин, захищати їх від патогенів і сприяти стійкості до абіотичних стресів.

PGPR використовуються для фіксації атмосферного азоту, розчинення фосфатів та мобілізації інших важливих поживних речовин, таких як калій і залізо. Вони також можуть виробляти фітогормони (ауксини, цитокініни), які стимулюють ріст кореневої системи, а також антимікробні сполуки, що запобігають розвитку хвороб [4].

Деякі PGPR, такі як *Pseudomonas* і *Bacillus*, мають здатність індукувати системну стійкість рослин до стресів, включаючи посуху та солоність ґрунту [5]. Крім того, ризобактерії відіграють ключову роль у зменшенні залежності від хімічних добрив, що сприяє сталому розвитку сільського господарства [6].

Таким чином, ризобактерії є перспективним інструментом для зменшення екологічного навантаження та підвищення ефективності виробництва сільськогосподарських культур. Вивчення їх механізмів дії є важливим напрямом досліджень, який сприяє розвитку біотехнологій.

1.2. Стимуляція росту рослин за допомогою мікроорганізмів

Біоконтроль є екологічно чистим підходом до застосування мікроорганізмів для боротьби з хворобами рослин. Біоконтроль росту рослин ґрунтується на колонізації коренів рослин ризобактеріями, конкуренції за

поживні речовини, синтез антибіотиків та літичних ферментів, індукцію системної резистентності проти патогенів [7].

Колонізація кореневої системи та/або конкуренція за поживні речовини PGPR відіграють важливу роль у ризосфері та визначають ефективність біоконтролю. Доведено [8], що бактерії *B. megaterium* здатні колонізувати коріння, так і регулювати життєдіяльність патогенного гриба *Rhizoctonia solani*.

Більше того, синтез антибіотиків та літичних ферментів ризобактеріями є основним механізмом придушення патогенів та опосередковано стимулює зростання рослин. Виявлено здатність синтезу протигрибкових метаболітів, у тому числі, антибіотиків ряду феназинів, піролітринів, 2,4-діацетилфлороглюцинолів, піолетеоринів, віскозинамідів та тензинів багатьма ризобактеріями [9], а також можливість синтезу літичних ферментів, таких як β -1,3-глюканазу, протеазу та ліпазу, які викликають лізис клітинної стінки фітопатогенних грибів. Зокрема, хітіназа вважається важливим ферментом придушення фітопатогенних грибів, наприклад, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum f.sp. cucumerinum* та *Phytophthora* [10]. Фермент β -глюканазу дозволяє зруйнувати клітинні стінки грибів роду *Rhizoctonia solani* та роду *Pythium ultimum*. У рослині існують природні захисні системи проти фітопатогенів, які підвищують стійкість рослин до грибної, бактеріальної та вірусної інфекції. [11]. Системна набута стійкість та системна індукована стійкість є двома відомими захисними механізмами у рослині. При цьому системна хронічна стійкість виникає, коли рослини активують свій захисний механізм у відповідь на первинне зараження патогеном [12].

Системна набута стійкість супроводжується збільшенням концентрації саліцилової кислоти та накопиченням білків, пов'язаних із патогенезом білків (PR-білка), які пригнічують патогени та захищають рослини. Системна індукована стійкість може бути викликана непатогенними мікроорганізмами в ризосфері і не заснована на передачі сигналів шляхом синтезу саліцилової кислоти або PR-білка, проте механізм системної індукованої стійкості включає

передачу сигналів фітогормону - жасмонату і етилену всередині рослини [13]. Крім жасмонату і етилену як сигнали включаються й інші бактеріальні молекули, такі як О-антиген, що є бічний полісахаридним ланцюгом ліпополісахаридів зовнішньої мембрани, леткі органічні сполуки, наприклад, бутандиол і ацетоїн, що вивільняються при анаэпопетида - поверхнево-активні речовини [14].

1.3. Біоконверсія вторинних ресурсів переробки рослинної сировини

Використання вторинних ресурсів переробки рослинної сировини як дешеве джерело вуглецю (целюлози та геміцелюлози) дозволить організувати економічно ефективно виробництво корисних біопрепаратів: ферментів з високою активністю, білків, амінокислот, органічних кислот та ін., які широко застосовуються у різних галузях промисловості.

Під впливом мультиферментативного комплексу целюлаз відбувається перетворення целюлози на глюкозу. До комплексу ферментів для деполімеризації структури целюлози включають ендоглюканазу, екзоглюканазу, целобіазу. Ендоглюканаза гідролізує внутрішні β -1,4-глюкозидні зв'язки, віддалені від кінців полімерного ланцюга целюлози, що знаходяться в її аморфних ділянках, що призводить до зниження ступеня полімеризації та гідролітичної деструкції целюлози, утворюючи короткі волокна целюлози та целолігосу. Екзоглюканаза відщеплює целобіозу з кінця целоолігосахариду. Целобіаза або β -глюкозидаза гідролізує целобіозу з утворенням двох молекул глюкози, тим самим завершуючи деполімеризацію целюлози [15].

Найбільш вивченими продуцентами целюлази є бактерії *Cellvibrio (Pseudomonas) fulvus*, *Pseudomonas fluorescence* [16]; базидіоміцети, *Coniophora cerebella* та *Sporotrichium pulverulentum*; аскоміцети,

дейтеромицети *Trichoderma viride* *T. koningii*, [17], *Penicillium funiculosum* [18] та *Fusarium solani* [19].

Конверсія геміцелюлози в цукри, що зброджуються, здійснюється геміцелюлазами з різними каталітичними функціями. До них відносяться ендоксилази, екзооксилази та β -ксилозидази поряд з естеразами з виділенням ацетилу та ферулових кислотних груп. Ці ферменти демонструють значний синергізм між собою, а також з іншими ферментами, що деградують, лігноцелюлози [20]. Деякі мікроорганізми, що мають целюлітичну активність, також здатні розкласти геміцелюлозу.

Відомо, що штами *Trichoderma* і *Penicillium* мають високу геміцелюлолітичну активність. Крім того було показано, що *Aspergillus spp.* також є продуцентом ферментів, що руйнують геміцелюлозу. Під дією ксиланази ксилоолігосахариди (КОС) утворюються з ксилану і цим можна розширити перелік цінних продуктів, які отримують біоконверсією геміцелюлоз. Найбільш популярне застосування ксилоолігосахаридів як дієтичні та функціональні продукти харчування, оскільки вони діють як пребіотики, які стимулюють ріст та/або активність одних або кількох бактерій у товстій кишці (*Bifidobacterium* та *Lactobacilli*), пригнічуючи активність ентерогнилостних та патогенних організмів, а також полегшують поглинання поживних речовин. Крім пребіотиків та наповнювачів, КОС використовуються в косметиці як стабілізатори, імуностимулятори та антиоксиданти та у фармацевтичних препаратах. Передбачається, що ефективне вилучення та перетворення геміцелюлозних цукрів є важливою передумовою для розробки економічно доцільної технології біоконверсії біомаси [21].

Лігнін може бути деполімеризований до мономерів, які можуть використовуватися як попередники широкого асортименту продукції, включаючи паливо. Лігнін може бути виділений з біомаси ферментами мікробіологічного походження, які перетворюють лігнін на різні хімічні речовини. Попередньо добре оброблена хімічними методами лігноцелюлоза

деградується ферментами, що виділяються багатьма видами бактерій [22], що призводить до біоконверсії цього гетерогенного біополімеру в простіші ароматичні сполуки, такі як фенол і вуглеводні, наприклад, циклогексан.

Утилізація лігніну в цінніші продукти ще перебуває у зародковому стані через його складної структури. Спалювання лігніну є неефективним джерелом енергії та неекологічним методом для навколишнього середовища. Лігнін є найпоширенішим джерелом вуглецю, доступним у природі, і, отже, підвищення його цінності є необхідним для покращення економіки конверсії біомаси. Лігнін використовується у виробництві клеїв для деревини, ваніліну, коричної кислоти, підсолоджувачів та попередників синтезу фармацевтичних препаратів. Досягнення в методах переробки лігніну як джерела цінних продуктів повинні активно просуватися з урахуванням економічної доцільності [23].

1.4. Вплив умов культивування на ріст та продукування метаболітів ризобактерій роду *Paenibacillus*

Мікробні метаболіти – це низькомолекулярні сполуки (молекулярна маса менше 1000 дальтонів), що утворюються в результаті обміну речовин в організмі. У процесі нормальної життєдіяльності бактерії синтезують речовини, необхідні зростання мікроорганізмів, звані первинними метаболітами. До них відносяться амінокислоти, органічні кислоти, нуклеотиди, вітаміни, ферменти та ін. На відміну від первинних метаболітів вторинні метаболіти не потрібні для нормального зростання та розвитку продуцента [24].

Вони відіграють важливу роль у покращенні поглинання доступних поживних речовин у клітини або захисту продуцента від несприятливих факторів [25]. Серед найважливіших для промисловості вторинних метаболітів ризобактерій можна назвати антибіотики, фітогормони тощо.

На продукування метаболітів впливає умова культивування продуцентів. Залежно та умовами довкілля утворюються різні продукти різними метаболічним шляхами [26].

До факторів навколишнього середовища, що впливають на продукування метаболітів мікроорганізмами, відносяться джерела вуглецю та азоту, їх концентрація, макро-, мікроелементи, температура, рН середовища, якість та кількість посівного матеріалу та ін. [27]. Для ефективності росту та розвитку, а також максимального синтезу метаболітів необхідно оптимізувати параметри культивування продуцентів і важливо, щоб ці параметри довкілля залишалися стабільними [28].

Вуглеводи є найважливішою поживною речовиною та джерелом енергії для зростання клітин. У цьому синтез вторинних метаболітів під час використання різних джерел вуглецю йде різними шляхами [29]. При надлишку вуглеводів у середовищі або за несприятливих умов для зростання продуцента відбувається синтез мікробних полісахаридів, які є вторинними метаболітами. Синтез ЕПС бактеріями роду *Paenibacillus* починається з логарифмічної фази та досягає максимуму в пізню стаціонарну фазу зростання бактерій [30].

Найчастіше використовуваними джерелами вуглецю для синтезу ЕПС є цукри, зокрема глюкоза і сахароза [31]. Виділення левансукази разом з β -фруктофуранозидазами та інулосуказою з високою активністю більшості штамів *P. polymyxa* для гідролізу сахарози, здатне забезпечити отримання високого виходу ЕПС [32]. Проте, висока вартість цих джерел вуглецю має прямий вплив на собівартість продукції, що обмежує ринковий потенціал цих біополімерів. Тому в промислових умовах зниження витрат на виробництво ЕПС замість цих дорогих субстратів пропонували використовувати відходи чи побічні продукти різних галузей [33].

Показано перспективне використання вторинних ресурсів, у тому числі, порошок хорди кальмару (ПХК) як єдиного джерела вуглецю та азоту для продукування ЕПС та антиоксидантів штамом *Paenibacillus sp.* TKU023.

отримання високої продуктивності ЕПС (4,55 г/л). Крім того, проведення культивування в колбах з перегородками показав, що після чотирьох днів культивування культуральна рідина містить високу концентрацію фенолу з високою антиоксидантною активністю [34].

Побічний продукт цукрового виробництва – меляса – є одним з найбільш доступних, ефективних вуглеводних субстратів в Росії. ефективним субстратом для синтезу ЕПС бактеріями *P. ehimensis* 739 [35], *P. mucilaginosus* PM13 [36] та *P. mucilaginosus* (раніше *mucilaginosus*) ВКМ та 1446Д [37] Дослідження [38] показало, що при вмісті в живильному середовищі 16% меляси максимальний вихід 83 г/л, що у 1,6 разу більше в порівнянні з виходом на живильному середовищі, приготованому на основі сахарози (1,82 г ЕПС/л).

Мелясу бурякового жому також рекомендується використовувати в живильних середовищах у концентрації 2% при культивуванні штаму *P. chitinolyticus* SKS1 для синтезу β -амілази. Вказується на доцільність використання як джерела цукрів бурякового жому, який попередньо обробляють гідроксидом натрію [39]. Переробка бурякового жому лугом дозволяє зруйнувати кристалічну структуру клітковини, розчинити лігнін і подальшим промиванням водою розділити клітковину і лігнін, що забезпечує ефективність ферментативного гідролізу клітковини мікроорганізмами [40]. Максимальна активність β -амілази може досягати 2,24 од./мл при внесенні 3 % бурякового жому та 10 % інокуляту в середовищі після 83 годин культивування цього продуцента. Виявлено синтез β -амілази

P. amylolyticus шляхом твердої ферментації на живильному середовищі, приготованій на основі пшеничних висівок та *P. polyuxa* NRRL B-367 на сольовому середовищі, приготовленому на основі кукурудзяного крохмалю з внесенням мінеральних добавок [41].

Відзначено вплив температури культивування на зростання та синтез метаболічних продуктів бактерій *Paenibacillus*. Rafigh та співавтори [42] показали, що зі зростанням температури від 30 до 40 °С вихід ЕПС курдлану інтенсивно збільшувався, при подальшому збільшенні температури від 40 до

50 °C вихід ЕПС курдлана злегка підвищувався. Синтез ЕПС курдлана гальмувався при температурі 25 °C або вище 50 °C. Оптимальною температурою синтезу курдлана штамом *Paenibacillus sp. NBR-10* є 35°C [43]. Порівняно зі штамом *Paenibacillus sp. NBR-10*, *P. polymyxa EJS-3* краще синтезує ЕПС за більш низької температури.

Целюлаза краще синтезується при температурі 40°C штамом *Paenibacillus sp.*, виділеним із меляси. Температура 37°C є оптимальною для синтезу ксиланази штамом *P. campinasensis BL11* (11,2 од/мл) [44] та глюкоамілази штамом *P. amylolyticus NEO03* (242,62 од/мл) [45]. Синтез ксиланази зменшувався при зниженні температури культивування цих бактерій до 25°C. Максимальна активність арабінофуранозидози спостерігалася при температурі культивування штаму *P. polymyxa KF-1* 33°C та знижувалася при підвищенні температури до 38 °C [46].

Аерація також відіграє важливу роль у життєдіяльності та продукуванні метаболітів *Paenibacillus spp.* [47]. Встановлено, що із зменшенням обсягу середовища концентрація розчиненого кисню підвищується за постійної швидкості перемішування. У зв'язку з цим рекомендуються в експериментальних умовах при культивуванні штаму *Paenibacillus sp. TKU023* аерацію середовища проводити при співвідношенні обсягу повітря до обсягу середовища 4,0:1,0 [48] та при культивуванні штаму *P. macerans TKU029* – 1,5:1,0 [49].

За умови інтенсивної аерації бактерії *Paenibacillus* швидко ростуть та значно синтезують метаболіти. Багато дослідників стверджують, що перемішування забезпечить поліпшення росту та метаболізму мікроорганізмів за рахунок інтенсифікації масопереносу кисню по відношенню до субстратів та продуктів [50]. Встановлено, що зі збільшенням швидкості перемішування зі 120 до 150 об/хв зростання та синтез ЕПС та інших метаболітів значно покращуються. При перемішуванні зі швидкістю 150 об/хв спостерігався максимальний синтез ЕПС штамми *P. polymyxa ATCC 21830* та *Paenibacillus*

sp. TKU023 а також максимальне продукування целюлази штамом *Raenibacillus sp. CKS1* [51].

При швидкості перемішування нижче 120 об/хв вихід ЕПС штаму *P. polytuxa ATCC 21830* зменшується [52] і при швидкості перемішування нижче 50 об/хв синтез ЕПС штамом *Raenibacillus sp. TKU023* не відбувається, мабуть, це пов'язано з обмеженням перенесення кисню. При швидкості перемішування 180 об/хв і вище відбувається бактеріальна фрагментація, що знижує вихід біомаси та ЕПС курдлану штаму *P. polytuxa ATCC 21830* [53]. Однак деякі штами можуть синтезувати ЕПС при перемішуванні зі швидкістю вище 180 об/хв, наприклад, штам *P. elgii B69* (220 об/хв) [54] та штам *P. polytuxa EJS-3* (200 об/хв) [55].

РОЗДІЛ 2

ХАРАКТЕРИСТИКА ТОВ «ЕМ УКРАЇНА»

ТОВ «ЕМ Україна» є офіційним представником японської організації EMRO (Effective Microorganisms Research Organization) в Україні. Компанія спеціалізується на розробці та виробництві біологічних препаратів на основі ефективних мікроорганізмів, включаючи бактерії родів *Pseudomonas* і *Bacillus*. Їхні препарати використовуються у різних сферах: від підвищення родючості ґрунтів до захисту рослин і відновлення екосистем.

Продукція компанії має екологічно чистий характер, що підтверджується сертифікатом Organic Standard. Технології базуються на ідеї використання консорціумів мікроорганізмів для покращення структури ґрунту, знищення патогенних організмів, підвищення імунітету рослин та стимуляції росту. Основними мікроорганізмами є *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* та інші, які синтезують корисні речовини, включаючи фітогормони, вітаміни та амінокислоти.

Компанія пропонує препарати у вигляді суспензій, що застосовуються для обробки насіння, рослин і ґрунтів. Ці засоби сприяють боротьбі з хворобами, зокрема бактеріозами та грибковими інфекціями, і підвищують врожайність багатьох сільськогосподарських культур

Крім того, ТОВ «ЕМ Україна» активно співпрацює з фермерськими господарствами, надаючи технічний супровід і допомогу у впровадженні біопрепаратів. Інноваційний підхід компанії дозволяє її продукції бути конкурентоспроможною на міжнародному рівні, сприяючи сталому розвитку агросектору України.

2.1. Технологія отримання біопрепаратів на основі штаму *P. mucilagenosus* 574 та *P. mucilagenosus* 560

Мікробіологічне добриво виготовляється в умовах виробничих потужностей ТОВ «ЕМ Україна» с. Соколівське Кропивницького району

Кіровоградської області. Культивування штаму *P. mucilaginosus* 57 проводили за допомогою поживного середовища, що містить мелясу, в рекомендованих умовах: вміст меляси в середовищі 2%, температура $30 \pm 1^\circ \text{C}$, рН 6,0, 0,1% кукурудзного екстракту як індуктора синтезу ЕПС, внесення 5% інокуляту від обсягу середовища після 24 год інокуляції, співвідношення обсягу повітря до обсягу середовища 4:1. Культивування здійснювалося в посудинах ємністю 2 л при безперервному перемішуванні зі швидкістю 150 об/хв на шейкері інкубатора IST-3075R (виробник Jeiotech, Korea). Протягом 72 год культивування в цих умовах титр штаму досягає $6 \cdot 10^8$ КЕЕ/мл, концентрація, синтезованих ЕПС досягає $9,0 \pm 0,5$ г/л при в'язкості біопрепарату 53 мПа.

Далі проводять іммобілізацію бактеріальної суспензії на стерильному носії при співвідношенні рідина : носій відповідно 3:4. В якості носія використовували дефекат – відходи цукробурякового виробництва, що отримується при очищенні бурякового соку. Дефекат містить 60 – 80% CaCO_3 , 0,4 - 0,8% азоту, 0,1 - 2,0% фосфору і калію і рекомендується до використання в сільському господарстві в якості добрива [52]. Для знищення постійних мікроорганізмів дефекат необхідно стерилізувати при температурі $200 \pm 1^\circ \text{C}$ протягом 12 год.

Після нанесення поживного середовища в дефекат проводиться термостатування в м'яких умовах при температурі $60 \pm 1^\circ \text{C}$ до вологості продукту 5%. Отримані біопрепарати в подальшому зберігаються за кімнатної температури. Для оцінки ступеня впливу пошкоджених факторів на мікроорганізми при висушуванні та природному зберіганні визначають виживання бактерій маточному препараті. Для цього в біологічних препаратах основи після висушування та зберігання визначали число КОЕ (див. табл. 2.1).

Встановлено, що кількість життєздатних клітин штаму *P. mucilaginosus* 574 в отриманому препараті після транспортування знижувалася більш, ніж 2 % у порівнянні з кількістю життєздатних клітин K1008/108. При цьому титр бактерії в продукті становив не менше 10^7 КУО/р.

Таблиця 2.1 – Зміна рН і титру бактерій при зберіганні маточного концентрату на основі штаму *P. mucilaginosus 574*, іммобілізованого на дефекаці

| Строк зберігання | рН | Титр бактерій, КУО/г |
|-----------------------|------|----------------------|
| Після транспортування | 6,70 | $5 \cdot 10^7$ |
| 1 місяць | 6,67 | $3 \cdot 10^7$ |
| 2 місяця | 6,60 | $2 \cdot 10^7$ |
| 3 місяця | 6,45 | $1,5 \cdot 10^7$ |

Періодичний контроль життєздатності досліджуваного штаму при зберіганні показав стабільність показника клітин штаму *P. mucilaginosus 574*, іммобілізованих на дефекаці (КУО/г) після 3 місяців зберігання. Значення рН трохи знижувалася і знаходилося в межах 4,5-5,7.

При культивуванні штаму *B. subtilis Ч-13* технологи підприємства отримували робочий концентрат із вмістом $6 \cdot 10^8$ КУО/мл бактеріальних клітин, при цьому в препараті титр клітин знижувався до 10^6 КУО/мл. При нанесенні культуральної рідкості на носій (дефекаці) і подальшому висушуванні препарату титр клітин штаму *B. subtilis Ч-13* знижувався більш ніж 100 разів у порівнянні з титром у культуральній рідкості. Як показано вище, життєздатність клітин штаму *P. mucilaginosus 574* при їх іммобілізації на дефекаці набагато вище, ніж життєздатність клітин штаму *B. subtilis Ч-13* на такому ж носії.

Висока якість розробленого біопрепарату можна пояснити тим, що штам *P. mucilaginosus 574* на відміну від бактерій *B. subtilis Ч-13* ефективно синтезує ЕПС, які виконують, більш високу збереженість бактерій на поверхні носія.

2.2. Опис технологічного процесу.

З центрального збірника 1 мелясу носом 2.1 направляється в змішувач 3, в якому розбавляється гарячою водою (90 °С), витримується 30 хв і подається на кларифікатор 4, де звільняється від механічних домішок. Освітлене сушло змішується з мінеральними солями в реакторі 5 і нагрівається до 120 ± 1 °С в

пластинчастому теплообміннику 6. Після витримки в збірнику 7 подається в охолоджувач 8 і далі направляється в інокулятор 9 і ферментатор 12.

Освітлення і стерилізація здійснюються в безперервному режимі. Посівний матеріал, вирощений в інокуляторі 9, подається для засіву поживного середовища в ферментатор 12. Для аерування культури в інокуляторі і ферментаторі повітря проходить підготовку і очищення у фільтрі 10 через індивідуальні фільтри 11, встановлені в інокуляторі та у кожного ферментатора. У ферментаторі 12 культивують штам *P. mucilaginosus* 57 при температурі 30 ± 1 °С протягом 72 год (див. рис. 2.1).

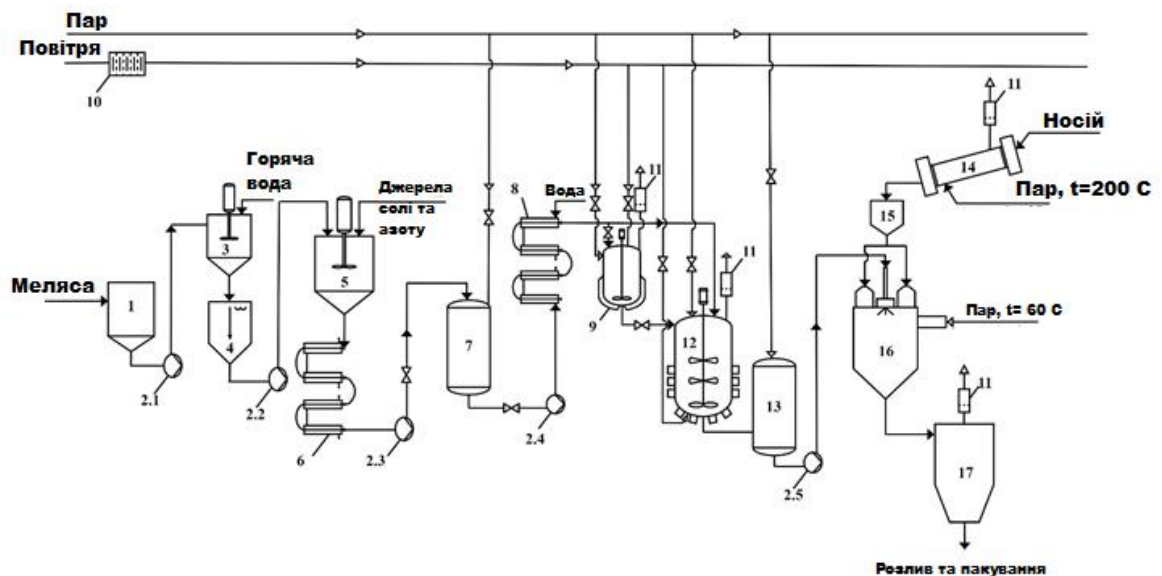


Рис. 2.1 – Принципова технологічна схема виробництва біопрепаратів на основі штаму *P. mucilaginosus* 574: 1 - збірник для меляси, 2.1-2.5 - насоси, 3 - змішувач, 4 – кларифікатор приготування поживного середовища, 6 - стерилізатор, 7 і 13 - збірники, 8 - охолоджувач для поживного середовища, 9 - інокулятор, 10 - фільтр для очищення і стерилізації повітря, 11 - фільтри для очистки ферментаторів, 14 - барабанна сушарка, 15 - охолоджувач для носія, 16 - сушарка для біопрепаратів, 17 - циклонний апарат.

Для повної інактивації мікроорганізмів проводять стерилізацію дефекату в барабанній сушарці 14 при температурі 200 ± 1 °С протягом 1 год, далі дефекат охолоджують в апараті 15. Після цього культура рідини, що

містить бактерії, отримана після основної ферментації в ферментаторі 12. Сушіння біопрепарату проводиться в розпилювальній сушарці при температурі $60 \pm 1^\circ\text{C}$ гарячим повітрям. Для подачі суспензії в сушарку застосовуються мембранні насоси високого тиску з безступінчастим регулюванням тиску. Готовий продукт осідає в циклонному апараті 13 і направляється на упаковку.

Технологічна схема виробництва біопрепаратів на основі штаму *P. mucilaginosus 560*, згідно з якою передбачено отримання ферменталізму клітковини рисового лушпиння як джерело вуглецю для приготування живильного середовища. З ємності 1 рисове лушпиння норією подають на ваги 2 і далі в хімічний реактор 4 для обробки лушпиння розчином лугу з концентрацією 2,5%, яку готують в ємності 3 Після обробки лушпиння лугом що утворилася клітковину рисового лушпиння промивають на барабанному фільтрі 6. Лужний розчин (луг) направляють в збірник 7. Луг містить діоксид кремнію і може бути використаний для отримання аморфного або кристалічного діоксиду кремнію. Клітковину після промивання до нейтральної реакції направляють в біореактор 8, в якому клітковина обробляється ферментним препаратом Accellerase 1500 при рН 5,0 – 5,5 протягом 24 год при температурі 55 ± 1 Ферментолізат і шрот клітковини поділяють центрифугуванням на центрифuzі 9. У отриманий ферментолізат вносять мінеральні солі в ємності 10, надалі стерилізують в апараті 11. Далі акумулюють в ємності 12, інокулятор 16 і ферментер 17. Посівний матеріал, вирощений в інокуляторі 16, подається для засіву живильного середовища в ферментер 17. Для аерування культури в інокуляторі і ферментері повітря проходить під надмірне повітря, що містить мікроорганізми, очищається на індивідуальних фільтрах 15, встановлених на інокуляторі і ферментері. У ферментері 17 культивується штаму *P. mucilaginosus 560* за температури $30 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 72 год. Для отримання кормової добавки в якості носія використовується шрот клітковини рисового лушпиння. далі охолоджується в апараті 19. Потім стерильний шрот клітковини рисового лушпиння змішується

з культуральною рідкістю, що містить спори і ферменти, синтезовані штамом *P. tucilaginosus* 560, що подається на фермент 2. сушіння використовується гарячий повітря з температурою 60 ± 1 ° С. Для подачі суспензії в сушарку застосовуються мембранні носи високого тиску з безступінчастою регулюванням тиску Готовий продукт відокремлюється в циклоні 21 та спрямовується на подальше пакування (див. рис. 2.2).

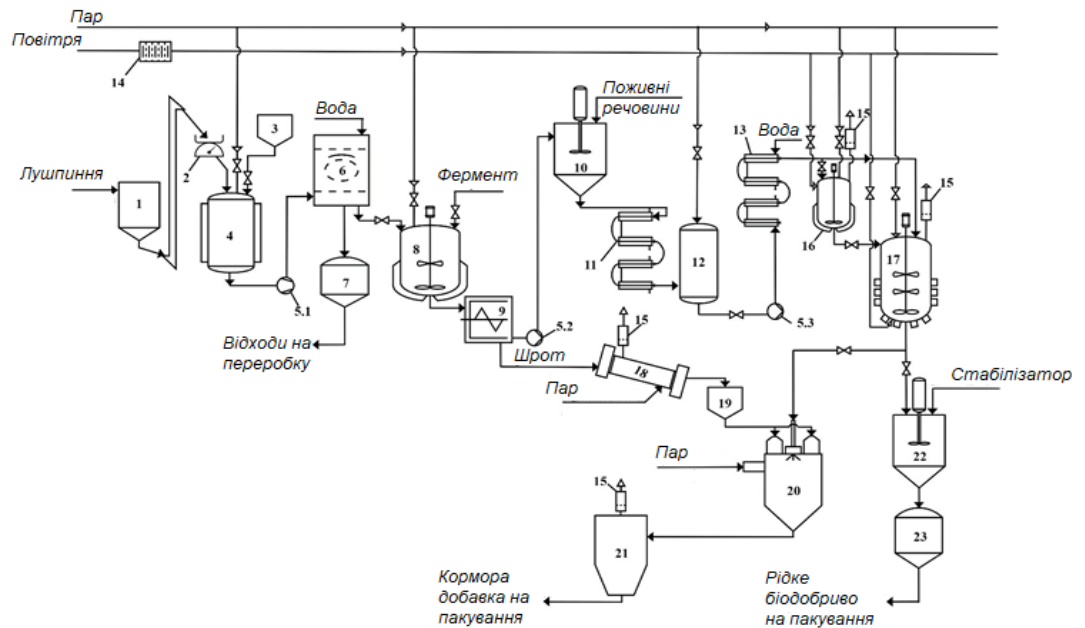


Рис. 2.2 – Принципова технологічна схема виробництва біопрепаратів на основі штаму *P. tucilaginosus* 560: 1 - бункер для рисового лушпиння, 2 - ваги, 3 - ємність для приготування лугу, 4 - реакцій лушпиння, 5.1-5.4 - насоси, 6 - барабанний фільтр, 7 - збірник для лугу, 8 - біореактор для ферментативної обробки клітковини рисового лушпиння, 9 - центрифуга, 10 - ємність для приготування стерилізатор, 12 - збірник для живильного середовища, 13 - охолоджувач для живильного середовища, 14 - фільтр для очищення та стерилізації повітря, 15 - фільтри для очищення відхідного повітря, фермент 17 - інокуляційна сушарка, 19 - охолоджувач для носія, 20 - сушарка для кормової добавки, 21 - циклонний апарат, 22 - змішувач, 23 - ємність для рідкого біодобрива

РОЗДІЛ 3

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

В роботі використовували наступні сировинні матеріали:

Рисове лушпиння, отримане при переробці рису сорту рапан білий (ТОВ «РИС ГРУП», Ізмаїльський район, Одеська область). Склад рисового лушпиння: 1,81% сирого білка, 0,39% сирого жиру, 24,81% без азотистих екстрактивних речовин, 38,71% целюлози, 18,94% геміцелюлози, 13,17% золи, вологість 11,65%. Питома поверхня, визначена методом БЕТ, 0,30 м²/г.

Меляса бурякова за ГОСТ 31465-2012 «Меляса. Технічні умови», призначена для виробництва етилового спирту з харчової сировини, харчової лимонної кислоти, хлібопекарських, кормових дріжджів і для використання для використання. Мелясу надав ТОВ «Олександрійський цукровий завод». Масова частка сухих речовин в мелясі 75,0 %, масова частка цукру при прямій поляризації 44,0 %, масова частка рідких речовин – 4,9 %, масова частка суми цукрів, що зброджуються, 47,0 %, масова частка сіль кальцій 4%, рН 6,5 [52].

3.1. Приготування поживних середовищ для культивування бактерій

Бактеріальні штами мікроорганізмів зберігалися на щільному живильному середовищі Ешбі без азоту наступного складу (%): сахароза – 2,00, K₂HPO₄·3H₂O – 0,02, MgSO₄·7H₂O – 0,02, K₂SO₄ – 0,02, Са агар – 2,00. На цьому середовищі культури зберігалися до 6 місяців [53].

Глибинне культивування культури здійснювали на рідкому поживному середовищі Александра наступного складу (%): K₂HPO₄·3H₂O – 0,20, MgSO₄·7H₂O – 0,05, СаСО₃ – 0,01, NH₄SO₄ екстракт – 0,10 [54].

Як джерело вуглеводів використовувалися моносахариди (глюкоза (ГОСТ 6038–79), фруктоза (ТУ 6-09-1979–72), дисахариди (цукроза ГОСТ 5833–75) і олигосака Cath Roth, Німеччина.

В якості джерела вуглеводів були використані вторинні ресурси переробки рослинної сировини, такі як ферментолізат клітковини

соняшникового лушпиння, екстракт ксилану, виділеного з берези, меляса бурякова.

Стерилізація поживних середовищ проводилася в автоклаві при $120 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 20 хвилин.

Глибинне культивування бактерій *P. mucilaginosus* і *P. salinicaeni* проводилося в колбах Ерленмейєра об'ємом 100 – 250 мл при температурі культивування від 25 до 35° С при безперервному перемішуванні 150 - 220 об/хв на шейкері інкубатора IST-3075R (виробник Jeiotech, Korea) протягом 3 діб. Колби засівали від 5 до 10% інокулятом від обсягу живильного середовища.

3.2. Визначення вмісту редукуючих речовин у поживному середовищі та концентраті біопрепарату

Визначення редукуючих речовин (РР) у живильному середовищі проводили за методикою, наведеною в роботі [55].

До 120 мкл досліджуваної проби додавали 1200 мкл дистильованої води і 600 мкл 3,5-динітросаліцілової кислоти (ДНСК-реагент). Витримували проби 10 хвилин при 100° С, потім 5 хв. за 0°С. Далі додавали на всі проби по 6 мл дистильованої води і вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 540 нм в кюветі шириною 5 мм. У контрольний дослід замість проби додавали 120 мкл дистильованої води. Зміст РР у кожному зразку визначалося за калібрувальним графіком стандартного розчину глюкози в діапазоні від 2 до 10 г/л. Визначали початковий вміст РР у живильному середовищі та вміст РР після кислотної інверсії вуглеводів. Для цього проводили гідроліз всіх вуглеводів живильного середовища в закритих пробірках концентрованої сірчаної кислотою при рН 1–2 протягом 10 хв.

РОЗДІЛ 4

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ БАКТЕРІЙ *P. MUCILAGINOSUS* НА ПОЖИВНОМУ СЕРЕДОВИЩІ, ПРИГОТУВАНОЇ НА ОСНОВІ МЕЛЯСИ

4.1. Вибір ефективного продуцента біомаси та ЕПС при культивуванні на живильному середовищі з мелясою

При отриманні біодобрих та кормових добавок шляхом мікробіологічного синтезу на живильних середовищах, виготовлених на основі сахарози, економічно не виправдано. Для зниження собівартості цих біопрепаратів сільськогосподарського призначення слід використовувати доступні джерела вуглецю. У зв'язку з цим визначалася можливість культивування штамів бактерій *P. mucilaginosus 560* і *574* на живильному середовищі, приготованому на основі меляси, що є вторинним ресурсом цукрового виробництва, в якому міститься близько 50% сахарози. Переваги меляси: низька вартість, простота зберігання, крім високого вмісту цукру, в ній містяться різні солі, мікроелементи, амінокислоти та вітаміни, які забезпечують ріст та розвиток мікроорганізмів [42].

З даних, представлених у таблиці 4.1, випливає, що при порівнянних значеннях часу генерації та питомої швидкості зростання концентрація біомаси та ЕПС, синтезованих штамом *P. mucilaginosus 574*, у 2 та 1,2 рази більша, відповідно, порівняно з концентрацією біомаси та ЕПС, що синтезуються штамом *P. mucilaginosus 560*. Це може бути пов'язано зі здатністю синтезу культурами ферменту β -фруктофуранозідази, що гідролізує сахарозу в мелясі, та засвоєнням субстрату індивідуальними штамми. Це підтверджується і вищою активністю β -фруктофуранозідази штаму *P. mucilaginosus 574*.

Тривалість лаг-фази для адаптації при культивуванні обох штамів бактерій *P. mucilaginosus 560* та *574* на живильному середовищі з мелясою

становить 12 год (рис. 4.1). Крім тривалої лаг-фази встановлено, що питома швидкість зростання, вихід біомаси та ЕПС при культивуванні обох

штамів на живильному середовищі з мелясою, в якій міститься 1% сахарози, нижче, ніж при культивуванні на живильному середовищі з сахарозою при рівному її вмісті (табл. 3.4 та 3.5).

Таблиця 4.1 – Ростові параметри та концентрація біомаси та ЕПС штамів бактерій *P. mucilaginosus* 560 та 574 при культивуванні на живильному середовищі, що містить 2 % меляси

| Показники | <i>P.mucilaginosus</i> 560 | <i>P.mucilaginosus</i> 574 |
|---|----------------------------|----------------------------|
| Питома швидкість росту, год ⁻¹ | 0,13 ± 0,03 | 0,12 ± 0,03 |
| Час генерації, год | 5,37 ± 1,33 | 5,84 ± 1,60 |
| Концентрація біомаси, г/л | 0,85 ± 0,02 | 1,71 ± 0,03 |
| Концентрація ЕПС, г/л | 4,20 ± 0,13 | 5,02 ± 0,15 |
| Активність β-фруктофуранозидази, од/мл | 0,33 ± 0,01 | 0,84 ± 0,01 |

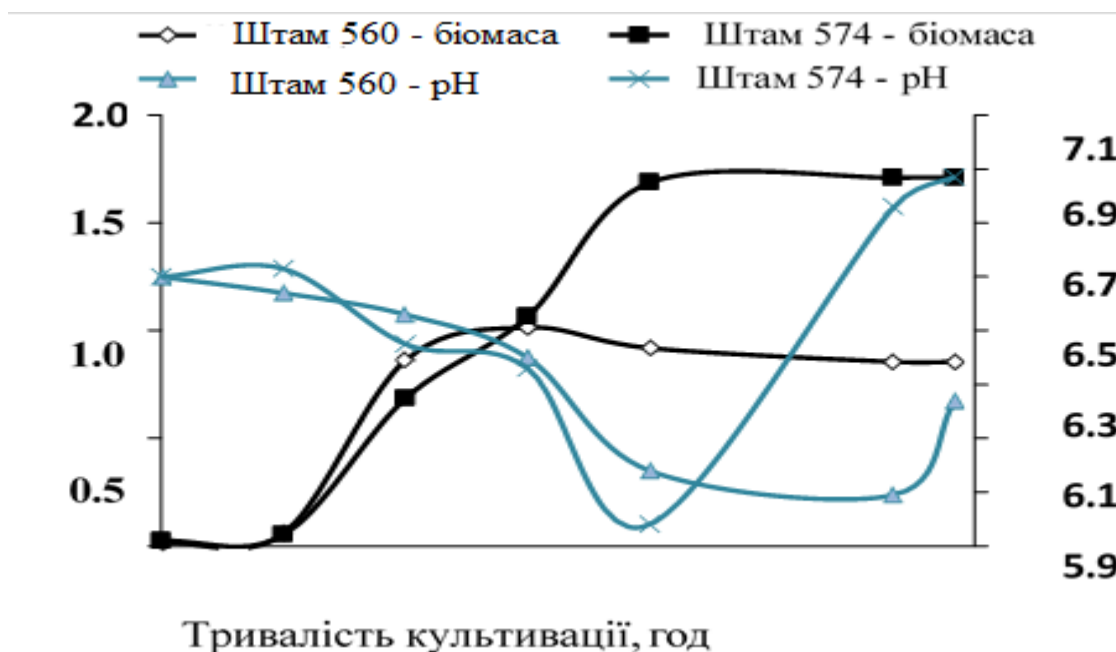


Рис. 4.1 – Зміна концентрації біомаси та рН середовища при культивуванні бактерій *P. mucilaginosus* 560 та 574 на поживному середовищі, що містить 2 % меляси

Слід зазначити, що відбувається зміна рН середовища в перші 48 год культивування обох штамів бактерій *P. mucilaginosus* у бік підкислення

середовища через накопичення органічних кислот в середовищі. До кінця культивування штаму *P. mucilaginosus* 560 спостерігається незначне підвищення рН середовища (від 5,7 до 6,0). При цьому рН середовища інтенсивно зростає від 5,6 до 6,9 при культивуванні штаму *P. mucilaginosus* бактеріями при культивуванні [24] (див. рис. 4.1).

Таким чином, для подальших досліджень рекомендується використовувати штам *P. mucilaginosus* 574, який є перспективним продуцентом, що забезпечує високий вихід біомаси та ЕПС при культивуванні на живильному середовищі з мелясою.

4.2. Дослідження біотехнологічної активності штаму

***P. mucilaginosus* 574 при культивуванні на живильному середовищі з мелясою**

Проведено дослідження здатності азотфіксації, каліймобілізації та фосфатсолюбілізації штамом *P. mucilaginosus* 574 при культивуванні на живильному середовищі з мелясою. З результатів, поданих у таблиці 4.2, видно, що вміст загального азоту в культуральній рідині змінюється зі зростанням бактерій при культивуванні на живильному середовищі з мелясою. Підвищення вмісту загального азоту у культуральній рідині при виході біомаси досліджуваного штаму 0,85 г/л (середнє, рис. 4.4) після 72 год культивування свідчить про те, що даний штам здатний фіксувати атмосферний азот на живильному середовищі з мелясою. По закінченню культивування вміст загального азоту в середовищі та вихід біомаси цього штаму при культивуванні на живильному середовищі з мелясою менше в 2 рази порівняно з культивуванням на живильному середовищі з сахарозою (19,57 мгN/л, 1,93 г/л по біомасі, табл. 3.2).

Слід зазначити, що штам *P. mucilaginosus* 574 інтенсивно синтезував ІУК до 144 мг/л на живильному середовищі з мелясою (див. табл. 4.2), що в 2,4 рази більше в порівнянні з синтезом на живильному середовищі з сахарозою (60 мг/л, рис. 3.1). Очевидно, це пов'язано з присутністю в мелясі

вітамінів, таких як піридоксин і нікотинова кислота, які відіграють роль кофактора ферментів, що беруть участь у триптофан-залежних шляхах синтезу ІОК [243].

Ефективний синтез бактеріями ІОК з триптофану посідає стаціонарну фазу зростання мікроорганізмів (табл. 4.2, рис. 4.1), що відповідає опублікованим результатам інших досліджень [24, 45].

Встановлено, що з важкодоступного фосфату даний штам здатний звільняти фосфор, вміст якого в середовищі збільшується в міру зростання штаму, що розглядається, і досягає максимального значення 107,44 мг/л на початок стаціонарної фази росту бактерій (табл. 4.2). При цьому рН середовища піднімається від 6,5 до 7,4 на відміну зміни рН при культивуванні цього штаму на живильному середовищі з сахарозою до кислотних значень (табл. 3.3). У роботах [246, 247] показано, що ЕПС відіграють важливу роль у мобілізації фосфору. При цьому ЕПС у певній кількості дозволяють утримувати вільні аніони фосфору (PO^{3-}), викликаючи незбалансований вміст фосфору в середовищі, що в результаті призводить до більшого вивільнення фосфору (HPO^{2-} , H_2PO^-) з нерозчинного фосфату. Тому було висловлено припущення, що ЕПС із здатністю утримання розчинених фосфатів можуть бути додатковим фактором у розчиненні нерозчинних мінеральних фосфатів мікробами, крім органічних кислот та іонів H^+ .

Таблиця 4.2 – Продукти метаболізму штаму *P. mucilaginosus* 574 при культивуванні на живильному середовищі, що містить мелясу протягом 72 годин при температурі 30 ± 1 °С

| τ, год | рН середовища | Вміст загального азоту в КР, мг/л | Кількість ІОК в КР, мг/л | Кількість фосфору в КР, мг/л | Фітаза, од/мл |
|--------|---------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|---------------|
| 24 | 7,32 ± 0,20 | 11,62 ± 0,92 | 28,68 ± 1,72 | 0 | 0 |
| 48 | 7,41 ± 0,20 | 5,77 ± 0,52 | 121,56 ± 6,07 | 107,44 ± 5,35 | 1,16 ± 0,10 |
| 72 | 7,43 ± 0,20 | 8,46 ± 0,50 | 144,06 ± 7,21 | 23,29 ± 1,12 | 0,29 ± 0,02 |

Штам *P. mucilaginosus* 574, також як і на живильному середовищі з сахарозою, здатний продукувати фермент фітазу з активністю 1,16 од/мл після

48 год культивування на живильному середовищі, що містить фітат натрію (табл. 4.2).

Таким чином, використання меляси в живильному середовищі замість сахарози зберігає у штаму *P. mucilaginosus 574* здатність фіксувати атмосферний азот і фосфатсолюбілізацію, а також підвищити синтез ІУК та фітазну активність.

4.3. Вплив вмісту меляси в живильному середовищі на синтез біомаси та ЕПС штаму *P. mucilaginosus 574*

Враховуючи важливу роль бактеріальних ЕПС не тільки у стимулюванні фосфатсолюбілізації, зниженні сольового стресу, стимулюванні росту рослин, а й у здатності адсорбції мікотоксинів у кормі для тварин, подальші дослідження були спрямовані на інтенсифікацію синтезу ЕПС та біомаси штамом *P. mucilaginosus* . на основі меляси.

Для зростання мікроорганізмів концентрація субстрату є одним із лімітуючих факторів росту. У цій роботі досліджували вплив концентрації меляси на зростання та синтез ЕПС штаму *P. mucilaginosus 574*. Вміст меляси в середовищі варіювався від 1 до 4%. Як видно з представлених даних на рис. 4.2 а, максимальна питома швидкість росту досягалася $0,12 \text{ год}^{-1}$ при вмісті меляси 1% і надалі трохи знижувалася в діапазоні вмісту меляси, що розглядається в поживному середовищі.

Збільшення вмісту меляси у живильному середовищі закономірно призвело до збільшення біомаси бактерій. Максимальна концентрація біомаси бактерій 4 г/л досягалася при культивуванні штаму *P. mucilaginosus 574* на живильному середовищі, що містить 4% меляси. Максимальна концентрація ЕПС (5,0 г/л) та максимальна в'язкість культуральної рідини спостерігалися при культивуванні на середовищі з вмістом 2% меляси. Підвищення вмісту в живильному середовищі меляси більше 2% пригнічує синтез ЕПС (рис. 4.2 б). Можливо, це пов'язано зі збільшенням вмісту компонентів меляси у живильному середовищі, які є інгібіторами синтезу ЕПС. Отримані результати

можна порівняти з даними, представленими в роботах [48, 49], в яких встановлено, що вміст 2% меляси в поживному середовищі є оптимальним для синтезу ЕПС бактеріями *Azotobacter* з отриманням 7,5 г ЕПС/л, *Bacillus subtilis* з отриманням 4, гЕПС/л.

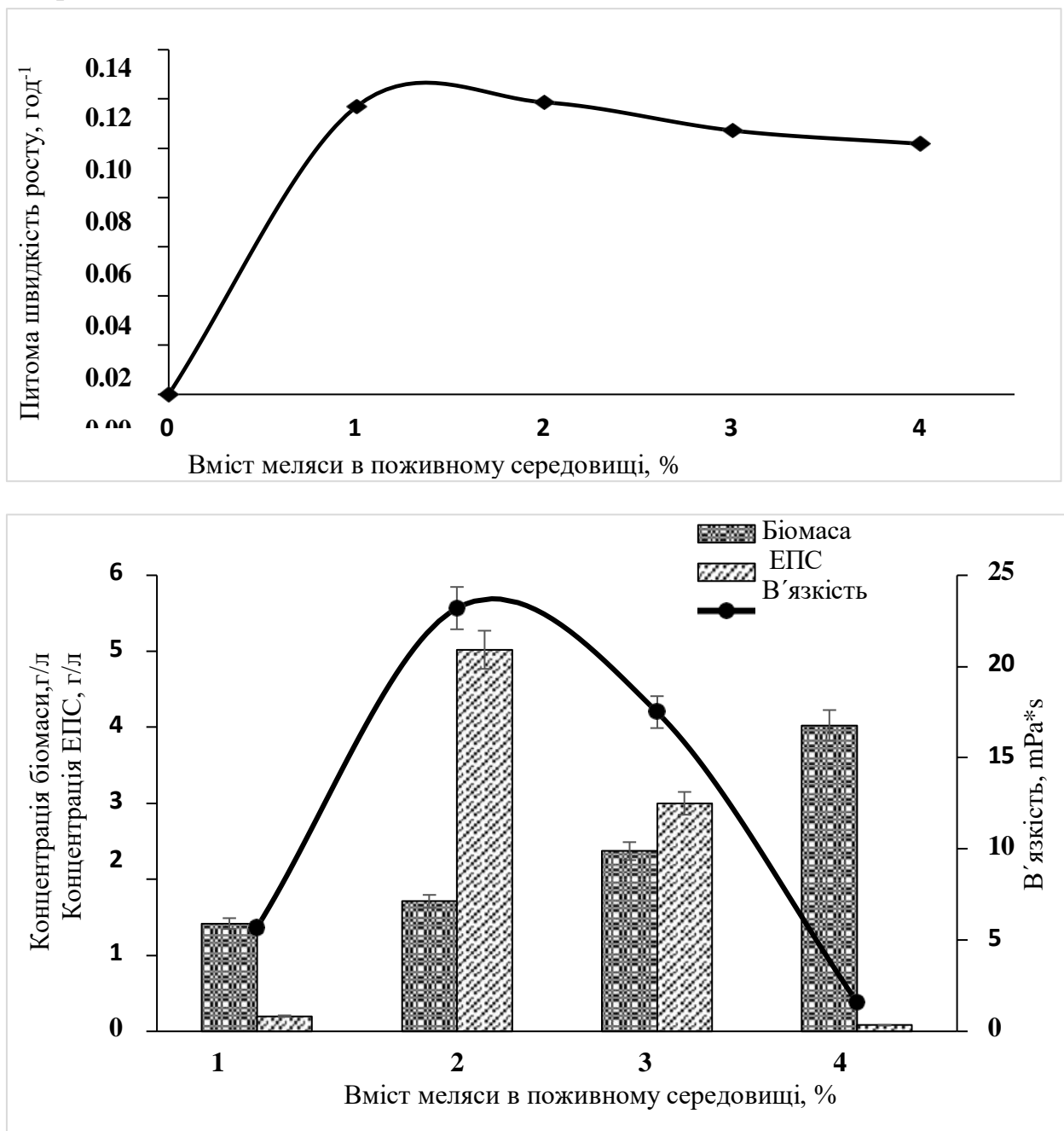


Рисунок 4.2 – Вплив вмісту меляси в живильному середовищі на кінетику росту (а) та вихід біомаси та ЕПС (б) штаму *P. mucilaginosus* 574

4.4. Вплив температури культивування та рН живильного середовища на синтез біомаси та ЕПС штамом *P. mucilaginosus* 574

Дослідження впливу температури на синтез біомаси та ЕПС штамом *P. mucilaginosus* 574 проводили на живильному середовищі, що містить 2% меляси. При цьому температура культивування варіювалася в діапазоні від 25 до 35 °С інтервалом в 5 °С. Встановлено, що оптимальною температурою для синтезу ЕПС є 30 ± 1 °С, це вказує висока в'язкість культуральної рідини. Ця температура відповідає і найкращому зростанню досліджуваних бактерій. При підвищенні температури до 35 ± 1 °С відбувається зниження синтезу біомаси у 2,3 рази та ЕПС у 8,6 разів порівняно з оптимальною температурою 30 ± 1 °С. Аналогічно при зниженні температури культивування до 25 ± 1 °С зменшується синтез біомаси у 1,7 рази та ЕПС у 1,9 рази порівняно з оптимальною температурою культивування (рис. 4.3а).

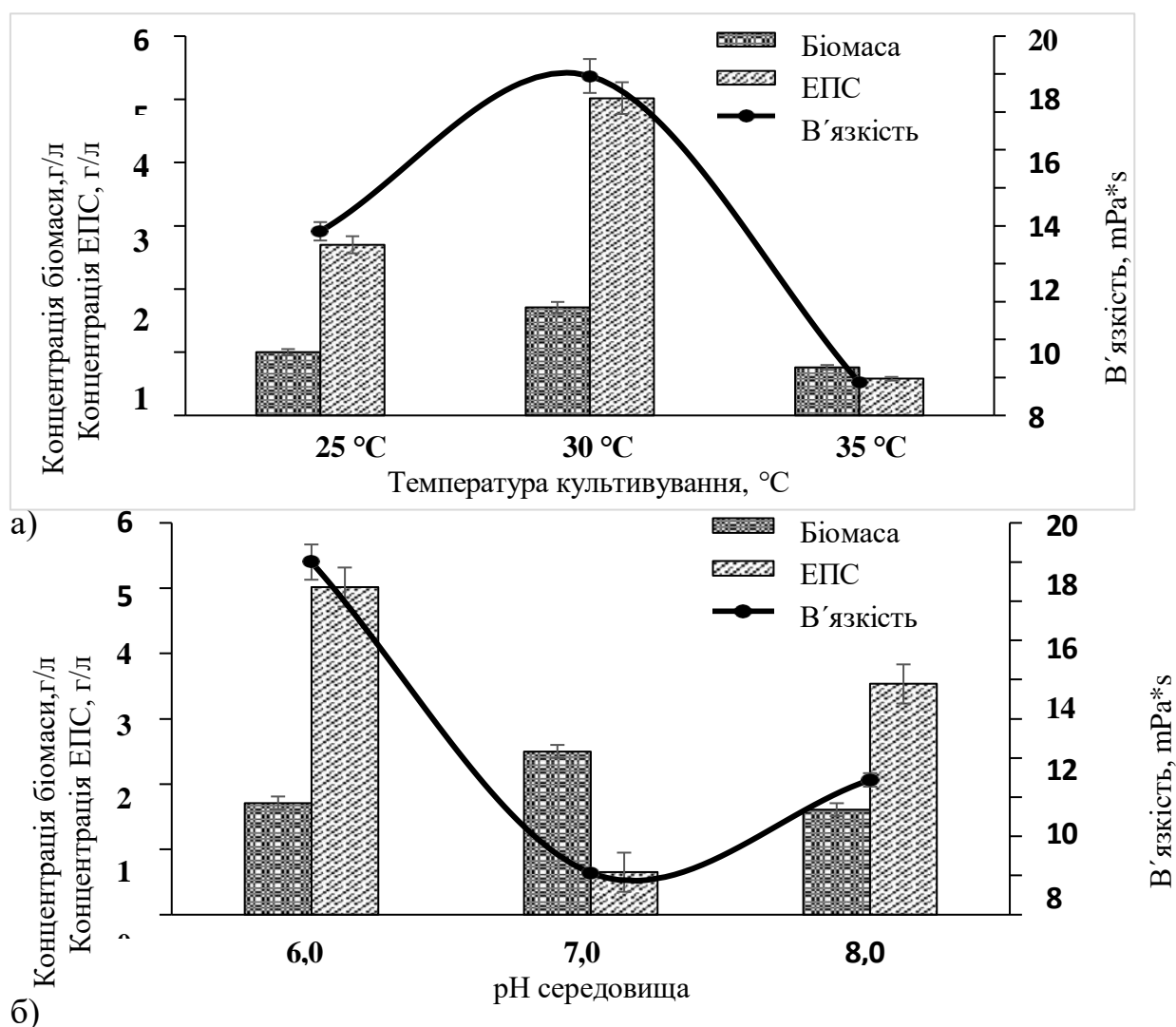


Рисунок 4.3 – Вплив температури культивування (а) та рН середовища (б) на синтез біомаси та ЕПС штаму *P. mucilaginosus 574*

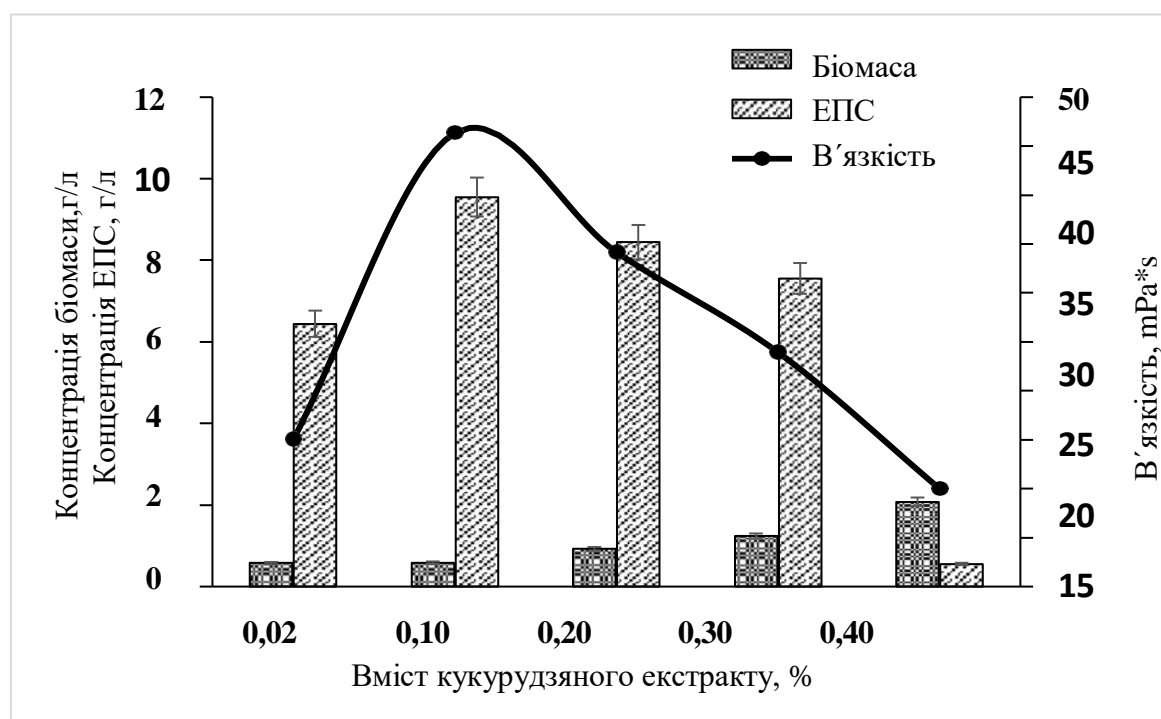
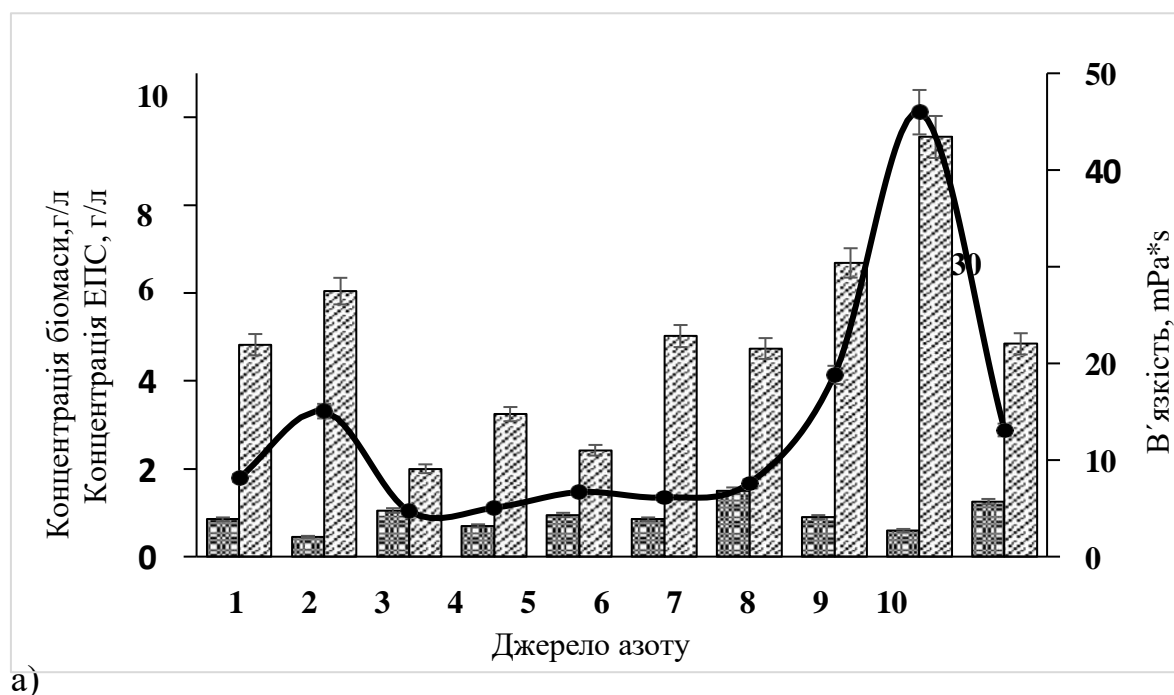
Крім температури, рН середовища також значно впливає на синтез біомаси та ЕПС штаму *P. mucilaginosus 574*. Дослідження проводилося при оптимальній температурі 30 ± 1 °С з коригуванням рН живильного середовища від 6,0 до 8,0 гідроксидом кальцію. Як контроль використовували живильне середовище з рН $6,0 \pm 0,2$. Встановлено, що при рН більше 8,0 зростання штамів, що розглядаються, не спостерігається. У діапазоні рН від 6,0 до 8,0 штам *P. mucilaginosus 574* ефективно зростає при культивуванні на живильному середовищі з мелясою до нейтрального значення рН. Однак ефективний синтез ЕПС відбувається при зміні рН середовища в більш кислі або лужні значення. Зокрема, максимальна концентрація ЕПС синтезувалася в слабокислому поживному середовищі при рН 6,0 (рис.4.3б).

4.5. Вплив джерела та вмісту азоту на синтез біомаси та ЕПС штамом *P. mucilaginosus 574*

За оптимальних умов культивування температурі 30 ± 1 °С та рН середовища $6,0 \pm 0,2$ проводили визначення впливу джерела та вмісту азоту на синтез біомаси та ЕПС штамом *P. mucilaginosus 574* (див. рис. 4.4). В якості джерела азоту були обрані як мінеральні солі, так і органічні речовини.

Інтенсивність синтезу ЕПС штамом, що розглядається, спостерігається при культивуванні на живильному середовищі, приготованому на основі меляси без додаткового внесення мінеральних солей і азоту (середовище 2, рис. 4.4 а), оскільки в стресових умовах (при надлишку сахарози і недостатній кількості азоту) синтез. Вихід біомаси та ЕПС при культивуванні в середовищі 2, що містить мелясу без додаткового внесення мінеральних солей та азоту, відповідає виходу цих продуктів на живильному середовищі, що містить сахарозу (табл. 3.5). Отже, вміст поживних речовин у мелясі є достатнім для нормальної життєдіяльності та синтезу ЕПС досліджуваного штаму

Додаткове внесення джерела азоту до живильного середовища істотно впливає на зростання досліджуваного штаму в порівнянні з контролем (Середовище 1, рис. 4.4а).



б)

Рисунок 4.4 – Вплив джерела азоту (а) та його вмісту (б) у живильному середовищі на синтез біомаси та ЕПС штамом *P. mucilaginosus* 574. На малюнку 4.4 а: 1 – без додаткового джерела азоту, 2 – без додаткових джерел мінеральних солей та азоту, 3 – NH_4NO_3 , 4 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 – дріжджовий

екстракт, 6 – одночасна присутність $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та дріжджового екстракту, 7 – пептон, 8 – бетафін, 9 – кукурудзяний екстракт, 10 – карбамід

Найкращим джерелом азоту для синтезу біомаси був пептон (Середовище 7, рис. 4.4 а), який сприяє збільшенню кількості біомаси в 2 рази в порівнянні з контролем (Середовище 1, рис. 4.4 а).

З результатів, представлених на малюнках 4.4 а та 4.4 б видно, що при внесенні в живильне середовище бетафіну (середовище 8) та кукурудзяного екстракту (середовище 9) збільшується синтез ЕПС цим штамом. Максимальна концентрація синтезованих ЕПС в середовищі 9,55 г/л досягалася при внесенні в середу кукурудзяного екстракту в кількості 0,1 %, що в 2 рази більше порівняно з контролем (Середовище 1), і в 1,5 рази більше, ніж при культивуванні досліджуваного штаму на середовищі, що містить 2% меляси і без додаткових джерел мінеральних солей та азоту (Середовище 2). Очевидно, це пов'язані з вмістом у кукурудзяному екстракті індукторів синтезу ЕПС. Подальше підвищення вмісту кукурудзяного екстракту в середовищі забезпечує сприятливі умови для зростання продуцента, в результаті якого концентрація біомаси збільшується, проте синтез ЕПС при цьому знижується в 17 разів порівняно з синтезом в середовищі, що містить 0,1% кукурудзяного екстракту (див. рис. 4.4 б). В опублікованих дослідженнях встановлено, що кукурудзяний екстракт є найбільш сприятливим джерелом азоту для біосинтезу ЕПС бактеріями *Bacillus megaterium* [25], дріжджами *Aureobasidium pullulans RBF 4A3* [24] та грибами *Agaricus nevoi*, *Inonotus levis* HAI.

4.6. Вплив віку та дози інокуляту на синтез біомаси та ЕПС штамом *P. mucilaginosus 574*

Вивчено вплив віку (час інкубації) та дози інокуляту на синтез біомаси та ЕПС досліджуваного штаму (див. рис. 4.5). Встановлено, що зі збільшенням віку інокуляту концентрація біомаси, що продукується досліджуваним штамом, підвищується, при цьому концентрація ЕПС, що синтезуються,

знижується (рис. 4.5 а). Відзначено незначний вплив дози інокулянту на синтез біомаси цього штаму. Максимальна концентрація ЕПС (9 г/л) та біомаси (0,4 г/л) спостерігалася при віці інокулянту 24 год (рис. 4.5 а) із внесенням 5% інокулянту (рис. 4.5 б).

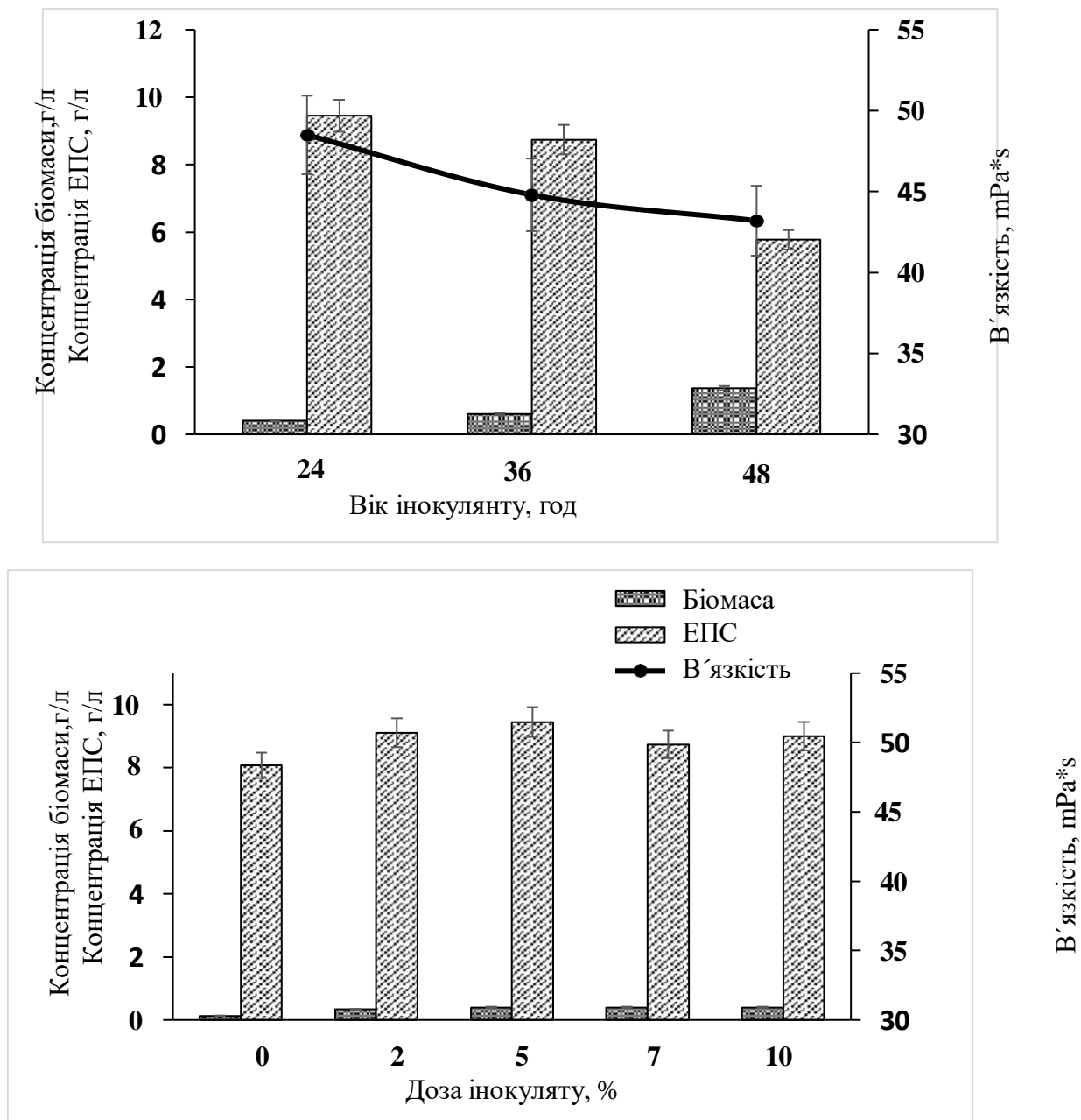


Рисунок 4.5 – Вплив віку (а) та дози інокулянту (б) на синтез біомаси та ЕПС штамом *P. mucilaginosus* 574. Як контроль використовували живильне середовище без внесення інокулянту (0 %)

4.7. Вплив аерації на синтез біомаси та ЕПС штамом *P. mucilaginosus 574*

При дослідженні впливу аерації показано, що максимальна концентрація біомаси (2 г/л) та ЕПС (9,6 г/л), що синтезуються штамом *P. mucilaginosus 574*, спостерігається в умовах аерації, за яких співвідношення обсягу повітря до обсягу середовища становить 4,0:1,0 (рис.4.6а).

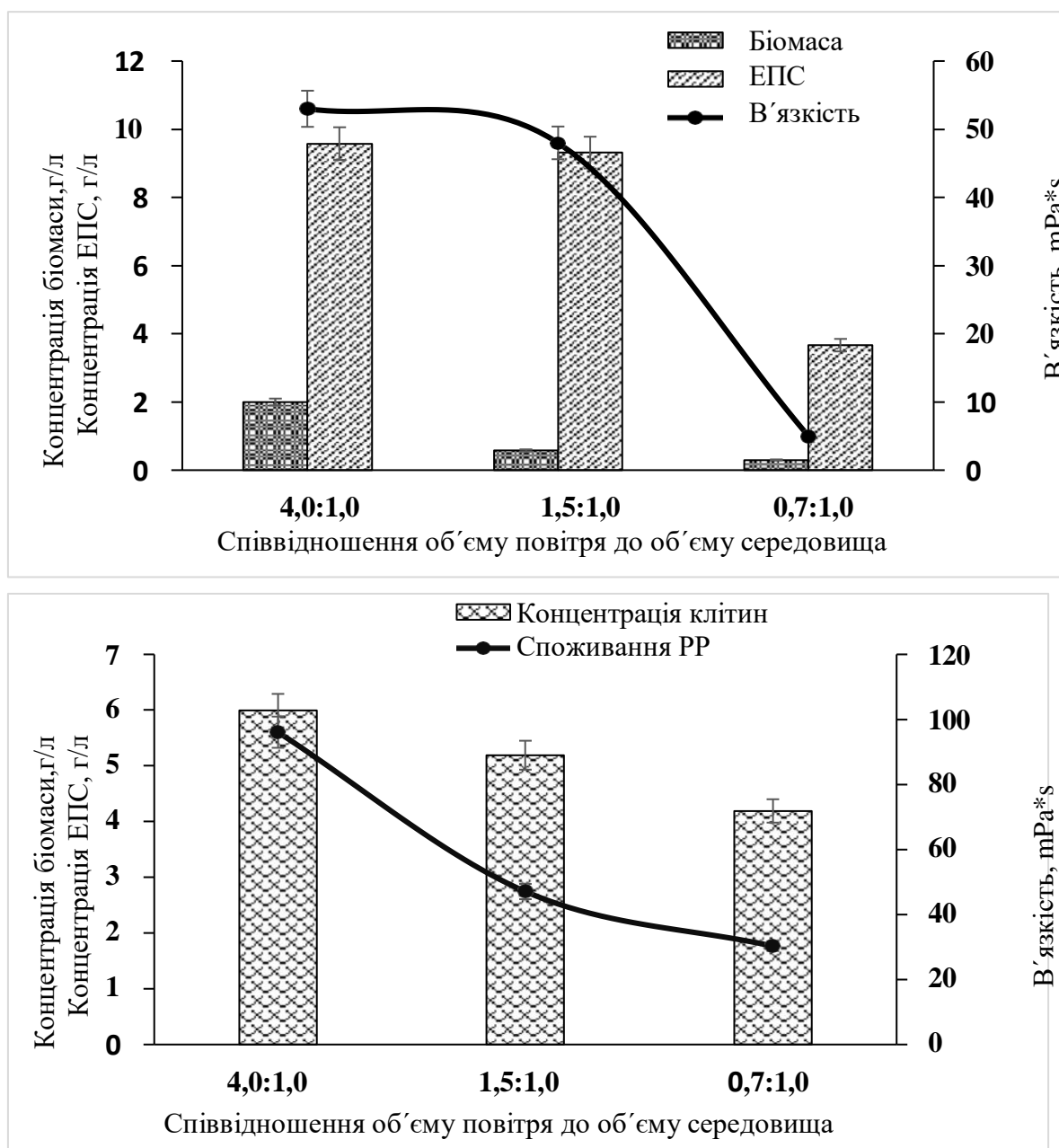


Рисунок 4.6 – Вплив співвідношення об'єму повітря до об'єму живильного середовища на вихід біомаси та ЕПС (а), концентрацію клітин та споживання РР(б) штамом *P. mucilaginosus 574* (механічне перемішування)

Отримані результати відповідають даним, представленим у роботі [10], отриманим при культивуванні штаму *Paenibacillus sp. TKU023*. концентрація біомаси та ЕПС при співвідношенні об'єму повітря до об'єму середовища 4,0:1,0 у 2,6 та 6,6 разів більша, відповідно, порівняно із співвідношенням об'єму повітря до об'єму середовища 1,5:1,0 та 0, 7:1,0.

У зв'язку з поліпшенням умов аерації в середовищі, при яких співвідношення об'єму повітря до об'єму середовища 4,0:1,0, штам може утилізувати до 96% вуглеводів меляси. недоліком розчиненого в живильному середовищі кисню, необхідного для повної утилізації вуглеводів меляси. Внаслідок повної утилізації цукру даним штамом при співвідношенні об'єму повітря до об'єму середовища 4,0:1,0 число клітин досягається 6×10^8 КУО/мл і синтез ЕПС збільшується до 9,55 г/л (рис. 4.6 б).

Таким чином, встановлено, що можна і доцільно синтезувати ЕПС штамом *P. mucilaginosus 574* на живильному середовищі з мелясою без додаткового внесення мінеральних речовин і азоту.

Показано, що з інтенсифікації біосинтезу ЕПС культивування штаму *P. mucilaginosus 574* доцільно проводити на живильному середовищі, що містить 2 % меляси, при температурі 30 ± 1 °C і рН $6,0 \pm 0,2$ з додаванням 0,1 % кукурудзяного екстракту як індуктор синтезу ЕПС. Максимальна концентрація ЕПС 9,55 г/л може бути отримана з внесенням 5 % інокуляту після 24 год інокуляції при співвідношенні об'єму повітря до об'єму середовища 4,0:1,0 Отримані результати досліджень рекомендуються для розробки технології виробництва біопрепаратів сільськогосподарського призначення

4.8. Оцінка ефективності утилізації вуглеводів клітковини однорічних і багаторічних рослин бактеріями *P. mucilaginosus* і *P. salinicaeni*

Можливість утилізації клітковини однорічних та багаторічних рослин мікроорганізмами є важливою ознакою придатності мікроорганізмів до використання як мікробіологічні добрива та кормові добавки.

Рисове лушпиння – відхід однорічних рослин, в якому міститься від 60 до 80 % органічних речовин, таких як целюлоза, геміцелюлози (в основному пентозони), лігнін, незначна кількість білка, жиру, вітамінів та мінеральних речовин, вміст яких змінюється залежно від географії місця та агротехнічних способів обробітку рису [24]. Враховуючи значну кількість, а також доступність органічних речовин у рисовому лушпинні, є доцільним використовувати цей відхід як сировину при виробництві поживних середовищ для культивування мікроорганізмів у промислових умовах. Використання цього дешевого джерела вуглецю дозволить організувати економічно ефективно виробництво біопрепаратів сільськогосподарського призначення. У зв'язку з цим вивчалася ферментативна активність бактерій *P. tunicinolosus* і *P. salinicaeni* по відношенню до вуглеводів ферменталізму клітковини рисового лушпиння.

Для використання клітковини рисового лушпиння як джерело вуглецю в поживних середовищах при культивуванні мікроорганізмів рисову лушпиння обробляли гідроксидом натрію, клітковину промивали і обробляли ферментами, одержуючи РР.

При обробці рисового лушпиння розчином гідроксиду натрію встановлено, що зі збільшенням концентрації лугу відбувається розчинення низькомолекулярних фракцій клітковини рисового лушпиння, зокрема, простих цукрів, про що можна судити за величиною РР (рис. 4.7). Найменше вилучення РР з клітковини рисового лушпиння в луг спостерігається при концентрації гідроксиду натрію 2,5%.

Слід вважати, що зазначені вище зміни фізико-хімічних властивостей клітковини рисової лушпиння обумовлюють ефективніший контакт ферментного препарату Accellerase з субстратом, на що вказують результати досліджень у раніше опублікованій роботі [21].

Дослідження показали, що при обробці рисового лушпиння гідроксидом натрію концентрацією 2,5 % збільшився вміст целюлози до 89,0 %, вміст гемицелюлози та лігніну знизився, відповідно, до 6,0 та 4,0 %.

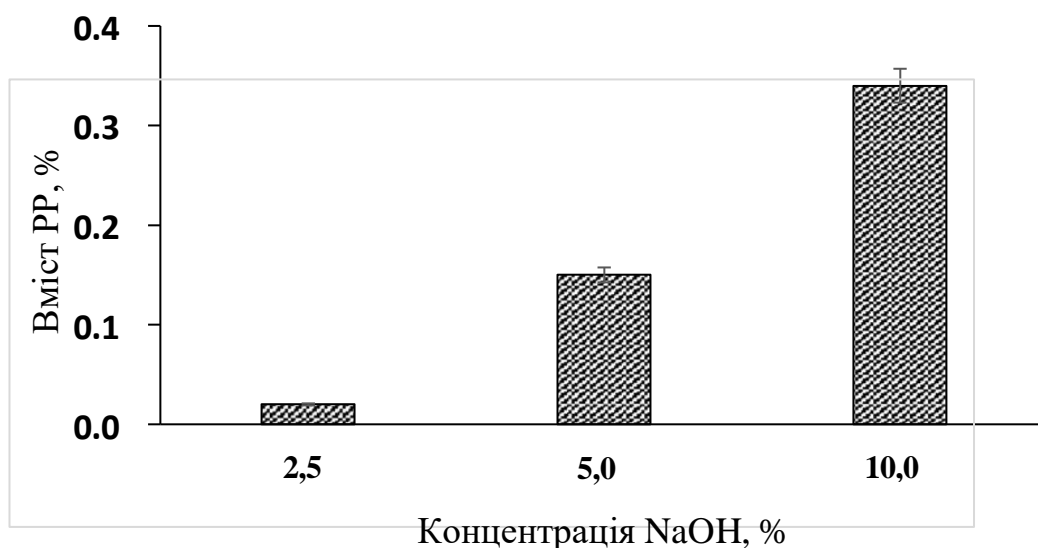


Рисунок 4.7 – Вплив концентрації гідроксиду натрію на вміст РР в лужному середовищі при температурі обробки $120 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 20 хв.

Після лужної обробки рисового лушпиння збільшилася питома площа поверхні з $0,3 \text{ м}^2/\text{г}$ у вихідній сировині до $2,5 \text{ м}^2/\text{г}$ (табл. 5.1). Слід вважати, що зазначені вище зміни фізико-хімічних властивостей клітковини рисової лушпиння обумовлюють ефективніший контакт ферментного препарату Accellerase з субстратом, на що вказують результати досліджень у раніше опублікованій роботі [255].

Таблиця 4.3 – Склад клітковини рисового лушпиння до і після лужної обробки

| Назва компоненту | Відсотковий вміст | Відсотковий вміст |
|--|--------------------------------|-----------------------------------|
| | клітковини до обробки лугом | клітковини після обробки лугом |
| Целюлоза, % | 38,7 | 89,0 |
| Гемицелюлоза, % | 18,9 | 6,0 |
| Лігнін, % | 19,4 | 4,0 |
| Сирий білок, % | 1,8 | – |
| Сирий жир, % | 0,4 | – |
| Мінеральні речовини, % | 13,2 | 0,5 |
| Питома площа поверхні, $\text{м}^2/\text{г}$ | 0,3 | 2,5 |

Рентген флуоресцентний аналіз показав, що при лужній обробці рисової лушпиння гідроксидом натрію в луг екстрагуються мінеральні речовини, склад та кількість яких представлено в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4 – Масова частка елементів (мас. %) у лузі при обробці рисового лушпиння гідроксидом натрію концентрацією 2,5 % протягом 20 хв при температурі 120 ± 1 °C

| Хімічний елемент, мас. % | | | | | | | |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-------|
| Na | Si | P | S | K | Ca | Mn | Fe |
| 1,1 | 5,6 | 0,2 | 0,1 | 0,5 | 0,006 | 0,003 | 0,004 |

З представлених результатів досліджень випливає, що при лужній обробці рисового лушпиння виділяється кремній у кількості 5,6 мас. %. Відповідно, як і зазначено в багатьох публікаціях [6, 7], рисове лушпиння може бути джерелом діоксиду кремнію. Крім цього, в лузі містяться макро- і мікроелементи P, S, K, Ca, Mn, Fe. Слід очікувати, що поділ клітковини рисового лушпиння і кремнію з макро- і мікроелементами в умовах сприятиме ефективному ферментолізу клітковини з отриманням простих цукрів.

Обробка отриманої клітковини рисового лушпиння ферментними препаратами Accellerase показала, що на вміст PP у ферментолізат впливають активність і витрата ферментів, температура і тривалість ферментативної обробки. Встановлено, що максимальний вміст PP у ферментолізат спостерігається після 24 год обробки клітковини лушпиння рису. Вміст PP у ферментолізаті при обробці клітковини рисового лушпиння ферментним препаратом Accellerase 1500 більше, ніж при обробці клітковини рисового лушпиння ферментним препаратом Accellerase XY (див. рис. 4.8).

Отримані результати можна пояснити наявністю у комплексних ферментних препаратах Accellerase ферментів з різною активністю. Зокрема, у ферментному препараті Accellerase 1500 присутні ендоглюканаза, екзоглюканаза, геміцелюлаза, β -глюкозидаза, які сприяють більш ефективному ферментативному гідролізу клітковини рисового лушпиння в

порівнянні з ферментним препаратом Accellerase XY, в якому присутній переважно целюлаза і ксиланаза.

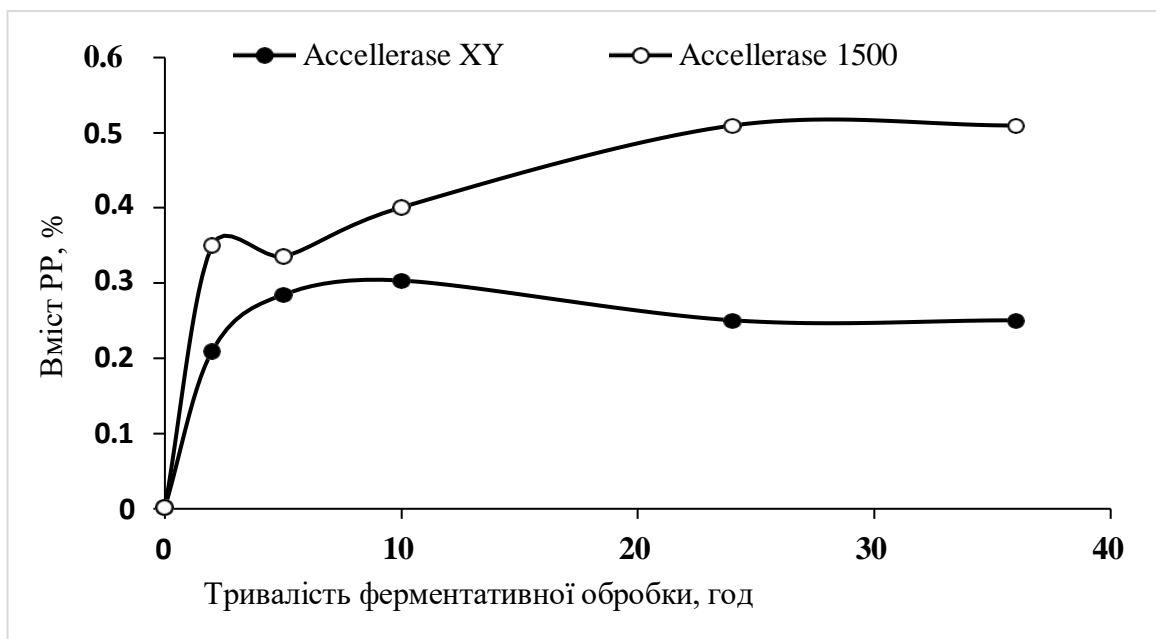


Рисунок 4.8 – Вплив ферментних препаратів та тривалості обробки клітковини рисового лушпиння на вміст РВ у ферментолізаті. Температура обробки $55 \pm 1^\circ\text{C}$, рН $5,5 \pm 0,2$

Методом ГРХ було визначено склад ферментолізату (хроматограму наведено на рис. 4.9), отриманого з клітковини рисової лушпиння (див. табл. 4.5).

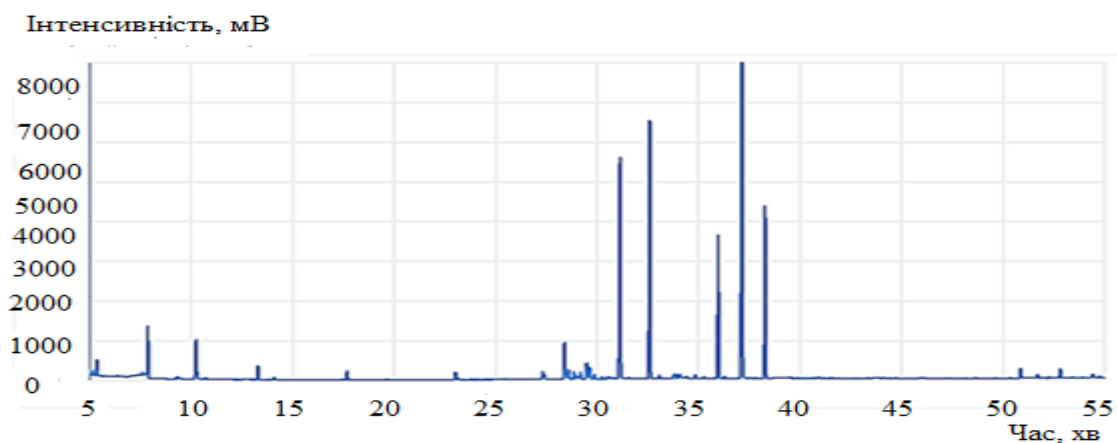


Рисунок 4.9 – Вихідна крива ГЖХ триметилсилільних похідних ферментолізату клітковини рисового лушпиння. Час виходу компонентів наведено у таблиці 4.5

Таблиця 4.5 – Хімічний склад ферментолізату клітковини рисового лушпиння після ферментативного гідролізу за даними ГРХ

| Назва, час виходу, хв | мг/л | % від АСР |
|----------------------------|--------|-----------|
| Вуглеводні | | |
| Ксилоза (31,1/32,6) | 918,58 | 46,58 |
| Глюкоза (36,0/38,3) | 676,52 | 33,57 |
| Арабиноза (28,6/29,5) | 76,28 | 3,79 |
| Фруктоза (33,8/34/34,1) | 54,80 | 2,72 |
| Мальтоза (52,8/53,6) | 33,90 | 1,68 |
| Целобіоза (54,5/54,7) | 31,41 | 1,56 |
| Сорбоза (35,3) | 4,88 | 0,24 |
| Галактоза (35,2/36,3) | 3,62 | 0,18 |
| 2-Деоксиглюкоза (33,4) | 1,68 | 0,08 |
| Органічні кислоти | | |
| Молочна (10,2) | 21,26 | 1,06 |
| Ізолимонна (34,2) | 11,20 | 0,56 |
| Винна (29,1) | 2,77 | 0,14 |
| Адипинова (25,0) | 0,98 | 0,05 |
| Енантова (13,8) | 0,92 | 0,05 |
| 2-Оксоглутарова (26,8) | 0,84 | 0,04 |
| Капринова (23,4) | 0,46 | 0,02 |
| Жирні кислоти | | |
| Лауринова (29,0) | 23,53 | 1,17 |
| Пальмитинова (39,0) | 3,82 | 0,19 |
| Миристинова (34,2) | 2,80 | 0,14 |
| Стеаринова (43,3) | 2,04 | 0,10 |
| Маргаринаова (41,2) | 1,96 | 0,10 |
| Арахидинова (47,3) | 1,07 | 0,05 |
| Амінокислоти | | |
| Глутамінова кислота (27,3) | 85,60 | 4,25 |
| Лізин (30,9) | 12,85 | 0,64 |
| Аланін (10,7) | 9,38 | 0,47 |
| Треонин (19,7) | 3,86 | 0,19 |
| Оксипролін (26,3) | 2,42 | 0,12 |
| Ізолейцин (16,7) | 0,88 | 0,04 |

Дані таблиці 4.5 свідчать про те, що до складу ферментолізату входить 90% РВ від загальної маси АСВ, у тому числі, 47% ксилози, 33% глюкози та 10% інших цукрів.

Крім того, у складі клітковини рисового лушпиння встановлено наявність амінокислот (6%), жирних та органічних кислот (~4%). Зміст різних амінокислот, включаючи аланін, глутамінову кислоту, оксипролін, ізолейцин,

лізин, треонін відповідає результатам досліджень, опублікованих у роботі [258].

Таким чином, ферментолізат клітковини рисового лушпиння, отриманий після лужної та ферментативної обробки, може бути використаний як основний субстрат для культивування бактерій *P. mucilaginosus* і *P. salinicaeni* [29].

4.9. Культивування бактерій *P. mucilaginosus* і *P. salinicaeni* на живильному середовищі з ферментолізат клітковини рисового лушпиння

Здатність до росту бактерій *P. mucilaginosus* і *P. salinicaeni* визначали на агаризованому поживному середовищі, приготованому на основі отриманого ферментолізату клітковини рисового лушпиння (рис. 4.10).

Встановлено, що всі штами бактерій *P. mucilaginosus* та *P. salinicaeni* добре ростуть на нейтральному живильному середовищі, отриманому після коригування рН середовища гідроксидом кальцію (рис. 4.10 а). На слабокислому поживному середовищі (рН 5,5) спостерігалось зростання лише одного штаму *P. salinicaeni* 17-6 (рис. 4.10 б). Отримані результати, що відображають вплив рН на ріст досліджуваних бактерій, використані при глибинному культивуванні мікроорганізмів, що розглядаються, на живильному середовищі, приготовленій на основі ферментолізату клітковини рисового лушпиння.

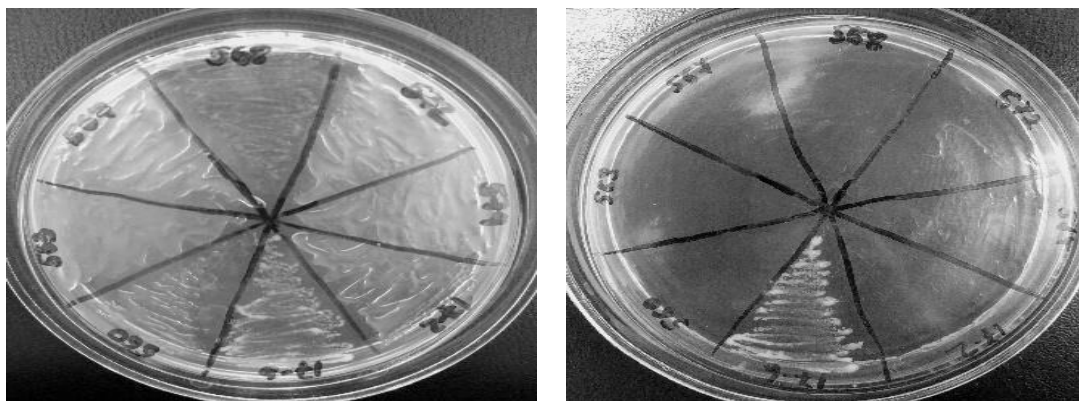


Рисунок 4.10 – Характер росту штамів бактерій *P. mucilaginosus* 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 та штаму *P. salinicaeni* 17-6 на агаризованому

живильному середовищі з ферментолізатом клітковини температурі 30 ± 1 °С протягом 72 год при рН а) $7,3 \pm 0,2$; б) $5,5 \pm 0,2$

Проведено глибоке культивування штамів бактерій *P. mucilaginosus* 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 і штаму *P. salinicaeni* 17-6 на живильному середовищі, приготовленому на основі ферментолізату клітковини, клітковини, ферментованої олії.

Слід зазначити, що в початковий період культивування досліджуваних бактерій на живильному середовищі з ферментолізатом рисового лушпиння відбувається зміна рН культуральної рідини у бік кисліших значень, мабуть, це пов'язано з накопиченням органічних кислот (див. рис. 4.11).

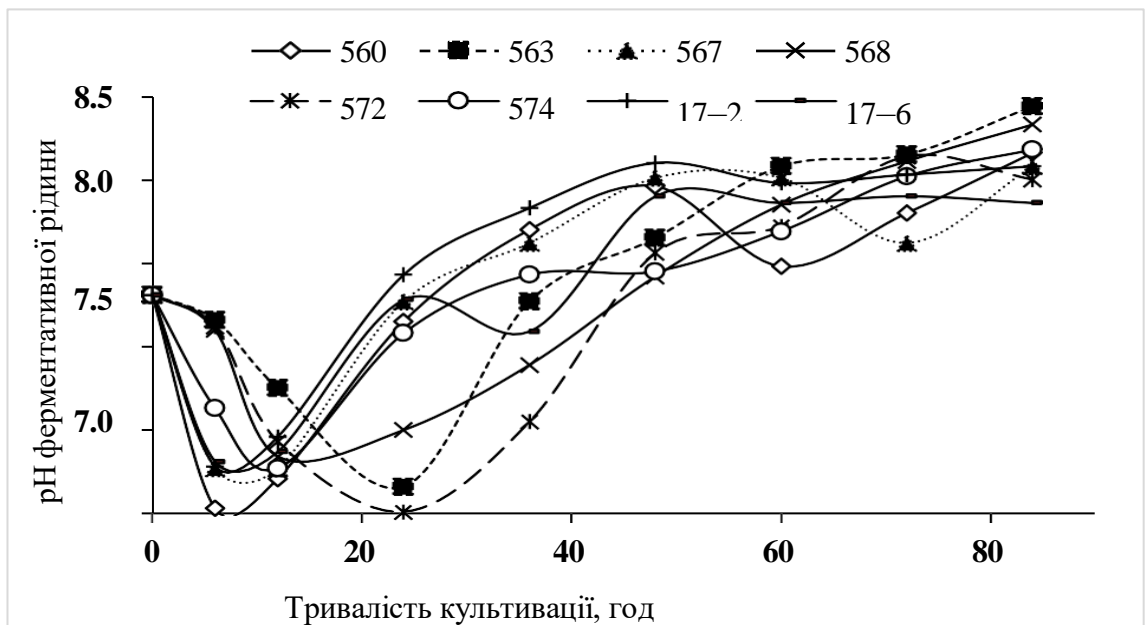


Рисунок 4.11 – Зміна рН культуральної рідини при культивуванні бактерій *P. mucilaginosus* та *P. salinicaeni* на живильному середовищі з ферментолізатом клітковини рисового лушпиння, нейтралізованого гідроксидом кальцію

За подальшого культивування рН середовища підвищується. Збільшення рН середовища може бути обумовлено двома причинами. З одного боку, збільшення рН, можливо, пов'язане з деградацією білків та амінокислот, що спочатку присутні у ферментолізаті клітковини рисового лушпиння (табл. 4.5), в аміак, який підвищує рН середовища до слаболужного [20]. З іншого боку, при аеробному диханні мікроорганізмів збільшується концентрація аніонів

CO_3^{2-} в живильному середовищі, які, можливо, вступають у реакцію з катіоном кальцію, присутнім у середовищі, з утворенням нерозчинної солі CaCO_3 , що сприяє збільшенню рН середовища [21].

Були визначені параметри зростання штамів бактерій *P. mucilaginosus* і *P. salinicaeni* при глибинному культивуванні на живильному середовищі з ферментативним гідролізатом лушпиння рису (див. табл. 4.6).

Таблиця 4.6 – Параметри росту бактерій *P. mucilaginosus* та *P. salinicaeni* при культивуванні на живильному середовищі з ферментолізат клітковини рисового лушпиння після нейтралізації гідроксидом кальцію при температурі 30 ± 1 °С протягом 72 год

| Штами бактерій | Питома швидкість росту, год ⁻¹ | Час генерації, год | Концентрація біомаси, г/л | Споживання РР, % | Вміст в КР, г/л |
|-----------------------------|---|--------------------|---------------------------|------------------|-----------------|
| <i>P.mucilaginosus</i> 560 | 0,21±0,02 | 3,33±0,03 | 2,37±0,20 | 86,36±4,50 | 2,62±0,10 |
| <i>P.mucilaginosus</i> 563 | 0,09±0,02 | 9,98±0,25 | 2,17±0,20 | 81,10±4,50 | 3,30±0,12 |
| <i>P.mucilaginosus</i> 567 | 0,14±0,01 | 4,96±0,04 | 2,96±0,20 | 78,48±4,50 | 2,25±0,08 |
| <i>P.mucilaginosus</i> 568 | 0,12±0,01 | 5,57±0,04 | 2,96±0,20 | 82,42±4,50 | 3,10±0,12 |
| <i>P.mucilaginosus</i> 572 | 0,10±0,01 | 6,81±0,04 | 2,17±0,20 | 83,73±4,50 | 3,46±0,13 |
| <i>P.mucilaginosus</i> 574 | 0,08±0,01 | 8,99±0,03 | 2,37±0,20 | 77,16±4,50 | 3,06±0,11 |
| <i>P.mucilaginosus</i> 17-2 | 0,15±0,01 | 4,52±0,04 | 2,17±0,20 | 67,97±4,50 | 1,90±0,07 |
| <i>P. salinicaeni</i> 17-6 | 0,16±0,02 | 4,39±0,04 | 2,96±0,20 | 70,60±4,50 | 3,06±0,11 |

Показано, що біомаса, синтезована штамми бактерій, що розглядаються *P. mucilaginosus* і *P. salinicaeni* при культивуванні на живильному середовищі, в якому 0,5% РР були введені з ферментолізат клітковини рисового лушпиння, знаходилася в діапазоні від 2,17 до 2,96 г/л. Ефективність споживання РР становила 67 – 86 %.

Як впливає з представлених результатів у таблиці 5.4, за питомою швидкістю зростання, часом генерації та споживання РВ найбільш ефективно протікає культивування на живильному середовищі з ферментолізат клітковини рисової лушпиння штаму *P. mucilaginosus* 560.

Зі зростанням бактерій *P. mucilaginosus* і *P. salinicaeni* у живильне середовище виділялися целюлази, целобіази, ксиланази, які сприяли ферментативному гідролізу олігомерів клітковини рисової лушпиння в живильному середовищі до глюкози та ксилози. До кінця культивування після

відділення бактеріальних клітин центрифугуванням культуральної рідини були присутні білки концентрацією від 1,90 до 3,46 г/л. На це вказує значення активності ферментів, що представлені на малюнку 5.6, та питомої активності ферментів, представлених на рис. 4.12.

У випадку для позаклітинних ферментів, зокрема целюлази, секретуваної бактеріями *P. mucilaginosus* та *P. salinicaeni*, спостерігаються один або два піки активності. Для кожного штаму є пік активності з характерним часом інкубації (рис. 5.6а). При культивуванні штамів бактерій *P. mucilaginosus* 560, 563, 567, 568, 572 та штаму *P. salinicaeni* 17-6 з'являвся перший пік після 12 год культивування та штамів бактерій *P. mucilaginosus* 574 та 17-2 – після 24 год культивування. Другий пік активності виявлявся після 48 годин культивування штамів бактерій *P. mucilaginosus* 560, 568 та штамів бактерій *P. mucilaginosus* 563, 572, 574, 17-2 та *P. salinicaeni* 17-6 після 72 год культивування. Коливання ферментативної активності бактерій, що спостерігається, може бути пов'язане з синтезом бактеріями позаклітинних полісахаридів, які на іншій фазі росту можуть бути додатковим джерелом вуглецю для бактерій. Відзначено максимальну активність целюлази після 12 годин культивування штаму *P. mucilaginosus* 560, яка досягає до 2 од/мл (рис. 5.6а) або 1199 од/г білка, відповідно, за питомою активністю (рис. 4.12 а) при зниженні рН середовища до 6.0.

Крім целюлази в культуральній рідині встановлено наявність ксиланази, що гідролізує β -глікозидні зв'язки в молекулі гетерогенного полісахариду ксилану з утворенням олігосиланів меншої молекулярної маси аж до мономерної сполуки – ксилози. Максимальна активність ксиланази спостерігалася після 48 годин та 72 годин при культивуванні штамів бактерій

P. mucilaginosus 560 та 563 при підвищенні рН середовища до 8,0. При цьому активність ксиланази досягала 7 од/мл (рис. 4.12 б) або 2046 од/г білка, відповідно, за питомою активністю (рис. 4.12 б).

Слід зазначити, що це досліджувані штами бактерій *P. mucilaginosus* і *P. salinicaeni* мали незначну активність целобіази (нижче 1 од/мл, рис. 4.12 в) при

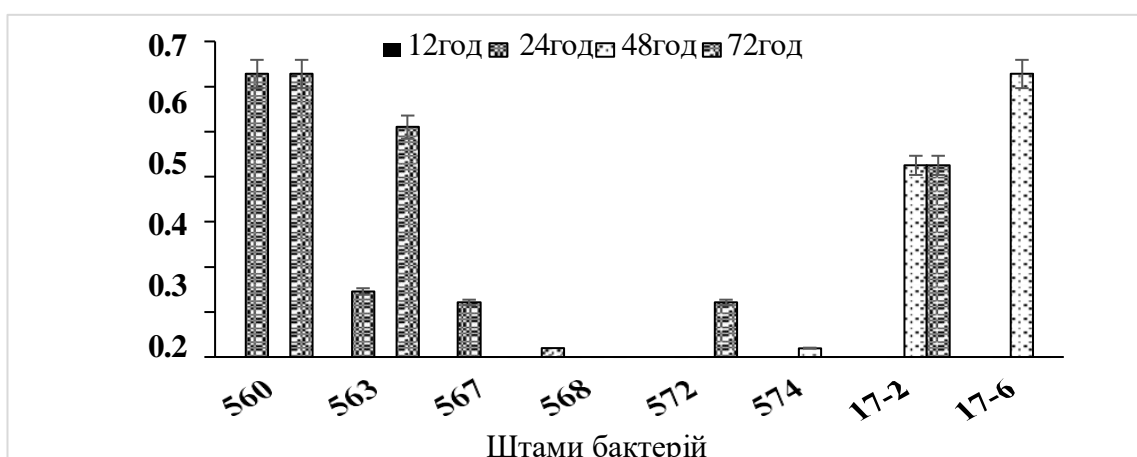
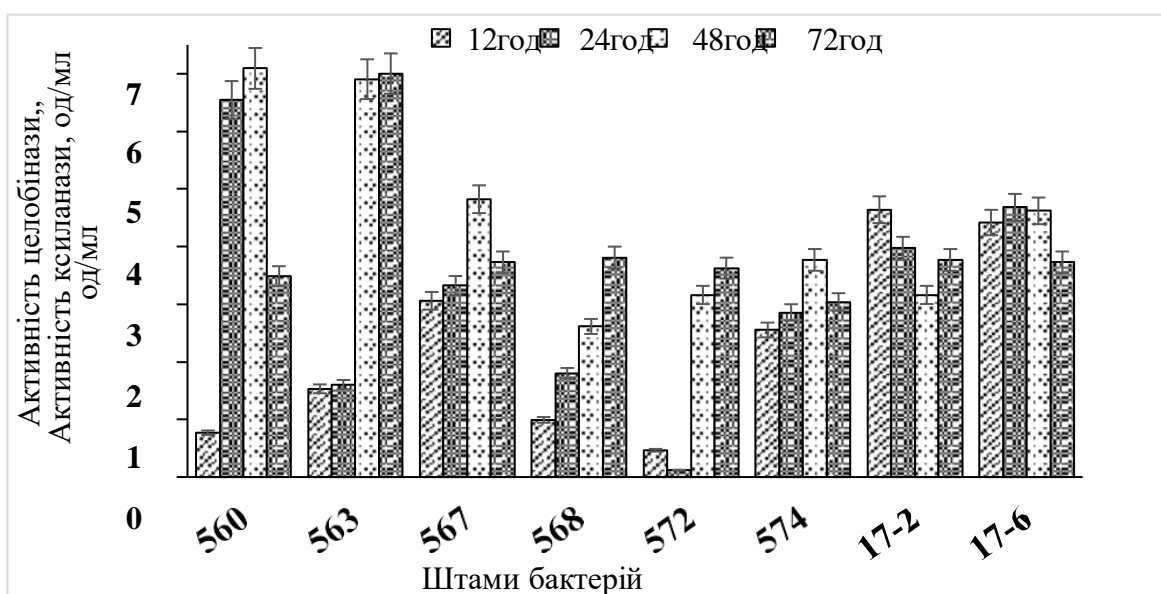
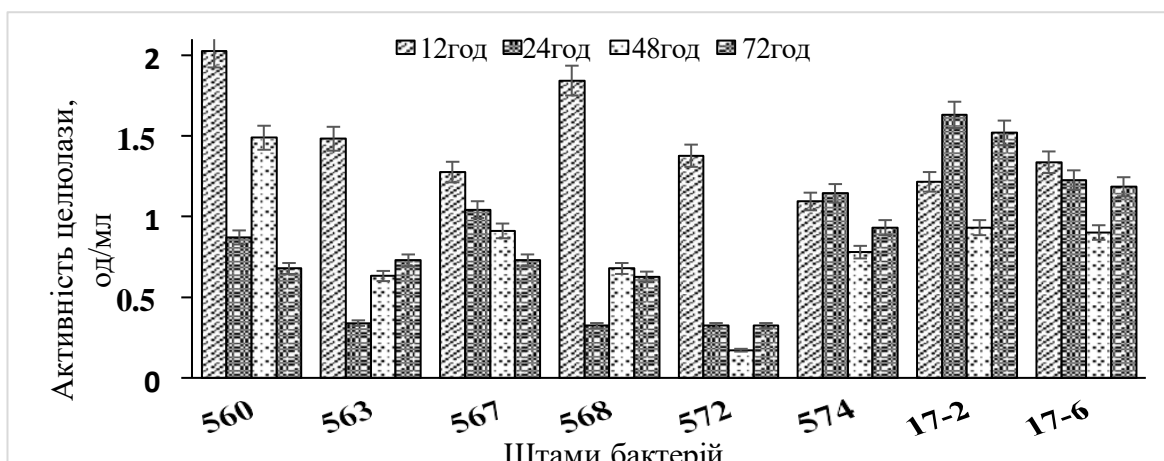


Рисунок 5.6 – Активність целюлази (а), ксиланази (б) та целобіази (в), що синтезуються бактеріями *P. musilagenosus* та *P. salinicaeni* при глибинному культивуванні на живильному середовищі з ферментолізатом клітковини рисового лушпиння (швидкість перемішування 1,1°C)

їх культивуванні на живильному середовищі з ферментолізат рисового лушпиння. Максимальна активність целобіази 0,63 од/мл та питома активність 231 од/г білка досягалися після 24 год і 72 год культивування для штаму *P. mucilaginosus 560* та після 48 год культивування для штаму *P. salinicaeni 17-6*.

Таким чином, біосинтез позаклітинних целюлази та целобіази відбувається на логарифмічній стадії культивування, тоді як ксиланаза секретувалася у стаціонарній фазі росту бактерій *P. mucilaginosus* та *P. salinicaeni* з великою активністю після, відповідно, 48 год та 72 год культивування. При цьому активність ксиланази вища, ніж активність целюлази та целобіази, що узгоджується з переважанням у субстраті ксилози, відповідно до даних ГРХ, наведених у таблиці 4.5.

Виходячи з представлених результатів можна зробити висновок, що для отримання гідролітичного ферменту, зокрема, ксиланази, найбільша ефективність досягається при культивуванні штаму *P. mucilaginosus 560* на живильному середовищі з ферментолізат клітковини рисової лушпиння [25]. Враховуючи високу активність ксиланази порівняно з іншими ферментами, подальші дослідження були спрямовані на пошук умов культивування штаму *P. mucilaginosus 560*, які забезпечують максимальну активність ксиланази.

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА ПРАЦІ

5.1. Аналіз небезпечних і шкідливих виробничих факторів, які можуть виникнути при виробництві біопрепаратів з використанням мікроорганізмів

При виробництві біопрепаратів з використанням мікроорганізмів можливі різноманітні небезпечні та шкідливі виробничі фактори, які можуть негативно вплинути на здоров'я працівників і навколишнє середовище. Зокрема, такі фактори можна поділити на біологічні, хімічні, фізичні, механічні та екологічні.

Біологічні ризики. Інфекційні захворювання, при роботі з мікроорганізмами є ризик інфікування працівників. Особливо небезпечними є патогенні або умовно патогенні мікроорганізми, а також спори деяких грибів, які можуть викликати серйозні інфекції у людей, що контактують з ними. Інфекція може передаватися через повітря, шкіру або слизові оболонки.

Алергічні реакції. Деякі мікроорганізми або їх продукти життєдіяльності (наприклад, спори грибів або продукти ферментації) можуть викликати алергічні реакції у працівників. Це може включати дерматити, респіраторні захворювання (бронхіти, астму) або навіть анафілактичні реакції при потрапленні алергенів у організм.

Важливою проблемою є ризик забруднення кінцевого продукту патогенними мікроорганізмами. Це може статися в результаті недостатнього контролю технологічного процесу або недотримання санітарних норм, що призведе до зниження якості продукції або навіть її небезпечності для споживачів.

Хімічні ризики. Токсичність хімічних речовин. Для зростання мікроорганізмів можуть використовуватись різноманітні хімічні речовини, наприклад, органічні розчинники, добрива, кислотні або лужні розчини. Неправильне поводження з цими хімікатами може призвести до отруєння

працівників, пошкодження шкіри та слизових оболонок, а також загроз для дихальних шляхів.

У процесах ферментації або інших біотехнологічних операціях можуть утворюватися токсичні гази, такі як аміак, сірководень, метан або вуглекислий газ. При недостатній вентиляції або порушеннях в технології, ці гази можуть накопичуватися в приміщенні та спричиняти отруєння або серйозні проблеми з дихальною системою.

Небезпечні продукти життєдіяльності мікроорганізмів.

Мікроорганізми можуть продукувати токсичні сполуки в процесі свого метаболізму, які можуть бути шкідливими для працівників, особливо якщо ці продукти не були видалені з технологічної системи.

Фізичні фактори. Виробничі процеси, особливо в автоматизованих або механізованих установках для культивування мікроорганізмів, можуть генерувати високий рівень шуму. Постійне перебування у шумному середовищі може призвести до втрати слуху, підвищеної стомлюваності та стресу.

Висока температура. Процеси, що потребують підвищених температур для зростання мікроорганізмів (наприклад, ферментація), можуть створювати небезпеку перегріву або термічних опіків для працівників, якщо не будуть дотримані відповідні температурні режими та безпечні умови роботи.

При обробці сировини або на стадії виготовлення деяких біопрепаратів може виникати пил, що містить мікроорганізми або інші шкідливі компоненти. Пил може проникати в дихальні шляхи працівників і спричиняти респіраторні захворювання, такі як пилові бронхіти або астму.

Механічні ризики. Виробничі процеси потребують роботи з різноманітним обладнанням, таким як біореактори, насосні установки, транспортери, системи автоматичного контролю тощо. Несправності або неправильне використання цього обладнання можуть призвести до травмування працівників, включаючи порізи, удари, або навіть серйозні нещасні випадки.

Механічні збої у роботі біореакторів чи інших виробничих установок можуть призвести до витоку токсичних або небезпечних речовин, що загрожує здоров'ю працівників або довкіллю. Також можливо забруднення продукції через недотримання технологічного процесу.

Екологічні фактори – забруднення навколишнього середовища. Викиди шкідливих речовин у повітря, воду або ґрунт можуть статися внаслідок несанкціонованого викиду відходів або поганого контролю за виробничими відходами. Це може мати серйозні наслідки для місцевої екосистеми, включаючи забруднення води, ґрунтів та повітря.

Поширення генетично змінених організмів. Використання генетично модифікованих мікроорганізмів для виробництва біопрепаратів може створювати ризик їх випадкового поширення в навколишнє середовище. Це може порушити екологічний баланс та призвести до небажаних наслідків, таких як інтеграція чужорідних генів в природні популяції мікроорганізмів.

Таким чином, при виробництві біопрепаратів з використанням мікроорганізмів важливо враховувати різноманітні фактори, що можуть загрозувати здоров'ю працівників і екології, і вживати відповідних заходів для зменшення цих ризиків.

5.2. Розробка заходів по запобіганню дії небезпечних та шкідливих виробничих факторів і покращенню умов праці

5.2.1. Заходи запропоновані для усунення небезпечних та шкідливих виробничих факторів

Для забезпечення безпечних умов праці при виробництві біопрепаратів з використанням мікроорганізмів, необхідно вжити комплекс наступних заходів з охорони праці, спрямованих на усунення або зменшення небезпечних та шкідливих виробничих факторів.

Забезпечення санітарно-гігієнічних умов. Встановлення системи вентиляції для запобігання накопиченню шкідливих газів та парів. Регулярний контроль за мікрокліматом (температура, вологість, рівень пилу, освітлення) у

виробничих приміщеннях. Використання спеціальних фільтрів для очищення повітря від патогенних мікроорганізмів.

Використання засобів індивідуального захисту (ЗІЗ). Обов'язкове використання спецодягу (халати, рукавички, маски, окуляри, респіратори) для захисту працівників від контакту з мікроорганізмами. Засоби захисту органів дихання для працівників, які працюють з леткими хімічними речовинами та спорами мікроорганізмів.

Контроль за станом біобезпеки. Визначення небезпечних груп мікроорганізмів за класами патогенності та вжиття заходів щодо обмеження доступу до них (наприклад, в обмежених або герметичних приміщеннях). Проведення періодичних медичних оглядів працівників, які мають справу з патогенними мікроорганізмами. Обов'язкове проходження навчання та інструктажу з охорони праці для всіх працівників.

Управління хімічними ризиками. Організація правильного зберігання хімічних речовин, які використовуються для виготовлення біопрепаратів, з чітким маркуванням і дотриманням вимог безпеки. Проводити регулярні перевірки стану обладнання для уникнення витоків хімічних речовин.

Технічне оснащення та механізація. Використання автоматизованих систем для контролю за умовами технологічного процесу (температура, вологість, тиск) для запобігання надзвичайним ситуаціям. Застосування герметичних установок та апаратів для роботи з мікроорганізмами, щоб уникнути їх викидів у навколишнє середовище. Оновлення та своєчасний ремонт обладнання.

Організація регулярних перевірок протипожежного обладнання та виходів на випадок евакуації. Забезпечення наявності вогнегасників, а також спеціальних систем пожежогасіння у виробничих приміщеннях.

Визначення і організація правильного зберігання та утилізації відходів виробництва, що можуть містити шкідливі або патогенні мікроорганізми. Застосування технологій, що дозволяють мінімізувати утворення відходів, або їх безпечну обробку перед утилізацією.

Регулярне проведення інструктажів з охорони праці для всіх працівників, включаючи навчання з безпеки при роботі з біопрепаратами та мікроорганізмами. Ознайомлення з планами дій у разі аварійних ситуацій (пожеж, викидів, аварійного викиду мікроорганізмів).

Регулярне медичне обстеження для виявлення можливих захворювань, пов'язаних з впливом мікроорганізмів. Виявлення та контроль за ранніми ознаками інфекційних захворювань у працівників.

Ці заходи дозволяють не лише зменшити ризики, але й забезпечити безпеку працівників при виробництві біопрепаратів з використанням мікроорганізмів.

5.2.2. Вибір і обґрунтування засобів індивідуального захисту

Засоби індивідуального захисту (ЗІЗ) є важливим елементом охорони праці при виробництві біопрепаратів з використанням мікроорганізмів. Вони забезпечують безпеку працівників, запобігаючи контакту з небезпечними біологічними агентами, токсичними хімічними речовинами та іншими потенційними загрозами. При цьому повинні бути застосовані наступні засоби захисту.

Респіратори та маски. В залежності від ризиків для органів дихання застосовуються різні типи респіраторів: одноразові маски, респіратори з фільтруючими елементами (FFP2, FFP3) та спеціалізовані респіратори, які можуть бути оснащені газовими фільтрами.

Мікроорганізми, які використовуються в процесі виробництва біопрепаратів, можуть бути в аерозольному стані, що підвищує ризик інгаляції. У випадку роботи з патогенними або потенційно небезпечними мікроорганізмами, такими як генетично модифіковані організми (ГМО), респіратори з високим рівнем фільтрації (FFP3) є важливими для запобігання інгаляції часток, що можуть викликати інфекційні захворювання або отруєння.

Важливо, щоб респіратор був підібраний за розміром і забезпечував герметичне прилягання до обличчя. Для зручності працівників можливе

використання респіраторів із зручними клапанами для зниження накопичення вологи всередині.

Захисний одяг. Спеціальні комбінезони або халати з матеріалів, що не пропускають біологічні агенти та хімічні речовини (наприклад, брезент, спеціальні полімери). Одяг може бути одноразовим або багаторазовим, що забезпечує високу ефективність при збереженні можливості стерилізації.

Основне завдання захисного одягу – запобігти прямому контакту з біопрепаратами, мікроорганізмами або хімічними речовинами, що використовуються при їх виробництві. Особливо важливо при роботі з патогенами, генетично модифікованими організмами чи іншими потенційно небезпечними речовинами.

Захисний одяг повинен бути стійким до проникнення біологічних агентів, не містити пористих матеріалів, які можуть дозволяти потрапляння мікроорганізмів. Особливо необхідно звернути увагу на можливість його дезінфекції або стерилізації після використання.

Рукавички. Нітрилові, латексні або неопренові рукавички, що мають високу стійкість до механічних пошкоджень, проникнення біологічних агентів та хімічних сполук. При роботі з культурами мікроорганізмів важливо захистити шкіру рук від можливих інфекцій та подразнень, особливо при роботі з агресивними хімічними речовинами або мікроорганізмами, що можуть бути токсичними або патогенними.

Рукавички повинні бути стерильними в умовах лабораторії та виробництва біопрепаратів. Потрібно регулярно міняти рукавички після кожного контакту з матеріалами, що можуть бути забруднені мікроорганізмами.

Захист очей та обличчя. Захисні окуляри або щитки для обличчя, які забезпечують захист від потрапляння аерозолів, крапель або хімічних речовин.

Очі та обличчя є найбільш вразливими органами при роботі з біопрепаратами, оскільки мікроорганізми можуть потрапити в організм через

слизові оболонки. Особливо важливо забезпечити захист при роботі з суспензіями мікроорганізмів, що можуть розпилюватися у повітрі.

Для захисту очей можуть використовуватись як стандартні окуляри, так і більш повноцінні щитки, які покривають обличчя і захищають не тільки очі, але й слизові оболонки носа та рота.

Захисні черевики. Водонепроникні черевики або чоботи з антибактеріальним покриттям, що легко очищаються та дезінфікуються.

Під час виробничого процесу можуть утворюватися забруднення або розливи біологічних агентів чи хімічних речовин. Захисні черевики допомагають запобігти контакту з такими речовинами, особливо в умовах високої вологості або розливу. Черевики повинні бути стійкими до мікроорганізмів, легко очищатися та дезінфікуватися після роботи, що дозволяє знизити ризики контамінації.

Системи вентиляції та аерозольні біосигнали. Використання локальних відсмоктувачів, систем вентиляції з фільтрами для очистки повітря, а також біосигналів для моніторингу концентрації мікроорганізмів у повітрі.

Оскільки мікроорганізми можуть бути у вигляді аерозолів, які розповсюджуються в повітрі, важливо мати належну вентиляцію та системи для відслідковування їх концентрації в робочому середовищі. Це дозволяє значно знизити ризики зараження або інтоксикації. Важливо періодично проводити контроль за працездатністю вентиляційних систем, а також використовувати спеціальні фільтри для очищення повітря від біологічних часток.

Вибір та застосування ЗІЗ є комплексним процесом, який залежить від специфіки виробничих умов, виду мікроорганізмів, з якими працюють, і рівня потенційної небезпеки для працівників. Окрім цього, важливою частиною є навчання персоналу правильному використанню засобів захисту та дотримання стандартів безпеки на робочих місцях. У результаті застосування комплексного підходу до вибору ЗІЗ, можна забезпечити ефективний захист працівників від небезпечних агентів у процесі виробництва біопрепаратів.

5.2.3. Розробка інструкції з охорони праці

Інструкція встановлює вимоги до охорони праці, які повинні бути виконані всіма працівниками підприємства, що займаються виробництвом біопрепаратів з використанням мікроорганізмів.

Всі працівники підприємства повинні пройти вступний інструктаж з охорони праці, а також інструктажі з безпеки перед виконанням конкретних робіт. Працівники, які мають контакт з мікроорганізмами, повинні бути забезпечені необхідними засобами індивідуального захисту та спецодягом.

Загрози та ризики:

- інфекційні захворювання, що можуть бути спричинені патогенними мікроорганізмами;
- зараження через аерозолі, а також прямий контакт з культурами мікроорганізмів;
- використання токсичних або корозійних хімічних реагентів (наприклад, для стерилізації обладнання);
- загроза забруднення навколишнього середовища через витіки хімікатів.

Ризик травмування при роботі з обладнанням для вирощування та обробки мікроорганізмів (наприклад, автоклави, центрифуги);

- порушення технічного стану обладнання, яке може призвести до нещасних випадків.
- наявність легкозаймистих хімічних речовин, які використовуються в процесі виготовлення біопрепаратів;
- виникнення пожеж через несправність електричного обладнання.

Перед початком роботи всі працівники повинні пройти медичний огляд, особливо якщо вони працюють з патогенними мікроорганізмами. Працівники повинні бути вакциновані від основних інфекцій, що можуть виникнути при контакті з мікроорганізмами (якщо це рекомендовано медичними стандартами).

Усі працівники, які працюють безпосередньо з мікроорганізмами, повинні бути забезпечені засобами індивідуального захисту: спеціальними костюмами, рукавичками, масками, окулярами, респіраторами, а також дезінфікуючими засобами.

В залежності від рівня небезпеки мікроорганізмів, можуть застосовуватися біологічні кабінети, що забезпечують герметичність і захист від аерозолів.

На виробничих ділянках повинні бути забезпечені належні санітарні умови: наявність умивальників, туалетів, місць для прання спецодягу та захисних засобів. Після закінчення роботи працівники повинні пройти обов'язкову дезінфекцію рук, а також змінити спецодяг. Приміщення повинні піддаватися регулярній дезінфекції і вентиляції.

Патогенні або умовно патогенні мікроорганізми повинні зберігатися в спеціально відведених приміщеннях з відповідними умовами безпеки. Зберігання культур мікроорганізмів повинно відбуватися в герметичних контейнерах та холодильниках, які підлягають регулярному технічному огляду.

Процес вирощування та обробки мікроорганізмів повинен відбуватися з дотриманням строгих правил стерильності, щоб мінімізувати можливість зараження працівників.

Всі прилади та устаткування, які використовуються для вирощування мікроорганізмів, повинні бути сертифіковані і відповідати вимогам безпеки.

Регулярно проводити перевірку та обслуговування автоклавів, центрифуг, біологічних кабін, холодильників і систем вентиляції для забезпечення безпечних умов роботи.

Приміщення повинні бути обладнані системою вентиляції, яка запобігає накопиченню аерозолів та шкідливих газів.

Для роботи з патогенними мікроорганізмами повинні використовуватися біологічні кабінети з фільтрацією повітря.

Необхідно підтримувати оптимальні температурні та вологісні умови для росту мікроорганізмів, а також для зберігання біопрепаратів. Потрібно регулярно перевіряти температурний режим в холодильниках та інкубаторах.

Усі робочі поверхні, обладнання та інструменти повинні бути регулярно очищені та дезінфіковані. Працівники повинні мити руки після виконання робіт з мікроорганізмами, а також після використання хімічних реагентів. Спецодяг має змінюватися після кожної зміни або після виконання робіт, що можуть бути пов'язані з інфекційними або токсичними агентами. Спецодяг повинен регулярно піддаватися дезінфекції.

При попаданні мікроорганізмів на шкіру або в органи дихання необхідно негайно промити заражену ділянку водою та звернутися до медичного працівника для додаткової допомоги.

У разі отруєння токсичними речовинами (якщо використовуються хімікати для обробки культур) необхідно швидко надати потерпілому першу допомогу, наприклад, промити шлунок, забезпечити доступ свіжого повітря та викликати швидку допомогу. У разі отримання травм або нещасних випадків на виробництві слід негайно звертатися до медичного працівника або викликати швидку допомогу.

5.3. Розробка заходів з пожежної профілактики

Заходи з пожежної профілактики при виробництві біопрепаратів з використанням мікроорганізмів мають на меті забезпечення безпеки працівників, збереження обладнання та мінімізацію ризиків виникнення пожеж. Основні заходи наступні.

Використання електричних приладів, які відповідають стандартам безпеки, з урахуванням вибухонебезпечних та пожежонебезпечних умов. Застосування систем автоматичного відключення електричного обладнання у випадку перевантаження або короткого замикання. Установка електрообладнання з заземленням і заборона на використання несправних або неперевірених пристроїв.

Забезпечення ефективної вентиляції для запобігання накопиченню вибухових та токсичних газів. Контроль вологості та температури в приміщеннях, де зберігаються та обробляються біопрепарати, оскільки деякі мікроорганізми можуть бути чутливими до таких умов. Регулярне очищення вентиляційних систем для запобігання накопиченню пилу та бруду, що можуть стати джерелом загоряння.

Наявність вогнегасників, системи автоматичного пожежогасіння, спеціальних запасів піщаних або водяних вогнегасників у виробничих та складських приміщеннях. Перевірка та технічне обслуговування системи пожежогасіння на регулярній основі. Розміщення знаків пожежної безпеки, евакуаційних виходів та інструкцій щодо дій у разі пожежі.

Обмеження використання легкозаймистих матеріалів у виробничих приміщеннях, їх зберігання в спеціальних, вентильованих контейнерах. Приміщення для зберігання таких матеріалів повинні бути оснащені пожежними системами та відокремлені від основного виробничого процесу.

Проведення навчань для персоналу з правил безпеки при роботі з біопрепаратами та використанні обладнання. Оновлення знань щодо першочергових дій у разі виникнення пожежі та аварійних ситуацій. Ознайомлення з інструкціями щодо безпечного використання хімічних речовин і біопрепаратів, що можуть бути у складі продукції.

Моніторинг температури та вологості в процесі виробництва, щоб уникнути перегріву і загоряння через хімічні реакції. Використання інструментів для контролю температури та виявлення перевищень нормальних значень.

Огляд та обслуговування всього обладнання та електричних систем для своєчасного виявлення можливих пошкоджень, які можуть спричинити коротке замикання або загоряння. Перевірка герметичності резервуарів та контейнерів для запобігання витокам легкозаймистих газів.

Висновки по розділу

В розділі виконаний аналіз небезпечних і шкідливих виробничих факторів, які можуть виникнути при виробництві біопрепаратів з використанням мікроорганізмів. При виробництві біопрепаратів з використанням мікроорганізмів можливі різноманітні небезпечні та шкідливі виробничі фактори, які можуть негативно вплинути на здоров'я працівників і навколишнє середовище. Зокрема, такі фактори можна поділити на біологічні, хімічні, фізичні, механічні та екологічні.

Розроблені заходи по запобіганню дії небезпечних та шкідливих виробничих факторів і покращенню умов праці та рекомендації по вибору і обґрунтуванні засобів індивідуального захисту, інструкція з охорони праці та заходи з пожежної профілактики.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що ефективний синтез біомаси та ЕПС штамом *P. mucilaginosus 574* проходить в живильному середовищі з мелясою без додаткового внесення мінеральних речовин та азоту. При цьому вихід цих продуктів відповідає виходу при культивуванні штаму *P. mucilaginosus 574* на живильному середовищі, що містить сахарозу. Це вказує на економічну доцільність використання меляси без додаткового внесення мінеральних речовин та азоту для культивування штаму *P. mucilaginosus 574*.

2. Встановлено, що для підвищення продуктивності синтезу біомаси та ЕПС штамом *P. mucilaginosus 574* рекомендується культивування проводити на живильному середовищі, що містить 2% меляси з додаванням 0,1% кукурудзяного екстракту в якості індуктора ЕПС і $\pm 0,2$. У цих умовах зазначений штам досягає концентрації 10^8 КУО/мл життєздатних клітин та синтезує 9,6 г/л екзополісахаридів.

3 Штам *P. mucilaginosus 574* володіє високою ефективністю у покращенні доступності поживних речовин для рослин. Зокрема, мікроорганізми цього виду здатні розчиняти мінеральні сполуки фосфору та калію, що робить їх важливими для підвищення родючості ґрунтів і зменшення залежності від хімічних добрив.

4 Біопрепарати на основі мікроорганізмів є економічно вигідними, оскільки їхнє виробництво потребує менших витрат у порівнянні з синтетичними засобами. Крім того, застосування таких препаратів знижує витрати на внесення мінеральних добрив і пестицидів, що є актуальним для сталого сільського господарства.

5 Біопрепарати, створені на основі *P. mucilaginosus 574*, є екологічно безпечними та не накопичуються в навколишньому середовищі. Вони знижують токсичне навантаження на екосистему, запобігаючи забрудненню ґрунтів і вод хімічними речовинами.

6 Інтеграція біопрепаратів на основі *P. mucilaginosus 574* у сільськогосподарські технології відповідає міжнародним стандартам сталого

розвитку. Це сприяє зниженню залежності від викопних ресурсів і забезпечує довгострокову екологічну безпеку сільськогосподарського виробництва.

Таким чином, екологічне обґрунтування використання мікроорганізмів, зокрема штаму *P. mucilaginosus* 574, демонструє значний потенціал для вирішення актуальних проблем у сільському господарстві, включаючи відновлення ґрунтів, зниження токсичного навантаження та забезпечення продовольчої безпеки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Vejan P., Abdullah R., Khadiran T., Ismail S., Nasrulhaq Boyce A.. *Molecules*. 2016 Apr 29;21(5):573. doi: 10.3390/molecules21050573. PMID: 27136521
2. Aloo B.N., Makumba B.A., Mbega E.R. *Microbiol Res*. 2019 Feb;219:26-39. doi: 10.1016/j.micres.2018.10.011.
3. Ольга Медведєва, Аліна Дяків. Екологічна оцінка ефективності використання бактерій роду *Paenibacillus* при виробництві біопрепаратів: матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні технології агропромислового виробництва» (м. Кропивницький, 14-15 листопада 2024 р), ЦНТУ, 2024 С. 35-36.
4. Igiehon N.O., Babalola O.O. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017 Jun;101(12):4871-4881. doi: 10.1007/s00253-017-8344-z.
5. Chen S., Waghmode T.R., Sun R., Kuramae E.E., Hu C., Liu B.. *Microbiome*. 2019 Oct 22;7(1):136. doi: 10.1186/s40168-019-0750-2.
6. Agbodjato N.A., Babalola O.O.. *Peer J*. 2024 Apr 15;12:e16836. doi: 10.7717/peerj.16836.
7. Avis, T.J. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*. 2008. Vol. 40. pp. 1733-1740.
8. Kang, B. G. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnology Reports*. 2010. Vol. 4. № 3. pp. 179-183.
9. Ahemad, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*. 2014. Vol. 26. № 1. pp. 1-20.
10. Van Loon, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. In *New perspectives and approaches in plant growth-promoting. Rhizobacteria research*. Springer, Dordrecht, 2007. pp. 243-254.
11. Compant, S. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and

endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*. 2010. Vol. № 5. pp. 669-678.

12. Wang, L. Y. Chen S. F. *Paenibacillus beijingensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from wheat rhizosphere soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2013. Vol. 104. № 5. pp.675-83.

13. Dean, D. R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: Stacey, G., Burris, R. H., Evans, H. J. (eds) *Biological nitrogen fixation*. Chapman and Hall. New York, 1992. pp. 763-817.

14. Ahemad, M. Ecological assessment of biotoxicity of pesticides towards plant growth - promoting activities of pea (*Pisum sativum*)-specific *Rhizobium* sp. *Strainmrp* Emirates Journal of Food and Agriculture. 2012. pp. 334-343.

15. Bhattacharyya, P. N. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012. Vol. 28. № 4. pp. 1327-1350.

16. Glick, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. 2012. pp. 2012.

17. Marroquí, S. Enhanced symbiotic performance by *Rhizobium tropici* glycogen synthase mutants. *Journal of Bacteriology*. 2021. Vol. 183. № 3. pp. 854-864.

18. Ramírez, M. *Rhizobium etli* genetically engineered for the heterologous expression of *Vitreoscilla* sp. hemoglobin effects on free-living symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. 2019. Vol. 12. pp. 1008–1015

19. Bhattacharjee, R. B. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied microbiology and biotechnology*. 2008. Vol. 80. № 2. pp. 199-209.

20. Bhuvaneshwari, K. Agronomic potential of the association *Azolla-Anabaena*. *Scientific Research and Reports*. 2013. Vol. 3. № 1. pp. 78–82.

21. Feng, K. Effect of organic ligands on biological availability of inorganic phosphorus in soils. *Pedosphere*. 2004. Vol. 14. № 1. pp. 85-92.

22. Khan, M. S. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. *Agronomic Sustainable Development*. 2017. Vol. 27. pp. 29–43.
23. Jeffries, P. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils*. 2023. Vol. 37. pp. 1–16.
24. Rodriguez, H. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. / *Biotechnology Advances*. 2019. Vol. 17. pp. 319–339.
25. Sharma, S. B. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus*. 2013. Vol. 2. № 1. pp. 587.
26. Öğüt, M. Increased proton extrusion of wheat roots by inoculation with phosphorus solubilising microorganism. *Plant and soil*. 2021. Vol. 339. № 1-2. pp. 285-297.
27. Kpombrekou, K. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science*. 2019. Vol. 158. pp. 442–453.
28. Tao, G. C. Phosphate-solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*. 2018. Vol. 18. pp. 515–523.
29. Ponmurugan, P. In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. *African Journal of Biotechnology*. 2021. Vol. 5. № 4. pp. 348-350.
30. Gyaneshwar, P. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*. 2022. Vol. 245. pp. 83–93.
31. Bashan, Y. Long-term survival of the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019. Vol. 51. pp. 262–266.
32. Matias, S. R. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. *European Journal of Soil Biology*. 2019. Vol. 45. pp. 259–266
33. Ray, J. Influence of soil inoculation with vesicular arbuscular

mycorrhizal (VAM) and a phosphate dissolving bacteria on plant growth and 32P uptake. *Soil Biology and Biochemistry*. 2021. Vol. 13. pp. 105–108.

34. Rojas, A. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere *FEMS Microbiology Ecology*. 2021. Vol. 35. Pp. 181–187

35. Cohen, A. C. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically- defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regulation*. 2018. Vol. 54. № 2. pp. 97-103.

36. Tanimoto, E. Regulation of root growth by plant hormones-roles for auxin and gibberellin. *Critical reviews in plant sciences*. 215. Vol. 24. № 4. pp. 249-265.

37. Hayat, R. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*. 2020. Vol. 60. № 4. pp. 579-598.

38. Spaepen, S. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. In *FEMS Microbiology Reviews*. 2017. Vol. 31. № 4. pp. 425-448.

39. Bottini, R. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied microbiology and biotechnology*. 2024. Vol. 65. № 5. pp. 497-503.

40. Spaepen, S. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2021. Vol. 3. № 4. pp. a001438.

41. Babalola, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology letters*. 2020. Vol. 32. № 11. pp. 1559-1570.

42. Khan, A. L. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology*. 2014. Vol. 52. pp. 689–695.

43. Aloni, R. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of botany*. 216. Vol. 97. № 5. pp. 883-893.

44. Liu, F. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings.

Applied microbiology and biotechnology. 2023. Vol. 97. № 20. pp. 9155-9164.

45. Reid, M. S. The role of ethylene in flower senescence. In IV International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants 261. March, 2008. pp. 157-170.

46. Ahmad, M. Efficacy of *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields. Plant Physiology and Biochemistry. 2013. Vol. 63. pp. 170-176.

47. Li, Q. The effect of native and ACC deaminase-containing *Azospirillum brasilense Cd1843* on the rooting of carnation cuttings. Canadian journal of microbiology. 2015. Vol. 51. № 6. pp. 511-514.

48. Glick, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological research. 2014. Vol. 169. № 1. pp. 30-39.

49. Raaijmakers, J. M. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant Soil. 2019. Vol. 321. pp. 341–361.

50. Zheng, X. Y. The effects of traits of *Bacillus megaterium* on seed and root colonization and their correlation with the suppression of Rhizoctonia root rot of soybean. Biocontrol. 2000. Vol. 45. № 2. pp. 223-243.

51. Haas, D. Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annual Review of Phytopathology. 2003. Vol. 41. pp. 117–153.

52. Chet, I. Biological control of fungal pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2014. Vol. 48. pp. 37–43.

53. Frankowski, J. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. Arch Microbiol. 2021. Vol. 176. pp. 421–426.

54. Ordentlich, A. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology. 2018. Vol. 98. pp. 84–88.

55. Singh, P. P. Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathology. 2019. Vol. 109. pp. 92–99.

56. Kim, Y. C. An effective biocontrol bioformulation against Phytophthora blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. *European Journal of Plant Pathology*. 2008. Vol. 150. pp. 373–382.
57. Bonas, U. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current opinion in microbiology*. 2002. Vol. 5. № 1. pp. 44-50.
58. Romeiro, R. S. PGPR and systemic induction of resistance against plant pathogens. *Summa Phytopathol*. 2000. Vol. 26. pp. 177–184.
59. Moraes, M. G. Mechanisms of acquired systemic resistance in plants. *Revis Anu Patol Plantas*. 2018. Vol. 36. pp. 261–284.
60. Pieterse, C. M. J. Novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2018. Vol. 30. pp. 1571–1580.
61. Leeman, M. Induction of systemic resistance against Fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*. 2015. Vol. 105. pp. 1021–1027.
62. Choudhary, D. K. Volatiles as priming agents that initiate plant growth and defence responses. *Current Science*. 2018. Vol. 114. № 5. pp. 595-604.
63. Ongena, M. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*. 2007. Vol. 9. pp. 1084–1090.
64. Araujo, F. F. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 41. № 8-9. pp. 1639-1645.
65. Hanson, A. D. Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implications for breeding for drought resistance 1. *Crop Science*. 1979. Vol. 19. № 4. pp. 489-493.
66. ДСТУ 3696-98 (ГОСТ 30561-98) Меляса бурякова. Технічні умови. [Чинний від 1999-01-01]. Київ. Держстандарт України, 1998. 22 с.

67. Леськів Г.З., Верескля М.Р. Безпека життєдіяльності та охорона праці: навчальний посібник. Львів: 2018. 262 с.

68. Державні санітарні норми і правила «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами»: Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 24.01.2008 р., №26. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0088-08#Text> (дата звернення 23.11.2024).