

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

О.В. Лобова, А.С. Левішко, І.І. Гуменюк

БІОТЕХНОЛОГІЇ

Навчальний посібник
Рекомендований вченою радою
Національного університету біоресурсів
і природокористування України
та вченою радою Інституту агроєкології і
природокористування НААН

КИЇВ 2021

УДК 606:[502/504+61+631.1

Л 68

Навчальний посібник затверджено вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України як підручник для підготовки фахівців галузі знань 16 «Хімічна та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія» (протокол №4 від 24 листопада 2021 р.) та та вченою радою Інституту агроєкології і природокористування НААН (протокол №11 від 19 листопада 2021 р.)

Автори: О.В. Лобова, А.С. Левішко, І.І. Гуменюк

Рецензенти:

Кляченко О.Л., доктор сільськогосподарських наук, професор кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України

Іванніков Р.В., доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, провідний науковий співробітник відділу тропічних та субтропічних рослин Національного ботанічного саду М.М. Гришка

Маменко П.М., кандидат біологічних наук, головний спеціаліст ТОВ «СанАгро Україна»

Л 68

Лобова О.В., Левішко А.С., Гуменюк І.І. **Біотехнології:** Навч. посібник. – К.: Видавництво НУБіП України 2021. с. 548.

УДК 602: 63

ББК 28.04

©НУБіП України

ВСТУП

Біотехнологія – це наука про можливість використання біологічних процесів у різних галузях, промисловості та медицини з метою розробки методів, а також технологій отримання потрібних організмів та специфічних речовин. Вона складається з багатьох розділів – генетична інженерія, мікробна технологія, репродуктивна біотехнологія, інженерна ензимологія та інші.

На сьогоднішній день біотехнологія охоплює різноманітні сфери людської діяльності, серед яких медицина, промисловість, сільське господарство тощо. Розвиток біотехнології сприяє інтенсифікації виробництва, збільшенню ефективності використання природних ресурсів, формуванню нових джерел енергії, вирішенню продовольчих та екологічних проблем.

Усі напрямки біотехнологічних виробництв засновані на використанні мікроорганізмів або їх частин в умовах *in vitro*.

Курс «Біотехнологія» є однією із узагальнюючих дисциплін, що передбачає наявність у студентів достатнього обсягу знань у галузі біохімії, мікробіології та вірусології, молекулярної біології, генетики, фізіології рослин. Наявний матеріал курсу може слугувати основою для подальшого вивчення студентами інших біологічних дисциплін.

Основною метою даного курсу є поглиблення знань студентів із традиційних та новітніх біотехнологічних напрямків. А саме вивчення основних проблем, методів та досягнень використання біологічних об'єктів у різних технологічних процесах виробництва.

До завдань курсу належить вивчення основних розділів біотехнології, їх сутності, принципів та методів. Ознайомлення із сучасними досягненнями біотехнології, галузями її застосування, проблемами та її перспективами.

Важливою особливістю курсу «Загальна біотехнологія» є його подальше практичне використання результатів фундаментальних наук у різних галузях господарської діяльності людини. У зв'язку із цим, основним завданням курсу є оволодіння основними поняттями, основами та технологічними принципами біотехнологічних виробництв на основі залучення теоретичних і практичних знань базових наук. Біотехнологія дає можливість оволодіти основними методами та навичками роботи з культурою *in vitro* рослинних організмів та мікроорганізмів, отримання трансгенних рослин, рослин стійких до гербіцидів, хвороб, в також дії несприятливих умов навколишнього середовища.

Підручник розроблено згідно програми курсу «Загальна біотехнологія» та представлені в ньому методи та принципи є необхідним для підготовки фахівців-біотехнологів та інших сфер біології.

РОЗДІЛ 1

ПРЕДМЕТ, ЗАВДАННЯ, МЕТОДИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ БІОТЕХНОЛОГІЇ

1.1. Предмет біотехнології

Біотехнологія – це наука щодо способів створення продуцентів біологічно активних речовин на базі живих організмів, а також на використанні біологічних об'єктів і біологічних процесів у промисловому виробництві, техніці й охороні навколишнього середовища.

Людиною біотехнологія використовувалася ще багато тисяч років тому: випічка хліба, пивоваріння, зберігання й переробка продуктів за допомогою ферментації (оцет, сир, соус, найпростіші ліки, мило, переробка відходів тощо).

Розроблення методів генної інженерії, які базувалися на створенні рекомбінантних ДНК, згодом призвела до «біотехнологічного буму», що значно прискорило розвиток головних галузей біотехнології.

50-60-ті роки ХХ століття стали початком інтенсивного розвитку більшості напрямів біотехнологічної промисловості: це перш за все сільське господарство, енергетика, виробництво хімічних речовин, харчова промисловість, медицина, матеріалознавство, контроль за станом навколишнього середовища.

Використання наукових досягнень у галузі біотехнології пов'язано, зокрема, із фундаментальними дослідженнями, які втілюються на самому високому сучасному рівні. Слід зазначити, що до найважливіших галузей науки, які уже внесли чи вносять вагомий вклад у здійснення будь-якого біотехнологічного процесу належать: мікробіологія, біохімія, генетика, хімічна технологія, електроніка, технологія харчової промисловості тощо. Розвитку деяких перспективних галузей біотехнології значно сприяє тісна

міжнародна співпраця вчених, фахівців і технологів. Як приклад, в сфері генної інженерії лише окремі наукові колективи у світі мають достатній досвід роботи, проте їх розробки досить швидко стають надбанням наукової спільноти світу.

Сучасна біотехнологія не існувала б і без успіхів у розробленні інструментальних методів досліджень, які передбачають використання новітніх приладів вітчизняного й зарубіжного виробництва.

Кожен біотехнологічний процес передбачає обов'язкову участь та взаємозв'язок між собою організмів (гриби, бактерії, дріжджі та ін.) із субстратом (тобто живильне середовище чи речовина, яка має здатність розкладатися якимось мікроорганізмом).

Сьогоднішня промислова біотехнологія містить чотири головні стадії:

- 1) обрання штаму мікроорганізму чи культури клітин, які мають підвищену продуктивність;
- 2) обрання живильного середовища, яке здійснює оптимальний біосинтез цільового продукту;
- 3) культивування клітин-продуцентів;
- 4) виведення цільового продукту, його оброблення, очищення й отримання товарної форми даного продукту.

Поняття «біотехнологія» не відразу стало усталеним. Слово «біо» з грецької мови – «життя», «technos» – метод, спосіб індустріального виробництва. Для застосування найпов'язаніших із біологією різноманітних методів одержання біологічно активних речовин використовували терміни: прикладна біохімія, прикладна мікробіологія, прикладна генетика, технологія ферментів, біоінженерія тощо.

Давніше, коли ще не було наукових уявлень про процеси, які є основою різноманітних технологій, протягом

декількох тисячоліть використовувався метод мікробіологічної ферментації для збереження їжі: поліпшення смаку, отримання сиру, оцту, випічка хліба й приготування соєвого соусу, а також виробництво спиртних напоїв. Найдавнішою і досить прибутковою була і є сьогодні така галузь харчової промисловості як пивоваріння. 6000 років до н.е. у стародавньому місті Вавилон був виявлений перший рецепт пива, а близько 3000 років до н.е. – вже були поширені 20 сортів пива. На сьогодні в усьому світі щорічно виробляють близько 1012 літрів пива різноманітних сортів та найменувань.

Дякуючи працям Л. Пастера наприкінці XIX століття виникли реальні передумови щодо подальшого розвитку галузі прикладної мікробіології. Вчений виявив, що в процесах бродіння головну роль відіграють мікроорганізми, і показав, що в утворенні деяких продуктів беруть участь їхні різні види. Дослідження Пастера стали основою розвитку бродильного виробництва органічних розчинників на початку XX століття (етанолу, бутанолу, ацетону й ізопропанола). У всіх даних процесах у безкисневому середовищі мікроорганізми здійснюють трансформацію вуглеводів рослин у цінні продукти. Для зростання мікроби, за джерело енергії, в таких умовах застосовують зміни ентропії при перетворенні речовин.

Вагомим етапом розвитку біотехнології стала організація промислового виробництва антибіотиків. Підґрунтям для цього стало відкриття у 1940 р. Флорі, Флемінгом і Чейном хіміотерапевтичної активності пеніциліну. Відомо, що цей антибіотик, як і його виробництво, займають провідне місце в медичній біотехнології і сьогодні.

При переробці відходів використання мікроорганізмів не потребує створення відповідних стерильних умов, а навпаки, чим більше мікроорганізмів бере участь у такому

процесі, тим це краще. Процес мінералізації органічних відходів у аеробних умовах, який базувався на використанні мікроорганізмів активного мулу, було розроблено в 1914 році. З того часу його істотно модернізовано – він став складнішим і продуктивнішим, й застосовується у всьому світі для перероблення стічних вод. Процес утилізації стоків у анаеробних умовах за допомогою змішаної мікрофлори спричиняє утворення біогазу (CH_4 та CO_2), який використовують за дешеву енергію. Першість з виробництва біогазу має Китай (біля 20 млн генераторів біогазу). Останнім часом використовують невеликі установки, які націлені на переробку відходів сільського господарства.

Біотехнологічна промисловість найінтенсивніше почала розвиватися після Другої світової війни. Підґрунтям її розвитку стали такі відкриття:

1) Уотсон та Крік встановили у 1953 р. просторову структуру ДНК;

2) завдячуючи працям Сенгера щодо структури білків (зокрема структури інсуліну), та Едмана й Бегг (1967 р.) з деградації білків, виникли прилади для автоматичного визначення структури білків, тобто послідовності амінокислот (1978 р.);

- в Каліфорнійському університеті (1980 р.) було сконструйовано секвенатор білків, за допомогою якого можна визначити послідовність більше 200 амінокислот у день;

- за встановленою структурою ДНК розпочалися наукові дослідження із синтезу біополімерів. У медичному національному центрі «Хоуп» (в Каліфорнії) у 1977 р. було синтезовано ген соматостатину (Ітакура); у 1979 р. – синтезовано ген інсуліну людини; у 1980 р. – створений Ітакурою синтезатор генів.

1.2. Розвиток біотехнології у СНД

В 1986 р. створили Міністерство медичної і мікробіологічної промисловості. Водночас у СРСР налагодилося промислове виробництво білка одноклітинних організмів (БОО), який мав вигляд сухої біомаси дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Виробництво даного білка в рік за обсягом становило 1 млн т, зокрема 40% на основі використання як субстрату гідролізату деревини та 60% – парафінів нафти.

В цей час виникли нові напрямки, що розвиваються на основі біотехнології, та продукти, які одержують за її допомогою.

Так, широкого поширення отримало виробництво амінокислот у аеробних мікробіологічних процесах. Найбільшими обсягами виробляли глутамат натрію (його виробництво щорічно в світі становило більше 150 тис. т), який застосовували як підсилювач смаку. Друге місце з виробництва становив лізин, який застосовували як харчову добавку. У СРСР в 1985 р. вироблялося біля 20 тис. т лізину. Використання у складі комбікорму 1 т лізину економить до 40–50 т фуражного зерна. У СРСР досить успішно мала розвиток біотехнологія антибіотиків, так у 1988 р. СРСР посідав у світі 2-е місце з їх виробництва поступаючись лише США.

Сьогодні в більшості країн світу створена і розвивається швидкими темпами мікробіологічна промисловість. Її продуктами є амінокислоти, антибіотики і ферменти, нуклеозиди, біологічні засоби щодо боротьби з комахами (інсектициди), вітаміни, кормовий білок, етиловий і бутиловий спирти, полісахариди, ацетон, бактерії-азотфіксатори, бактерії-біодеграданти шкідливих речовин тощо. Широкого розповсюдження мікробіологічні процеси

набули у видобутку металів із бідних руд, для того щоб збільшити вихід нафти з пластів.

За допомогою розроблення методів генної інженерії стало можливим налагодження мікробіологічного виробництва цінних білків людини, а також сільськогосподарських тварин (гормон росту, інтерферон та ін.). Перші роботи з рекомбінантними ДНК у СРСР було розпочато в 70-х рр. минулого століття. Самим центром вітчизняної генної інженерії того часу була Москва (Інститут біоорганічної хімії, Інститут молекулярної біології, Інститут вірусології). Так, під керівництвом акад. А. Баєва було створено такі бактеріальні штами продуценти інсуліну, інтерферону, гормону росту людини; також проведено клінічні випробування цих препаратів.

Як відомо, мікробна клітина – це «досконалий біоагрегат». Проте для багатьох промислових задач генетичну програму клітини потрібно перебудовувати так, щоб біосинтетичний потенціал клітини був направлений на виробництво потрібного продукту, а не навпаки, на безперервне самовідтворення. І в тих навіть випадках, коли метою є просте отримання біомаси (тобто кормового білку), може бути потреба зміни властивостей, які покращать технологічні параметри процесу, які підвищать конверсію субстрату до продукту тощо.

Проблемами вдосконалення промислових мікроорганізмів зазвичай займаються мікробіологи-селекціонери. Термін «селекція» (від лат. *Selectio*) – відбір.

Безсумнівно, як раніше, так і на сьогодні, для маловивчених мікроорганізмів в сфері генетики, єдиним методом їх поліпшення залишається індукований мутагенез та ступінчастий відбір найліпших варіантів (штамів). Спосіб трудомісткий, адже відбір, здебільшого, проводять без ретельного знання шляхів біосинтезу. Такі селекційні роботи можуть займати досить тривалий час (навіть роки).

Але, як показує практика, багаторічна селекція штамів-продуцентів пеніциліну має можливість піднімати активність від 100 до 40 000 од./мл і навіть більше.

Задачу створення високопродуктивних штамів можна спростити, якщо селекціонер достатньо ознайомлений про шляхи біосинтезу будь-якого метаболіту, а також існують способи генетичного обміну в досліджуваному мікроорганізмі, які можуть дозволити зібрати в єдиному штамі усі корисні мутації й елімінувати шкідливі.

Прогрес метаболічної інженерії, розуміння молекулярних механізмів реплікації ДНК, регуляції активності та експресії генів, транскрипції і трансляції, стало поштовхом свідомо конструювати штами мікроорганізмів із даними властивостями на сучасному етапі розвитку біотехнології. Використання цих підходів у поєднанні з використанням класичної селекції і є суттю сучасної селекції мікроорганізмів, які містяться у тому чи іншому біотехнологічному процесі.

1.3. Перспективи розвитку біотехнології і застосування біотехнологічних процесів у різних галузях народного господарства

Внаслідок розширення сфери застосування, біотехнологія становить вагоме значення у підвищенні рівня життя людей. Її методи застосування широкі й різноманітні:

- 1) Процеси біодеградації та біосинтезу.
- 2) Одержання для хімічної промисловості вуглецевмісної сировини.
- 3) Хімічна переробка (тобто очищення продукту).
- 4) Одержання таких хімічних продуктів, які застосовують у побуті – це клеї, волокна, барвники, смакові добавки, запашні речовини, згущувачі, пігменти, мастила, пластики тощо.

- 5) Одержання джерел енергії.
- 6) Контроль за дотриманням належного стану навколишнього середовища (вода, повітря, ґрунт).
- 7) Одержання харчових продуктів та напоїв.
- 8) Одержання нових лікарських препаратів, покращення методів діагностування захворювань, боротьба з хворобами тварин і рослин.
- 9) Покращення методів видобутку мінеральної сировини.

Згідно аналізу фахівців галузі найефективніше й найшвидше застосування біотехнології відбувається у медицині, сільському господарстві та хімічній промисловості. Далі докладніше зупинимося на деяких біотехнологічних процесах у цих галузях народного господарства.

Харчові продукти й напої. Загальновідомі способи використання мікроорганізмів у виробництві сортів вина, пива й зброджених продуктів покращувалися віками, та все ж здебільшого в них було більше мистецтва, аніж самої технології. Лише із розвитком науки – мікробіології став можливим контроль якості продуктів, а процеси ферментації стали надійнішими та відтворюваними, також з'явилися новіші типи продукції (наприклад, смакові добавки).

Найрезультативнішими є два взаємопов'язаних напрями розвитку даної галузі біотехнології:

1) до звичних способів виробництва їжі можна залучати біореактори, в яких ростимуть клітини тварин та рослин, або самі мікроорганізми. Річ у тім, що при застосування біореакторів або ферментерів, вихід продукції ймовірно буде вищий, аніж у сільському господарстві: процеси, які в них відбуваються набагато інтенсивніші. Розвиткові даного напрямку може сприяти також зростаюча конкуренція за існуючі земельні ресурси.

2) ця альтернативна технологія для установленого сільського господарства стане продуктивнішою завдяки застосуванню методів генетичної інженерії, які дають можливість одержати удосконалені лінії клітин, а також штами мікроорганізмів.

Медицина. Досить різноманітні взаємозв'язки біотехнології із медициною саме у виробництві антибіотиків. Антибіотики – специфічні продукти життєдіяльності деяких груп мікроорганізмів, які мають високу фізіологічну активність, а також сповільнюють розвиток патогенних мікроорганізмів. Вони затримують вибірково їх ріст або взагалі пригнічують розвиток. Головними серед них є пеніцилін (продуценти гриба роду *Penicillium*); тетрациклін (продуценти актиноміцети роду *Streptomyces*), стрептоміцин (продуценти актиноміцети роду *Streptomyces*) тощо. Проводиться постійний пошук нових антибіотиків, через те що вони часто викликають алергічні реакції, а також набуття стійкості до застосовуваних препаратів у патогенних мікроорганізмів.

За допомогою застосування технології рекомбінантних ДНК було досягнуто значних успіхів у медицині. Так, наприклад, розроблено досить ефективні методи промислового виробництва інтерферону людини (клоновані в мікроорганізмах гени людини). Також окрім гена інтерферону стало можливим клонування генів інсуліну та гормону росту людини. Для великих масштабів виробництва клонували гени багатьох інших білків людини й тварин, які є незворотними для діагностики й лікування.

Вагомого значення набуває розроблення методів виробництва моноклональних антитіл. Ці моноклональні антитіла можна використовувати у наборах з метою проведення радіоімунологічного аналізу (RIA), а також діагностики, імунодіагностики та терапії.

Біотехнологія дає медицині новіші шляхи одержання цінних гормональних препаратів. Це стосується, зокрема, значних досягнень в розвитку синтезу пептидних гормонів. Спочатку одержували гормони із тканин й органів людини і тварин (органи, тканини кров донорів). Необхідно було мати значну кількість матеріалу для одержання невеликого обсягу гормонального продукту: так, соматотропін (людський гормон росту) одержували із гіпофіза людини, а кожен з гіпофіз містить біля 4 мл гормону. Водночас на лікування однієї дитини, яка хворіє на карликовість, необхідна доза – 7 мл гормону в тиждень, а сам курс лікування може розтягнутися на декілька років.

Завдяки генній інженерії (а саме використовуючи штам *Escherichia coli*) сьогодні одержують біля 100 мл гормону росту на 1 л середовища культивування. Окрім цього, людський гормон росту допомагає загоїнню ран та опіків, а разом із гормоном щитовидної залози (кальцитоніном) – дає можливість регулювати обмін Ca^{2+} у кістковій тканині.

У лікуванні цукрового діабету використовують інсулін. Це пептидний гормон ostrivciv Лангерганса підшлункової залози, дефіцит якого проявляється шляхом підвищення рівня глюкози у крові. Спочатку інсулін одержували із підшлункової залози домашніх тварин (здебільшого це велика рогата худоба та свині). Проте такий препарат від людського інсуліну відрізнявся 1–3 амінокислотними замінами, а тому міг викликати алергічні реакції у людини. Завдяки генній інженерії стало можливим одержання інсуліну для людини із високою ефективністю терапевтичної дії та невисокою собівартістю.

Далі розглянемо питання щодо промислового синтезу енкефалінів – гормонів нервової системи. Вони, перш за все, знімають больові відчуття, підвищують працездатність, створюють гарний настрій, покращують пам'ять, регулюють режим сну, концентрують увагу тощо.

Вагомий внесок біотехнологія принесла у промислове виробництво пептидних гормонів, а також стероїдів. Завдяки методам мікробіологічної трансформації різко зменшилася кількість етапів хімічного синтезу гормону наднирників (кортизону), який використовують для лікування ревматоїдного артриту. На даний час вже є розробки з одержання тироксину (гормону щитовидної залози) із мікроводоростей.

Особливої значущості набувають технологічні процеси щодо виробництва інтерферонів, які мають антивірусну активність. Сьогодні інтерферон ефективно одержують шляхом використання генно-інженерних штамів мікроорганізмів, а також культивованих клітин ссавців і комах. Інтерферони застосовуються задля лікування хвороб, збудниками яких є віруси сказу, герпесу, гепатиту, а також для профілактики вірусних інфекцій, зокрема респіраторних.

Глибоку зацікавленість становить біотехнологічне виробництво інтерлейкінів. Вони є досить короткими (біля 150 амінокислотних залишків) поліпептидами, які беруть безпосередню участь в організації імунної відповіді.

Надважливою у медицині є вакцинація проти гепатитів, грипу, кору та гострих респіраторних захворювань. Тому актуальним виступає питання виготовлення вакцин. Вакцинація – основний метод боротьби з інфекційними хворобами. Так за допомогою вакцинації ліквідовано натуральну віспа, знижено поширення сказу, а також сибірської виразки, жовтої лихоманки, поліомієліту тощо.

Сьогоденні біотехнологічні процеси мають за мету випуск рекомбінантних вакцин, а також вакцин антигенів. Обидва типи ґрунтуються на генно-інженерному підході. Щоб одержати рекомбінантні вакцини традиційно використовується поширений ген вірусу коров'ячої віспи – осповакцини. В ДНК цього гену вбудовують чужорідні гени,

які кодують імуногенні білки будь-яких збудників (гепатиту, грипу, молярійного плазмодія тощо).

Щоб одержати рекомбінантні ДНК застосовуються спеціальні вектори на базі плазмід із гарно вивченою послідовністю, а також рестрикційною картою. Стало можливим створення, на основі об'єднання ділянок ДНК будь-яких патогенів під егідою ДНК вірусу коров'ячої віспи, полівалентних вакцинних препаратів.

Новітня біотехнологія використовується в одержанні ферментів медичного призначення. Вони використовуються для розчинення тромбів, а також лікування різних спадкових захворювань. Як приклад – порятунок хворих з тромбозом кінцівок, судин серця, легень шляхом тромболітичних ферментів (урокинази й стрептокинази).

Енергетика. Оскільки сьогодні запаси викопного палива є обмеженими, а споживання його з кожним роком постійно зростає, є побоювання настання енергетичної кризи багатьох країн світу. Тому зараз обговорюються перспективи подальшого використання ядерної енергії.

Приблизно 99,4% на рік неядерної енергії людство одержує саме від Сонця. Її частина акумулюється у біомасі, проте із досить малою ефективністю (біля 1-2%).

Саме тому біомаса – безперервне поновлюване джерело енергії. Цю енергію можна як спалювати, так і за допомогою мікроорганізмів доволі простими методами перетворювати у рідке чи газоподібне паливо (етиловий спирт, метан, водень). Ця біомаса в майбутньому буде використовуватися у виробництві сировини для хімічної промисловості. Останніми роками цікавляться розробками біопаливних елементів, завдяки яким є можливість отримувати з високою ефективністю електричну енергію із видів палива та біомаси. Через те, що сонячне світло – досить потужне джерело енергії, а обсяг наявної біомаси обмежений, деякі біотехнологи працюють над вирішенням

двох проблем з підвищення ефективності застосування сонячної енергії:

1) стараються знайти фактичні методи підвищення ефективності конверсії сонячного світла у біомасу, наприклад, за допомогою вирощування водоростей при дуже високій концентрації CO_2 , а також обмеженої освітленості в біореакторах із суворим контролем за умовами зростання;

2) вивчають можливість одержання водню через розщеплення води за участю при цьому фотосистеми фотосинтезуючих організмів, тобто за допомогою біофотоліза. Технічно легше одержувати водень, за допомогою синьо-зелених водоростей або процесів ферментації.

Біотехнологія має велике значення при видобутку нафти. Так, наприклад, передбачається вводити певні мікроорганізми безпосередньо в сам нафтовий пласт, задля прискорення потоку нафти з пористих порід, а також для видобутку залишків нафти.

Навколишнє середовище. Відповідно до того, з якою швидкістю збільшується населення Землі, а також розвивається промисловість, дуже важливою є проблема охорони навколишнього середовища. У вирішенні цієї проблеми велику роль відіграє біотехнологія, а саме в тому аспекті, який стосується розробки новітніх або удосконалення вже існуючих способів переробки відходів. Нові процеси у переробці відходів базуються на застосуванні мікроорганізмів, які мають нові, невідомі раніше чи штучно створені катаболістичні здібності.

Навколишнє середовище становить ніби спільний знаменник для усіх без виключення видів діяльності. Так, наприклад, розширюючи використання біотехнології у хімічній промисловості – утворюються нові її галузі, які

краще сумісні з навколишнім середовищем. Такі сподівання покладаються й на біоінженерію.

Сільське господарство. Застосування біотехнології у сільському господарстві є дуже різноманітним. Продукцію сільського господарства можна використовувати у промисловості, наприклад задля виробництва етилового спирту із залишків цукрового буряка чи очерету. Даний підхід набув подальшого розвитку: сільськогосподарські культури, для виготовлення спирту, почали вирощувати навмисно.

Сьогодні досить значна частина продукції сільського господарства слугує сировиною для розвитку такої галузі як харчова промисловість. За сировину можуть брати навіть відходи сільського господарства.

Завдяки біотехнології розробляються нові та удосконалюються існуючі способи щодо поліпшення сільськогосподарських культур за врожайністю та якістю. Є можливість використовувати одержані з її допомогою замінники вартісних хімічних добрив чи пестицидів, а також добавки до них. Наприклад, потребу в азоті, можна вирішити шляхом впровадження біологічної фіксації азоту, яка ґрунтується на симбіозі, а в фосфорі – через втручання у процеси, які відбуваються у мікоризах. Сьогоднішнім завданням є передача здібності до фіксації азоту особисто певним сільськогосподарським культурам за допомогою введення до них гена нітрогенази; внаслідок цього такі рослини придбають здібність до синтезу ферменту, який може каталізувати реакцію фіксації азоту. Це, насамперед, дасть можливість заощадити енергію, яка зараз витрачається при хімічному синтезі аміаку.

На думку багатьох вчених, найефективніший внесок біотехнології у сільське господарство варто очікувати через поліпшення властивостей рослин за допомогою

застосування методів рекомбінативних ДНК, а також протопластів рослин.

Хімічні сполуки. Використання біологічних систем у виробництві хімічних сполук здебільшого дає ряд переваг, проте зараз дуже малу їх кількість одержують шляхом біотехнологічних процесів. Це переважно дешеві, але у тому числі і ті, які широко використовуються в досить великих обсягах: паливо, метан та етиловий спирт, а також ряд цінних і вартісних речовин, які застосовують у медицині та у харчових цілях (амінокислоти, лимонна кислота, антибіотики і стероїди).

Виробництво хімічних речовин на базі біокаталізу має такі переваги: специфічність, робота за низьких температур, легкість в контролі, сумісність із навколишнім середовищем, а також простота. Хімічне виробництво органічних сполук, наприклад, ґрунтується, здебільшого, на нафті, а більшу частину продуктів переробки нафти одержують за допомогою часткового окислення сировини. Досягати специфічного, контрольованого та часткового окислення шляхом вже існуючих каталізаторів є досить складно, а мікроорганізми ці типи реакцій здійснюють дуже легко.

Відомі три основні методи синтезу хімічних з'єднань на базі біокаталізу:

- 1) за допомогою використання культур клітин рослин або тварин, які утворюють дорогі речовини;
- 2) за допомогою використання мікроорганізмів, які за необхідності змінені методами генетичної інженерії, для біосинтезу чи модифікації хімічних речовин;
- 3) за допомогою використання мікроорганізмів, змінених методами генетичної інженерії в якості "пристроїв" для експресії генів тварин і рослин, що дає можливість синтезувати у великих обсягах властиві лише вищим організмам хімічні сполуки.

Матеріалознавство. Вплив біотехнології на одержання та використання різних матеріалів, може бути щонайменше трьома способами:

1) біотехнологія сприятиме розвитку видобутку промислової сировини такої як нафта та інші корисні копалини;

2) більшого поширення може набувати використання продуктів мікробного походження (так, наприклад, для виробництва за допомогою мікроорганізмів пластмас, які розкладаються);

3) вдосконалюватимуться способи захисту різних речовин від їх руйнування мікроорганізмами.

Найбільш виправданою сировиною для виробництва біопластмаси зараз вважається одна з резервних речовин клітин, полігідроксібутірат (ПГБ). Сьогодні ведуться активні дослідження в промисловості, як самої даної речовини, так і методів її одержання.

Дуже важливою і в той же час складною із технічної точки зору постає проблема біопошкоджень. Вони є невідворотним наслідком мікроорганізмів у коловороті елементів у біосфері. Їх прояви досить різноманітні: від псування харчових продуктів до забруднення мастил і паливних систем, руйнації бетону та розвитку електрохімічних процесів корозії під дією мікроорганізмів. За допомогою біотехнології можна створити нові способи боротьби з біопошкодженнями через глибше розуміння процесів, які лежать в їх основі. На даній основі можуть бути створені новітні біотехнологічні процеси. Як приклад – використання ферментів у харчовій промисловості.

РОЗДІЛ 2

ВИБІР БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

Основа біотехнологічного процесу – біологічний об'єкт, який спроможний здійснювати деяку модифікацію вихідної сировини, а також утворювати будь-який необхідний продукт. Такими об'єктами біотехнології можуть бути клітини мікроорганізмів, рослин і тварин, трансгенні рослини і тварини, гриби, крім того велико компонентні ферментні системи клітин, а також окремі ферменти.

Підґрунтям багатьох біотехнологічних виробництв сьогодні є мікробний синтез – синтез різних біологічно активних речовин мікроорганізмами. Проте, об'єкти тваринного і рослинного походження, на жаль, через ряд причин ще не знайшли широкого застосування. Саме тому доцільно буде далі розглядати мікроорганізми як базові об'єкти біотехнології.

2.1. Мікроорганізми – основні об'єкти біотехнології

На сьогодні відомо вже більше 100 тисяч різноманітних видів мікроорганізмів. Перш за все це бактерії, ціанобактерії, актиноміцети. При такій різноманітності видів мікроорганізмів надважливою, здебільшого, і складною проблемою є вірний вибір такого організму, який буде здатний забезпечити одержання потрібного продукту, тобто який слугуватиме промисловим цілям.

У більшості біотехнологічних процесів використовується обмежена кількість мікроорганізмів, які класифікуються як GRAS («generally recognized as safe» здебільшого є безпечними). До даних мікроорганізмів відносяться такі бактерії як *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, а також інші види бацил і лактобацил, та види *Streptomyces*. Також сюди відносяться

такі види грибів як *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, дріжджів *Saccharomyces* тощо. GRAS-мікроорганізми нетоксичні, непатогенні, і здебільшого не утворюють антибіотики, а тому при розробці якогось нового біотехнологічного процесу варто орієнтуватися на ці мікроорганізми, як основні об'єкти біотехнології.

На сьогодні мікробіологічна промисловість використовує біля тисячі штамів мікроорганізмів, які були виділені первинно з природних джерел на основі їх корисних властивостей, а далі покращені різними методами. Через розширення виробництва, а також асортименту продукції, яка виробляється для мікробіологічної промисловості використовують все більше нових представників світу мікробів. Варто підкреслити, що в недалекому майбутньому жоден із цих мікробів не буде вивчений так, як *E. coli* й *B. subtilis*. Причиною цього факту є колосальна трудомісткість і надто висока вартість такого роду досліджень.

Відповідно до вищесказаного, виникає актуальна проблема розробки тактики і стратегії досліджень, які б передбачали разом розумну витрату праці, і видобування з потенціалу нових мікроорганізмів найціннішого при створенні промислово вагомих штамів-продуцентів, сприятливих для застосування у біотехнологічних процесах.

Загальноприйнятим підходом є виділення необхідного мікроорганізму саме із природних умов. Зі звичних природних місць проживання потрібного продуцента відбирають проби матеріалу, а далі здійснюють посів у селективне середовище, яке потім забезпечує розвиток конкретного мікроорганізму, тобто одержують накопичувальні культури.

Наступний крок це виділення чистої культури із вивченням надалі ізолюваного мікроорганізму, а за

необхідності, приблизним визначенням і його продукційної здібності.

Також існує такий спосіб підбору мікроорганізмів продуцентів як вибір необхідного виду із уже наявних досконально вивчених і добре охарактеризованих мікроорганізмів. За такого підходу, безумовно, усувається необхідність дотримувати виконання цілої низки трудомістких операцій.

Основний критерій вибору біотехнологічного об'єкта – це здатність його синтезувати цільовий продукт. Крім цього, також у методиці самого процесу можуть міститися додаткові вимоги, які бувають досить важливими, і навіть вирішальними. Іншими словами мікроорганізми мають володіти великою швидкістю росту, а також утилізувати дешеві субстрати потрібні для їх життєдіяльності, бути резидентними до чужої мікрофлори, тобто мати велику конкурентоспроможність. Все це забезпечує суттєве зниження витрат саме на виробництво цільового продукту.

Розглянемо декілька прикладів, які обґрунтовують роль мікроорганізмів як об'єктів біотехнології:

1. Зазвичай одноклітинні організми характеризуються більшими швидкостями росту та синтетичних процесів, порівняно з вищими організмами. Але, це притаманно не для всіх мікроорганізмів. Деякі з них ростуть у край поволі, проте представляють певний інтерес, оскільки здатні продукувати різні дуже цінні речовини.

2. На особливу увагу, як об'єкти біотехнологічних розробок, заслуговують фотосинтезуючі мікроорганізми, які у своєї життєдіяльності використовують енергію сонячного світла. Значна їх частина (фотосинтезуючі еукаріоти і ціанобактерії) за джерело вуглецю утилізують CO_2 , а певні представники видів ціанобактерій, мають здатність ще й засвоювати атмосферний азот (іншими словам майже не невибагливі до поживних речовин). Фотосинтезуючі

мікроорганізми ефективні як продуценти водню, аміаку, білка і цілої низки органічних сполук. Проте конкретного прогресу щодо їх використання через недостатність фундаментальних знань про їхню генетичну організацію, а також молекулярно-біологічні механізми життєдіяльності, очевидно, не варто очікувати найближчим часом.

3. Значний інтерес становлять такі об'єкти біотехнології, як термофільні мікроорганізми, які можуть рости при 60-80°C. Така їхня властивість є майже нездоланною перешкодою для розвитку чужої мікрофлори за порівняно не стерильного культивування, тобто це стійкий захист від забруднень. Поміж термофілів виявлено продуценти амінокислот, спиртів, ферментів та молекулярного водню. Окрім цього, їх швидкість зростання, а також метаболічна активність майже в 1,5-2 рази вища, порівняно з мезофілами. Ферменти, які синтезуються термофілами, володіють підвищеною стійкістю до нагрівання, а також деяких окислювачів, органічних розчинників, детергентів й інших несприятливих факторів. Водночас вони майже не активні при нормальних температурах. Наприклад, протеази одного із термофільних мікроорганізмів за температури 20°C у 100 разів менш активні, аніж за 75°C. Це досить важлива властивість для багатьох промислових виробництв. Так, в генетичній інженерії широкого застосування набув фермент Таg-полімераза із такої термофільної бактерії як *Thermus aquaticus*.

Вже згадувалося про іще одну важливу властивість даних організмів, а саме, про те що при їхньому культивуванні температура середовища, в якій вони знаходяться, дуже перевищує температуру самого навколишнього середовища. Такий значний перепад температур здійснює ефективний і швидкий обмін тепла, який дає можливість застосовувати біологічні реактори без

участі громіздких охолоджувальних пристроїв. А це, у свою чергу, значно полегшує перемішування, піногасіння, аерацію, а разом досить здешевлює сам процес.

2.2. Селекція біотехнологічних об'єктів

Головний компонент у процесі створення найцінніших і найактивніших продуцентів, іншими словами при виборі об'єктів в біотехнології, – це їхня селекція. Основною метою селекції є умисне конструювання геномів на всіх етапах відбору необхідного продуцента. Цю умову не завжди можна реалізувати, через відсутність ефективних методів зміни геномів організмів, яких селекціонують.

Особливе значення у розвитку мікробних технологій належить методам, які ґрунтуються на селекції спонтанних змінених варіантів (характеризуються необхідними корисними ознаками). Зазвичай такі методи передбачають використання ступінчастої селекції: на кожному з етапів відбору з популяції мікроорганізмів забираються найактивніші варіанти (спонтанні мутанти), з яких на другому етапі відбирають ефективніші нові штами і т.д. Попри очевидну обмеженість цього методу через низьку частоту виникнення мутантів, повністю вичерпаними його можливості ще зарано вважати.

Селекційний процес найефективніших продуцентів дуже прискорюється якщо використовувати метод індукованого мутагенезу. В ролі мутагенних впливів використовують УФ, рентгенівське й гамма-випромінювання, деякі хімічні речовини тощо. Але і такий прийом має недоліки, головним з яких його трудомісткість, а також відсутність відомостей про характер змін, бо експериментатор проводить відбір за кінцевим результатом. Так, стійкість організму до іонів важких металів здебільшого пов'язана з приглушенням системи поглинання присутніх

катіонів бактеріальної клітиною, а також активацією процесу витіснення катіонів із клітки або ж перебудовою системи (чи систем), яка піддається інгібуючій дії катіона в клітці.

Безперечно, знання самих механізмів підвищення стійкості дасть можливість вести спрямований вплив для одержання кінцевого результату за максимально короткий час, а також селекціювати варіанти, які краще за все підходять до певних умов виробництва.

Отже, застосування усіх перерахованих підходів разом із поєднанням прийомів класичної селекції становить ядро сьогоденної селекції мікроорганізмів-продуцентів.

РОЗДІЛ 3

КУЛЬТИВУВАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

Основний напрямок біотехнології – інтенсифікація виробничих процесів, яку можна досягти шляхом впровадження високопродуктивних нових біологічних об'єктів, вибору належної сировини для вирощування продуцента, розроблення найліпшої конструкції біореактора та покращення методів виділення та очищення цільового продукту.

3.1. Субстрати для культивування біооб'єктів

У вирощуванні об'єктів біотехнології (продуцентів якихось сполук), живильні середовища бувають невизначеного складу, а також можуть містити такі біогенні добавки (тваринні, рослинні чи мікробні) як кукурудзяне борошно, м'ясний екстракт, морські водорості тощо. Також застосовуються середовища із чистих хімічних сполук деякого складу («синтетичні»).

Склад компонентів середовищ формується поживними потребами продуцента. У більшості процесів беруть за об'єкти гетеротрофні організми, які поділяються на: орґаноавтотрофи (як джерела енергії вживають органічні речовини), літогетеротрофи (як джерела вуглецю використовують органічні речовини) та орґаногетеротрофи (для них органічні речовини слугують джерелами енергії і вуглецю).

В біотехнології для приготування поживних середовищ використовують різні субстрати, які мають відповідати деяким критеріям. Субстрат – сировина, призначена для одержання цільового продукту, тому має бути дешевою, недефіцитною, і за можливістю доступною.

Для біотехнологічних цілей, досить гарне утилізоване джерело вуглецю – рослинна біомаса, а меншою мірою є біомаса тваринних організмів. Так, основою цих положень є давно існуюче виробництво алкоголю із зерна, а сиру з молока. Можна розглядати рослинні джерела як майже невичерпні. Сама велика частка біомаси формується у вигляді деревини. Тільки 6% первинної продукції завдяки фотосинтезу становить продукція сільського господарства, хоча із неї якраз виходить головна частина їжі для людей та тварин, крім того потрібних матеріалів (для текстильної, паперової промисловості та ін.).

На даний час біомаса лісового й сільського господарства є значним економічним потенціалом більшості країн світу, насамперед тропічних та субтропічних регіонів.

Природні сировинні матеріали. Основними джерелами природної сировини було і є сільське господарство, а також галузі лісівництва. Матеріали, отримані в цих галузях є сполуками різної хімічної складності, які містять крохмаль, цукор, геміцелюлози, целюлозу та лігнін.

Для біотехнологічних процесів найкращим і найдоступнішим живильним субстратом є сировина, яка застосовується при виробництві цукру, тобто цукровий буряк, а також цукровий очерет. Проте на сьогодні в світі загальноприйняте використання цукру з року в рік знижується, а сам цукор замінюють на ефективніші підсолоджувачі. Наприклад, цукрову тростину використовують як субстрат для бразильської «паливної» програми (виробництво етанолу як пального для двигунів внутрішнього згорання). Досить швидко даний приклад переконує інші країни світу в перспективності цієї нової технології.

Особливе значення становлять крохмаломісткі сільськогосподарські продукти, які складаються із різних

злаків. До них належать: кукурудза, пшениця, рис, різні коренеплоди, картопля, солодка картопля, а також маніока.

Більша половина висушеної рослинної маси сільськогосподарського і лісового походження належить найпоширенішому з біополімерів – полісахарид целюлозі, яка містить цінне джерело енергії і вуглецю. Целюлоза у чистому виді легко руйнується за допомогою ферментативного чи хімічного гідролізу до розчинних цукрів, які з легкістю потім піддаються ферментації (тобто зброджуванню) мікроорганізмами із виділенням бутанолу, етанолу, ацетону, метану, одноклітинного білка і багатьох інших продуктів. Значних успіхів в даному аспекті досягли в США, Британії та Швеції.

Найбільших труднощів зазнають при намаганні утилізувати деревину, в якій целюлоза перебуває в комплексі разом із геміцелюлозою та лігніном. Такі лігноцелюлозні комплекси передбачають досить високий ступінь стійкості до біодеградації.

Використання побічних продуктів як сировину для біотехнології. Найголовнішим завданням біотехнології було і є максимальне використання великої кількості органічних відходів, які утворюються скрізь у світовому виробництві. Адже біотехнологічна утилізація таких відходів, насамперед, забезпечить очищення джерел забруднення (як приклад – стічних вод), а також зумовить перебудову даних відходів на корисні цільові продукти. Наприклад, велика кількість вторинних матеріалів харчової промисловості є економічно не вигідною і досить часто викидається просто в магістральні водні системи, утворюючи цим значне забруднення зовнішнього середовища. Через це, дуже перспективною вбачається розробка нової технології їх утилізації як біотехнологічної сировини, при цьому маючи подвійну вигоду.

Досить поширені види відходів, які зараз застосовуються в біотехнологічних процесах як сировина для ферментації, меляса (або чорна патока), а також молочна сироватка. Меляса – це вторинний продукт, який утворений при виробництві цукру, та може містити до 50% цукрів. Її використовують як поживний субстрат для ферментаційних процесів під час виробництва органічних кислот, антибіотиків і комерційних дріжджів у хлібовипікання; також мелясу використовують в чистому вигляді як добавку до корму тварин. Одержану при виробництві сиру сироватку, також використовують як поживний субстрат для ферментації.

Все більше в біотехнологічних виробництвах знаходять застосування складніші продукти відходів – це солома і жом (цукрове виробництво), які також є у великих обсягах і в багатьох місцях, в залежності від покращення процесів розщеплення лігноцелюлозних з'єднань.

Хімічні й нафтохімічні субстрати. У зв'язку із розвитком у комерційних масштабах біотехнологічних процесів для виробництва одноклітинного білка та ряду інших органічних продуктів, більшість поживних речовин як хімічного, так нафтохімічного походження становлять важливе значення як поживні субстрати для ферментації. Їх перевага в тому, що їх можна одержувати з різних країн світу (такі як метанол і етанол). Найефективнішим субстратом із складу нафти є н-алкани із вмістом вуглецевих атомів від 10 до 20. Вони утилізуються багатьма бактеріями, а також дріжджами. Проте, як нафта, так і газ теж виснажуються. У зв'язку з цим біотехнології орієнтуються також на поновлювані джерела сировини. Привертається увага до різноманітних видів рослинної маси: бульби, плоди, соки, трав'яна маса, а також вже згадувана деревина. Також використовуються відходи сільського господарства, паперової й деревообробної

промисловості, та різних галузей харчової промисловості. Тому, можливість використання перерахованих вище сировинних матеріалів – це основа створення різних безвідходних виробництв.

3.2. Сировинні матеріали та перспективи біотехнології

Головними критеріями, які дотримуються при виборі сировини для біотехнологічних процесів, є такі як: вартість, хімічний склад, наявність у достатніх кількостях, форма та ступінь окислення джерела вуглецю тощо. На сьогодні комерційно вигідними матеріалами і тими, що найширше використовуються є крохмаль (здебільшого кукурудзяний), метанол, сирий цукор і меляса. Безсумнівно зернові (а саме кукурудза, пшениця і рис) для біотехнологічних процесів будуть головними короткостроковими сировинними матеріалами, зокрема в тих країнах, де досить розвинені біотехнологічні процеси.

Варто наголосити, що сучасна біотехнологія здебільшого орієнтується на різні види доступної, недорогої та відновлюваної сировини, серед якої найбільшого значення має рослинна маса. Основна увага при конверсії субстратів у біотехнологічних процесах приділяється створенню безвідходних виробництв, при яких вторинні продукти одного процесу слугують поживними субстратами для іншого.

РОЗДІЛ 4

ТЕХНОЛОГІЯ ФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

В процесі ферментації можуть використовуватися цілі живі клітини (клітини рослин чи тварин, мікроорганізми,) або ж клітинні компоненти з ціллю хімічних чи фізичних перетворень органічних речовин. Проте лише одержувати потрібні зміни речовин недостатньо, спосіб повинен переважати над іншими технологіями виробництва, які застосовують у виробництві цих же продуктів.

Досить багатогранними є переваги виробництва біотехнологічними методами органічних продуктів перед суто хімічними способами:

- такі багатоскладові органічні молекули, як антибіотики й білки, практично не можуть синтезуватися хімічними методами;
- біоконверсія сприяє набагато більшому виходу цільового продукту.
- біологічні системи можуть функціонувати при нижчих температурах, наближених до нейтрального значення рН;
- досить специфічними є біологічні реакції, в порівнянні з реакціями хімічного каталізу,
- практично всю продукцію чистих ізомерів одного типу забезпечують біологічні процеси, а не їхніх сумішей, як це здебільшого відбувається у реакціях хімічного синтезу.

Разом з тим біологічні методи порівняно з хімічними способами також мають і ряд недоліків:

- з легкістю можуть бути забруднені біологічні системи небажаною сторонньою мікрофлорою;
- цільовий продукт, який синтезується шляхом біологічного методу, наявний у складній суміші, що

породжує необхідність у його відділенні від домішки зайвих речовин;

- біотехнологічні виробництва потребують значних обсягів води, яку в кінці необхідно видаляти шляхом скидання у навколишнє середовище;
- традиційно біопроцеси йдуть значно повільніше ніж стандартні хімічні процеси.

Відповідно до кожного біотехнологічного процесу має розроблятися конкретна схема, а сам процес має весь час спостерігатися та бути під ретельним контролем. Для багатьох практичних біотехнологічних процесів цими системами можуть бути біореактори або ферментери, які дотримуються відповідних фізичних умов, що сприяють найефективнішій взаємодії каталізатора із середовищем і матеріалом, що поставляється.

4.1. Біореактори

Біореактор – це ізольована система, до якої додають біологічні агенти разом з іншими матеріалами, а в процесі реакції, що протікає, здійснюється або їх розмноження або утворення інших речовин. Здебільшого біореактори, обладнують пристроями для контролю, регулювання, вилучення і додавання матеріалів. Головною вимогою до будь-якого біореактора є забезпечення оптимальних умов для росту продуцента або накопичення продукту, який ним синтезується. Щоб досягти зазначених цілей необхідно розробити таку технологію, яка б оптимізувала процес, зокрема: використовувати конкретне джерело енергії; поживні речовини мають відповідати живильним потребам самого організму-продуцента; із ростового середовища мають видалятися з'єднання, які інгібують його життєдіяльність; має бути підібрана конкретна посівна доза; повинні забезпечуватися всі інші потрібні фізико-хімічні

умови. За своєю основою економічно рентабельні процеси досить подібні, незважаючи на обраний продуцент, середовище, яке використовується та утворений продукт. Практично один і той же біореактор (лише з деякими змінами) можуть використовувати для виробництва антибіотиків, ферментів, органічних кислот чи одноклітинного білка.

Від процесів хімічного синтезу значно відрізняються біотехнологічні процеси, які бувають двох типів: періодичні та безперервні. Їх специфіка полягає в тому, що в них беруть участь саме живі клітини, субклітинні структури чи ж виділені з клітин ферменти, а також їхні комплекси. А це істотно впливає на процеси масообміну (тобто обміну речовин між різними фазами, а саме перенесення кисню із газоподібної фази у рідку) та теплообміну (тобто перерозподілу теплової енергії поміж взаємодіючими фазами). Саме тому найважливішим механізмом біореакторів вважається система перемішування, яка може забезпечити однорідність умов в апараті.

Також суттєвою відмінністю між хімічними й біотехнологічними процесами є неодмінність створення аеробних чи анаеробних умов, які необхідні для культивування конкретного організму. Згідно цього в деяких випадках є необхідність подавати кисень та видаляти газоподібні продукти іншого роду, які утворюються, зокрема це стосується двоокису вуглецю (CO_2). Найчастіше системи аерації досить складної конструкції, через те, що вони забезпечують певний баланс між витратою O_2 та його надходженням у необхідних обсягах, не дивлячись на те, що потреба у кисні на різних стадіях культивування не однакова.

Надважливою умовою є забезпечення відповідного рівня теплообміну в біореакторах, у зв'язку з тим, що

життєдіяльність та метаболічна активність об'єктів певною мірою залежать від коливань температури.

Серйозною проблемою теж при культивуванні у біореакторах буває піноутворення, що пов'язане з потребою аерування вмісту, в якому завжди наявні поверхнево-активні речовини (ПАР). Ця ситуація змушує до інтенсивної розробки ефективних систем піногасіння.

Одним із специфічних елементів біореактора є система, яка забезпечує саме стерильність процесу. Здійснюється стерилізація на будь-яких етапах процесу, і до його початку, і під час його здійснення й після його закінчення. Отже, в біотехнологічному виробництві процесам стерилізації відводиться досить важливе місце.

В біотехнологію в останні роки впроваджується принцип диференціювання режимів культивування, а саме: будь-які етапи одного і того ж процесу реалізуються за різних умов – температура, аерація, рН і т. д. Безумовно, це створює додаткові нові вимоги в конструюванні реакторів. Тому, відповідно до головних принципів реалізації біотехнологічних процесів, біореактори сьогодення мають володіти системами:

- продуктивного перемішування, а також гомогенізації середовища вирощування;
- забезпечення швидкої і вільної дифузії газоподібних складників системи (в першу чергу аерація);
- теплообміну, який підтримує оптимальну температуру та її контрольовані зміни всередині реактора;
- піногасіння;
- стерилізації самих середовищ, повітря й апаратури;
- регулювання і контролю процесу, а також його окремих етапів.

Перед розробкою нових біотехнологічних процесів вдаються спочатку до періодичного культивування, яке складається із таких етапів: стерилізація середовищ й

обладнання, внесення до біореактора живильного середовища, завантаження посівного матеріалу, вирощування культури, відокремлення, а також очищення вже готового продукту. Після проведення останнього етапу здійснюється миття біореактора, а також його підготовка до нового циклу.

За такого типу культивування, ріст клітинної популяції підрозподіляється на такі фази (рис. 4.1):

1) зазвичай після введення інокулянта можемо спостерігати індукційний період (*лаг-фаза*) (1), протягом якого не здійснюється помітне збільшення кількості клітин або утворення якихось продуктів. У даний період перебудовується метаболізм клітини, а також синтезуються ферменти, які є специфічними до застосування уже нових субстратів, посилюється біосинтез білка;

2) на зміну індукційному періоду приходить *фаза експоненціального зростання* (2), протягом якої досить швидко накопичуються біомаса, а також продукти будь-яких реакцій. Ця фаза суворо описується експоненціальною кривою;

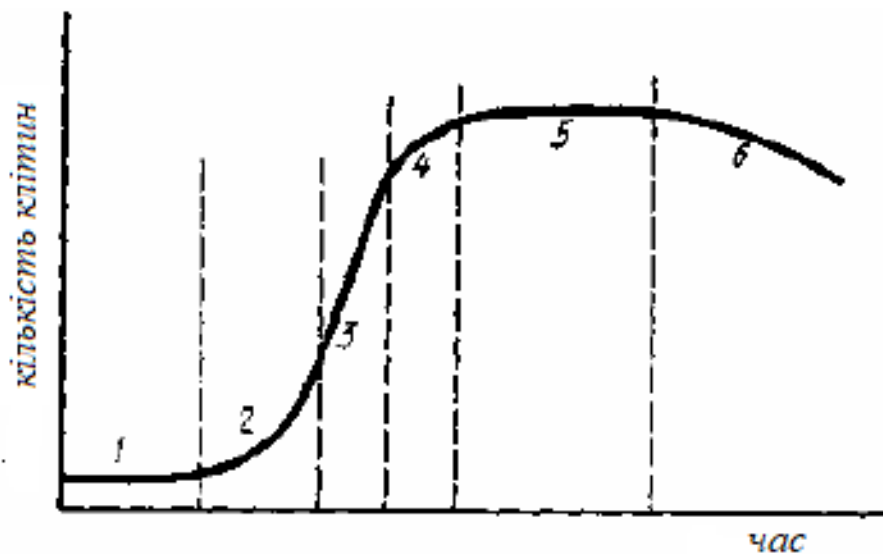
3) експоненціальна фаза росту у замкнутій системі не може необмежено розвиватися. Здебільшого, вона перебігає у *фазу лінійного зростання* (3), яка передбачає лінійний ріст культури рівномірний у часі. Ця фаза характеризується вже відхиленням точок у бік менших значень числа клітин чи продуктів, яке є експериментальним критерієм у переході культури до лінійної фази зростання;

4) фаза лінійного зростання може змінюватися досить недовгим періодом, протягом якого темп зростання культури спуститься до нуля. Це так звана *фаза сповільнення зростання* (4);

5) у певних ситуаціях зростання культури переходить в дуже тривалу і стійку *стаціонарну фазу* (5). У таких умовах

культура дозріває у режимі сталості загальної кількості клітин. Цей режим передбачає дуже високі темпи відмирання клітин. Причому швидкість приросту біомаси абсолютно компенсується швидкістю лізису і загибелі клітин;

б) у випадку, коли система виснажується повністю за субстратом або накопичення продуктів, які пригнічують ріст є суттєвим, швидкість приросту біомаси дорівнює нулю, а також відбуваються значні фізіологічні зміни клітин, і здебільшого настає *фаза відмирання культури* (6).



1 – індукційний період; 2 – фаза експоненціального зростання; 3 – фаза лінійного росту; 4 – фаза сповільнення зростання; 5 – стаціонарна фаза; 6 – фаза відмирання культури

Рис. 4.1. Типова кінетична крива зростання популяції мікроорганізмів

Цінні продукти, з біотехнологічної точки зору, можуть синтезуватися і в експоненціальній фазі (багато ферментів, нуклеотиди, вітаміни – первинні метаболіти), і в стаціонарній фазі зростання (пігменти, антибіотики, тощо – вторинні метаболіти).

Широкого використання у біотехнології набуло періодичне **культивування із підживленням**, яке передбачає, що після первинного додавання поживного субстрату до засіву культури, під час культивування до апарату вносять поживні речовини через деякі інтервали порціями, або безупинно «крапля за краплею».

Також є **відокремлено-доливне культивування**, при якому періодично частина вмісту біореактора вилучається, а також вноситься рівний обсяг живильного середовища. Цей спосіб забезпечує постійне «омолодження» культури і стримує перехід її до фази відмирання. Інколи такий прийом називають напівбезперервним культивуванням.

Видозміненням періодичного культивування виступає **культивування з діалізом**, яке передбачає регулярне надходження до реактору живильного субстрату через спеціальну мембрану. Завдяки діалізу знижується концентрація продуктів життєдіяльності клітин, які мають негативний вплив на їх життєздатність. Також, за допомогою діалізу видаляється із культури певна частина рідини, завдяки чому в кінці процесу одержується концентрована біомаса.

Безперервні процеси культивування передбачають те, що клітини підтримуються постійно в експоненціальній фазі зростання. Заради цього в біореактор завантажуються нове живильне середовище, а також забезпечується з нього відтік культуральної рідини, яка вміщує клітини та продукти їхньої життєдіяльності. Основа безперервних процесів – абсолютне дотримання рівноваги між приростом біомаси в результаті поділу клітин, а також їх зменшенням внаслідок розведення вмісту свіжим середовищем. Режими безперервного культивування розподіляють на хемостатний і турбідостатний.

За **хемостатного режиму культивування** виникає саморегульована система внаслідок ряду причин: якщо

первинне надходження свіжого живильного середовища, а також вимивання біомаси значно перевищує швидкість ділення клітин, то внаслідок розведення культури дуже знизиться концентрація речовин, які зменшують ростові процеси, а швидкість зростання культури підвищується; популяція, яка збільшується починає дуже активно «поїдати» субстрат, що в результаті призводить до сповільнення зростання культури. Підсумком таких процесів (після цілої серії затухаючих коливань) є врегулювання рівноваги між швидкістю зростання культури, а також її розведенням.

Біореактор, який працює у хемостатному режимі культивування, називається Хемостатом. Конструкція цього біореактора передбачає наявність:

- 1) прилаштування для подачі самого живильного середовища;
- 2) пристрою, який гарантує відтік культуральної рідини спільно із клітинами;
- 3) такої системи, яка здійснює контроль за концентрацією елементів живильного середовища, а також яка керує швидкістю подання живильного середовища.

Основою **турбідостатного режиму культивування** є безпосередній контроль концентрації біомаси. Широко відомим методом визначення біомаси є вимір за допомогою фотоелементів світлорозсіювання. Збільшення концентрації клітин, а відповідно й оптичної щільності механічно прискорює потік рідини і навпаки. За конструкцією турбідостати не дуже відрізняються від хемостатів – тільки системами контролю за швидкістю потоків.

Використовують хемостати у процесах, що характеризуються низькою протокою, при якій концентрація клітин дещо змінюється зі зміною швидкості потоки, внаслідок чого полегшується саморегулювання системи.

Турбідостати ж застосовують в процесах, які відзначаються високою швидкістю розбавлення за різкої зміни концентрації біомаси.

4.2. Конструкція біореакторів

Для розробки оптимальної біореакторної системи потрібне чітке дотримання таких положень:

- біореактор має бути так сконструйований, щоб повністю виключалось потрапляння до нього забруднюючих мікроорганізмів, а також зберігалась необхідна мікрофлора;
- має залишатися незмінною кількість культивованої суміші (не має бути витоку або ж випаровування її вмісту);
- вище критичних рівнів аерування культури аеробних організмів повинен підтримуватися рівень розчиненого кисню;
- під постійним контролем повинні бути такі параметри зовнішнього середовища як рН, температура та ін.;
- гарно перемішуватися повинна культура при вирощуванні.

Висуваються певні вимоги до матеріалів, які застосовуються у конструюванні складних біореакторів:

1) матеріали, які вступають у взаємодію із розчинами, що надходять у біореактор, та які контактують із культурою мікроорганізму, мають бути стійкі до корозії, задля запобігання, навіть у маленькій кількості, забруднення металами;

2) матеріали мають бути нетоксичні, задля того щоб навіть при мінімальній розчинності вони не могли інгібувати зростання культури;

3) матеріали і компоненти біореактора мають витримувати і повторну стерилізацію паром під тиском;

4) система біореактора, яка відповідає за перемішування, а також місця надходження, виходу

продуктів і матеріалів мають бути легко доступними, а найголовніше досить міцними, щоб не ламатися чи деформуватися при механічних впливах;

5) потрібно встановити візуальне спостереження за культурою і середовищем таким чином, щоб матеріали, які використовуються в процесі, за можливості були прозорими.

Для поліпшення біотехнологічних процесів необхідно забезпечити проведення постійного ретельного контролю за картиною ферментації, яка може змінюватися, шляхом наявних у біореакторах відповідних датчиків, за допомогою яких можна здійснювати виборчий аналіз конкретних параметрів ферментаційного процесу. Найважливіша частина більшості ферментації – це та чи інша ступінь комп'ютеризації.

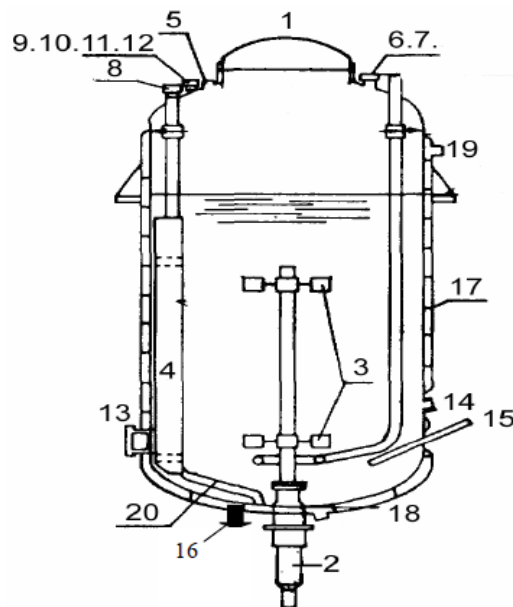
Значущим класифікаційним критерієм біореакторів різних типів є саме системи перемішування. Так, за способом перемішування й аерації поділяють біореактори на апарати з **механічним**, а також **пневматичним та циркуляційним перемішуванням**.

У сучасній мікробіологічній промисловості найпоширенішими є **апарати з механічним перемішуванням** (рис. 4.2). Ці реактори оснащені механічною мішалкою із центральним валом, а також лопатками, кількість яких традиційно дорівнює 6, в окремих випадках 8. Самі лопатки можуть бути як прямі, так і вигнуті, здебільшого вони розташовуються у декілька ярусів, що дозволяє ефективніше перемішувати досить великі об'єми рідини. У системі також містяться відбивні перегородки – це такі вузькі металеві пластинки, які прикручені до внутрішніх стінок біореактора. Вони дають змогу запобігати виникненню вирів, а також здійснюють вихровий рух рідини, яка плавно і рівномірно розподіляється у всьому реакторі.

Також аерацію можна здійснювати за допомогою барботажу, тобто шляхом подачі знизу повітря через

горизонтальну трубку із отворами, подекуди аерування здійснюють за допомогою спеціальних вібраторів, які мають здатність забезпечувати високу ступінь асептики та низьку витрату енергії, а також майже не травмують клітини.

В апаратах з пневматичним перемішуванням мішалка відсутня, а процес перемішування рідини реалізовується за допомогою бульбашок газу. Безумовно швидкість масообміну у таких апаратах набагато нижча, в порівнянні ферментерами з механічним перемішуванням. Прикладом апарату такого типу є *ерліфтний реактор* (з англ. «air lift» – підйом повітря). Біореакторам із пневматичним перемішуванням притаманне більш плавне (м'якше) перемішування вмісту. Найбільшого поширення вони набули при вирощуванні клітин рослин і тварин.



1 – кришка люка; 2 – мішалка; 3 – крильчатка; 4 – відбивна перегородка; 5 – вихід повітря; 6-7 – вікно для спостереження; 8-12 – стерильні з'єднання; 13 – введення проби; 14 – Муфта для рН електрода; 15 – карман для термометра; 16 – зливний кран (для ферментерів об'ємом понад 2000 літрів); 17 – подвійна сорочка; 18-19 – закріплення для пари і охолоджуючої води; 20 – злив

Рис. 4.2. Схема пристрою біореактора з механічним перемішуванням

За допомогою *біореакторів циркуляційного типу*, які обладнані насосами й ежекторами, утворюють спрямований потік рідини по замкнутому колу. Сама рідина зтягує за собою бульбашки газу, внаслідок чого культуральне середовище водночас із перемішуванням насичується атмосферним киснем або (із застосуванням спеціальних пристроїв, а також ежекторів) газом якогось іншого типу. Дані біореактори відрізняються від інших простотою конструкції та, насамперед, надійністю в експлуатації.

В останні роки проводяться розробки нових способів аерації. Так, наприклад, може подаватися повітря через спеціальні поліпропіленові мембрани. Це дає змогу уникати піноутворення, а також досить добре зарекомендувало себе у процесі вирощування клітин еукаріотичних організмів (насамперед при промисловому одержанні інтерферону).

Теплообмін здійснюється у біореакторах за допомогою спеціальних труб з нагріваючим чи охолоджуючим агентом, які обплутують апарат та утворюють ніби сорочку реактора. В деяких випадках така система труб безпосередньо розташовується у порожнині ферментера. У промислових біореакторах нагріваючими агентами є гаряча вода або ж пар, а в лабораторних ферментерах – електричний підігрів.

Система піногасіння біореактора є засобом боротьби з надлишковим піноутворенням. Відомі механічні, хімічні, акустичні та багато інших видів піногасіння. Найчастіше використовують механічні та хімічні способи піногасіння. Механічні піногасники це пристрої, за допомогою яких можна збивати піну: диски, барабани, що містяться у верхній частині реактора. Складнішими пристосуваннями є сепаратори піни, які водночас слугують і для збирання біомаси, що наявна у шарі піни.

До хімічних способів відносять поверхнево активні речовини, які, при проникненні у стінки бульбашок, стають так званими «центрами їх нестійкості». Досить ефективними

піногасниками є тваринні жири і рослинні масла. Проте такі піногасники мають суттєвий недолік, адже при їх утилізації мікробними клітинами, вони самі по собі можуть спричинити піноутворення.

Пристрої стерилізації та її режим обумовлюються конструкцією біореактора, а також допоміжного обладнання, поживних середовищ, які використовуються і т. д. Важливу роль відіграє термічний спосіб стерилізації середовищ і обладнання, а також фільтраційний метод, який використовують для видалення мікроорганізмів з повітря або іншого газу, який подається у ферментери.,

Технологія самого виробничого процесу відбувається поетапно: у лабораторних, дослідно-промислових (пілотних), а також промислових установках. Здебільшого зустрічаються апарати з такими обсягами ферменторної камери як: 0,5-100 л – лабораторні, 100-5000 л – лабораторно-промислові, 5000-1000000 л і навіть більше – промислові. Кожен етап збільшення масштабу ферментації передбачає вирішення конкретних завдань щодо налагодження виробництва та способів його покращення.

Завдяки *лабораторним біореакторам* вирішуються такі завдання:

- кінетичні, тобто визначається швидкість зростання клітин, а також ефективність утилізації субстратів й утворення цільового продукту;

- окремі масообмінні, до них відносяться: розрахунок коефіцієнтів масовіддачі, а також швидкість прибування у середовище O_2 й будь-яких інших газів, і швидкість вивільнення від газоподібних продуктів, які будуть утворюватися при культивуванні продуцентів (зокрема CO_2);

- визначення коефіцієнтів реакцій, які пов'язують вже утилізовані субстрати та O_2 з одержаними цільовим, а також побічними продуктами.

Для пошуку найефективніших технологій та й загалом моделювання промислового процесу використовують *лабораторно-промислові установки*. Тому намагаються на цьому етапі використовувати саме той тип апарату, який планується застосовувати у промисловому масштабі.

4.3. Спеціалізовані ферментаційні процеси

Багато ферментативних технологій пов'язані саме з рідкими аеруючими системами, але сьогодні широко використовуються такі ферментаційні технології, які базуються на утилізації густих субстратів, за відсутності взагалі або малій кількості води, та в безкисневих умовах. Є процеси, в яких рідка фаза використовується тільки для зрошування твердої поверхні чи газу (повітря). Залежно від фази, яка переважає, процеси, а також належні їм апарати поділяють на твердофазні й газофазні.

Твердофазні традиційно реалізуються на основі рослинної сировини, а найчастіше використовують дріжджі або міцеліальні гриби. Існують такі типи твердофазних процесів:

- поверхневі, якщо шар субстрату не більший за 3-7 см. Як «біореактори» використовують досить великі (декілька квадратних метрів) підноси або ж культуральні камери;
- глибинні процеси, які відбуваються не в шарі перемішування. Біореакторами є відкриті глибокі судини. Для твердофазних аеробних процесів розроблені спеціальні пристрої, які здійснюють конвекційний і дифузний газообмін;
- процеси перемішування, які відбуваються в аеруючій і перемішуючій масі субстрату, який здебільшого є гомогенним (напіврідка консистенція) або ж містить частинки твердої речовини, зважені в рідині (перехід від твердофазного до рідкофазного процесу). З цією метою

здебільшого використовуються біореактори із низькою швидкістю перемішування.

Зацікавленість твердофазними процесами, насамперед, обумовлена їх певними перевагами якщо порівнювати із процесами, які відбуваються у рідкій фазі. Такими перевагами є те, що вони потребують менших затрат на оснащення, та вони набагато дешевші в експлуатації; тип субстрату значно полегшує відокремлення й очищення продукту; малий вміст води попереджає зараження культури продуцента чужою мікрофлорою; саме твердофазні процеси взагалі не пов'язані із викиданням великих об'ємів стічних вод у навколишнє середовище.

Проте, й ці процеси мають деякі недоліки. Так, через відсутність гарного перемішування, досить часто продуцент зростає у вигляді колоній та лише плавно поширюється по всьому об'єму субстрату. У такому випадку виникає місцева недостача поживних речовин, а певна частина субстрату не використовується продуцентом взагалі.

В апаратах із твердим наповнювачем, по якому проходить газ, здійснюються газофазні процеси. Наприклад, на основі дріжджів, у них одержують спирт. Газ, який виходить з апарату, виносить за собою продукти життєдіяльності дріжджів (і спирт в тому числі), які конденсуються у холодильнику.

РОЗДІЛ 5

ВІДДІЛЕННЯ, ОЧИЩЕННЯ І МОДИФІКАЦІЯ ПРОДУКТІВ

Кінцевими стадіями біотехнологічних процесів є отримання цільового продукту. Вони суттєво відрізняються, відповідно до того, збирається продукт в клітині, або ж він виводиться у культуральну рідину, чи продуктом взагалі є клітинна біомаса. Найскладнішим є процес виділення внутрішньоклітинного продукту. У такому випадку потрібно відокремити клітини від середовища культивування, потім піддати їх руйнації, а далі очистити цільовий продукт від залишків вже зруйнованих клітин.

Значно полегшується виділення продукту, якщо він виводиться за допомогою продуцента в культуральну рідину. Через це одним з головних завдань біотехнології є створення таких промислових штамів мікроорганізмів, які б секретували максимальний обсяг цінних продуктів у великих кількостях.

Сама технологія виведення та очищення значною мірою залежить від природи цільового продукту. В багатьох випадках не використовують очищення продукту, якщо цей продукт володіє потрібними активностями і в неочищеному вигляді, а також якщо домішка інших речовин не має небажаних впливів у процесі його використання. Є деякі біотехнологічні процеси, які виключають стадію відділення продукту взагалі.

5.1. Відділення біомаси

Початковим етапом очищення цільового продукту є **сепарація** – розподіл культуральної рідини й клітинної біомаси. В окремих випадках перед сепарацією проводять спеціальну обробку реакційної суміші, з метою більш

ефективного відділення біомаси, а також стабілізації продукту, який виділяється. Існують різні способи сепарації.

Флотація. Цей метод застосовують лише в тому випадку, якщо через низьку зволоженість клітини продуцента збираються у поверхневих шарах біореактора. З допомогою спеціальних пристроїв (флотаторів) різної конструкції видаляється піна, яка утворилася при культивуванні, спільно із клітинами, які поприлипали до бульбашок газу. З метою збільшення ефективності відбору біомаси спінюють рідину, а потім механічним шляхом відділяють її верхній шар. Перевагами цього способу є його висока продуктивність, економічність і можливість застосування у безперервних процесах.

Фільтрація. Різноманітні фільтруючі системи, які сьогодні використовуються (стрічкові, барабанні, тарілчасті фільтри, фільтри-преси, карусельні вакуум-фільтри, мембранні фільтри) базуються на одному й тому ж принципі – затриманні біомаси на пористій фільтруючій перегородці. Проте є певний недолік такого методу – налипання клітин на фільтрі, накопичення яких значно зменшує швидкість потоку рідини під час фільтрування.

У фільтрах безперервної дії передбачені системи автоматичного очищення від біомаси, яка може забивати пори. Вона здувається стисненим повітрям з поверхні фільтрів або ж витісняється за допомогою спеціальних «ножів».

Також є фільтри для одноразового або багаторазового періодичного використання. Так, наприклад, мембранні фільтри (тефлонові зокрема), за допомогою яких можна фільтрувати надто розбавлені клітинні суспензії. Проте існує така проблема у їх використанні як забивання пір самими клітинами, а також білками й багатьма іншими колоїдними частинками.

Центрифугування. Такий метод передбачає більш дороге устаткування, в порівнянні з фільтруванням, тому його використовують в тих випадках коли: а) дуже повільно фільтрується суспензія; б) є необхідність повністю звільнити культуральну рідину від частинок, які в ній містяться; в) необхідно організувати безперервний процес сепарації, у якому фільтри передбачають періодичну дію.

5.2. Методи руйнування клітин

Руйнування клітин здійснюється за допомогою хімічних, фізичних і ферментативних методів. Найефективніше промислове значення належить фізичним методам дезінтеграції:

- 1) за допомогою ультразвуку;
- 2) вібраційними або лопатковими дезінтеграторами – спосіб, який найчастіше застосовується у промислових і пілотних установках;
- 3) через струшування зі скляними бусами;
- 4) шляхом продавлювання через вузькі отвори під дією високого тиску;
- 5) за допомогою розчавлення замороженої маси;
- 6) завдяки розтиранню у спеціальних ступках;
- 7) шляхом осмотичного шоку;
- 8) за допомогою багаторазового заморожування й розморожування;
- 9) через стиснення клітинної суспензії із різким пониженням тиску (тобто декомпресією) в подальшому.

Фізичні методи дезінтеграції відрізняються від інших підвищеною економічністю, але вони характеризуються повною відсутністю вираженої специфічності, що в результаті може призвести до того, що обробка негативно вплине на якість одержаного цільового продукту на виході.

За допомогою використання **хімічних і ферментативних методів** забезпечується виборче й м'яке руйнування клітинної стінки. Наприклад, бактеріальні клітини руйнуються за допомогою лізоциму із вмістом ЕДТА (етилен-діамінтетраоцтової кислоти), а от клітинні стінки дріжджів за допомогою зімоліази равликів або ж ферментами актиноміцетного чи грибного походження. Також можуть бути зруйновані клітинні стінки мікроорганізмів шляхом обробки бутанолом або толуолом. Елективний лізис клітин обумовлений дією таких антибіотиків як новобіоцин, поліміксин, ністатин тощо.

Після процесу дезінтеграції клітин треба позбавитися від їхніх «уламків», за допомогою використання тих же методів, що застосовуються у процесі сепарації, тобто фільтрації або центрифугування.

5.3. Відділення й очищення продуктів

Виведення з культуральної рідини цільового продукту чи отриманого після дезінтеграції гомогенату вже зруйнованих клітин реалізують за допомогою осадження, екстракції чи методів адсорбції.

Здійснюється **осадження** розчинених речовин за допомогою фізичних (нагрів, концентрування або розведення, охолодження розчину) або ж хімічних впливів, які перетворюють розчинену речовину в малорозчинний стан.

Екстракція поділяється на два види: твердо-рідкофазну (продукт із твердої переходить у рідку фазу) та рідко-рідкофазну (передбачає перехід продукту із однієї рідкої фази до іншої, теж рідкої).

Такий вид екстракції як твердо-рідкофазна екстракція досить часто передбачає просту обробку твердого зразка водою або ж органічним розчинником для того, щоб

вилучити з нього розчинні з'єднання. Широкого застосування отримали різноманітні органічні розчинники, наприклад, екстрагування ацетоном, який досить ефективно переводить у розчин більшість ліпідних, а також білкових компонентів клітин.

У процесі рідко-рідкофазної екстракції застосовуються такі органічні розчинники як алкілфеноли, галогеніди, ефіри, хлороформ, гексан тощо. Майже зовсім уникати інактивації можна за допомогою методів екстрагування на холоді, іншими словами використовуючи методи кріоекстракції. У такому випадку зрівнюються відмінності між культуральної рідиною і твердим субстратом, через те, що вони обоє перебувають у замороженому стані (тобто в одній фазі). Сама кріоекстракція здійснюється із використанням розчинників, в яких низька температура кипіння, і при простій кімнатній температурі перебуває у газоподібному стані.

Широкого застосування набув такий метод відділення продукту як **адсорбція**. Її розглядають як окремий випадок екстракції, при якому агентом, який екстрагується, слугує тверде тіло. Механізм адсорбції передбачає зв'язування речовини, яка виділяється із газоподібної чи рідкої фази поверхнею твердого тіла. Серед відомих адсорбентів можна виділити деревне вугілля, пористі глини тощо.

Новітніми методами розділення речовин є хроматографія, електрофокусівка, електрофорез, які також базуються на принципах екстракції й адсорбції.

5.4. Концентрування, модифікація та стабілізація продукту

Наступним етапом після відділення продукту є його концентрування, яке здійснюється за допомогою таких головних методів як зворотній осмос, ультрафільтрація, а

також випарювання. Метод зворотного осмосу передбачає те, що розчин, який концентрується поміщають у мішок з напівпроникної мембрани, навколо якого утворюється осмотичний тиск, який значно перевищує осмотичний тиск самого розчину, внаслідок цього розчинник витікає через мембрану проти градієнта концентрації розчиненої речовини, і далі забезпечує концентрування розчину. Метод ультрафільтрації передбачає поділ речовини (його концентрування) шляхом мембранних фільтрів. Такий спосіб ефективний у процесі концентрування малостабільних продуктів (деякі антибіотики, амінокислоти та ферменти).

Найдавнішим методом є випарювання, але воно має суттєвий недолік: щоб видалити розчинник слід нагрівати розчин, який концентрується. Але незважаючи навіть на це, даний спосіб має широке застосування, зокрема в лабораторіях. Найчастіше у виробничих умовах використовуються вакуумні випарники, які передбачають більш ощадний режим концентрування. Традиційно агентом нагрівання слугує водяна пара, проте може також використовуватися обігрів електричними нагрівачами або рідким теплоносієм.

Концентрування за допомогою методу випарювання може обмежитися лише етапом одержуваного сиропоподібного розчину цільового продукту; цей процес називають упарюванням, а отриманий продукт належить до категорії рідких. Наступне вивільнення від вологи реалізовується за допомогою спеціального етапу – сушіння.

Модифікація продуктів. Модифікації різного роду мають місце тоді, коли в результаті процесу отримується тільки «заготовка» цільового продукту. Наприклад, пеніцилін може модифікуватися до напівсинтетичних препаратів, які поступають у практичне використання як комерційні препарати. Сама модифікація – це досить

важливий етап в одержанні багатьох гормонів, ферментів, а також препаратів медичного призначення.

Стабілізація продукту. З метою збереження потрібних властивостей продуктів, які одержують, під час їх зберігання, використання споживачами та реалізації застосовують різноманітні фізико-хімічні впливи для підвищення їх стабільності. Доведено, що деяка ступінь зневоднення суттєво може підвищувати стабільність активностей ферментів, у тому числі й стійкість до нагрівання. Унормування ферментів теж реалізовується шляхом додавання до препаратів гліцерину чи вуглеводів, які здійснюють багаточисленні водневі зв'язки із амінокислотними залишками, що у свою чергу, перешкоджає їх денатуруванню під час нагрівання або ж раптової інактивації.

У певних випадках унормування продукту є завданням спеціального біотехнологічного процесу, а не простої лише фізико-хімічної модифікації. Так, наприклад, унормування харчового продукту, який отримують з яєчних жовтків – меланжу; його властивості при зберіганні досить суттєво змінюються, що призводить до його непридатності для використання. Проте псування самого меланжу можна запобігти шляхом видалення із нього вуглеводів за допомогою вирощування пропіоновокислих бактерій на ньому. Бактерії ніби «виїдають» вуглеводи, при цьому підвищують поживну цінність самого продукту шляхом збагачення вітамінами та органічними кислотами, а також на більш тривалий термін подовжують зберігання меланжу.

РОЗДІЛ 6

ХАРЧОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ

6.1. Мікроорганізми і харчові продукти

Виробництво харчових продуктів засноване на переробці сировини, яка здебільшого поставляється сільським господарством, або ж на застосуванні деяких речовин. Усі органічні речовини, які використовують у харчовій промисловості, можуть застосовуватися мікроорганізмами. Вже це наголошує на головній ролі мікробіології у виробництві продуктів харчування: мікроби тут можуть грати як позитивну, так і негативну роль. Більш вираженою є остання: не дарма запобіжні заходи проти певної небажаної діяльності мікробів належне місце займають при виробництві та споживанні їжі. Розмноження мікробів здебільшого викликає негативні зміни в якості харчових продуктів або у їх зовнішньому вигляді. Адже при цьому досить часто утворюються токсичні речовини. Зрозуміло, що псування їжі, а також пов'язані з цим фактом економічні збитки є небажаними, проте у харчових продуктах найнебезпечнішим наслідком розмноження мікробів є утворення саме токсинів. Певні мікроорганізми за відповідних умов можуть утворювати токсини, які викликають важкі захворювання і навіть смерть.

Мікроорганізми у біотехнології мають позитивне значення, тому їх можливості використання задля збереження їжі є гіршими, ніж при її виробництві. Нижче ми обговоримо застосування сьогодні сучасних методів і знань для інтенсифікації таких виробництв.

6.2. Два різновиди біотехнології

Існують два різновиди біотехнології, які різняться за цінністю одержуваних продуктів, а також за масштабами їхнього виробництва. Ці відмінності наведені у табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Два типи біотехнологій

	<i>Дрібномасштабні</i>	<i>Великомасштабні</i>
Об'єм установки	100-1000 л	10 000 л
Вартість продукції	Висока	Невисока
Тип продукції	Для медицини, фармацевтичної промисловості, високоспеціалізована	Предмети споживання. малоспеціалізована
Основні напрямки біотехнологічних досліджень та розробок	Генетичні маніпуляції	Технологія ферментації, інженерія процесів
Вартість наукових досліджень й розвитку	Підвищена	Знижена

Біотехнологія маломасштабного виробництва, яка дає досить вартісну продукцію спеціального призначення, дуже відрізняється від самої біотехнології харчової промисловості. Це визначається економікою. Їжу одержується із досить недорогої сировини та відносно дешевими методами. Сама вартість кінцевого продукту за часту не виправдовує вартісних досліджень із модернізації виробництва, як це може бути, наприклад, при одержанні антибіотиків, та воно й не потрібно. Виробництво навіть мікробних ферментів, а також їх використання у харчовій

промисловості, яке пов'язане із використанням складної технології, вірно було б вважати біотехнологією великомасштабного виробництва дешевих продуктів. Людина, яка знайома з технічною біохімією, знає, що для одержання ферментів високої чистоти й специфічності потрібно докласти великих зусиль.

Ці препарати надто вартісні, а ще їх не використовують у виробництві харчових продуктів, а натомість застосовують напівочищені ферменти. Очищення проводиться доти доки їх можна використовувати в досить маленькому обсязі. Виключенням може бути лише те, коли іммобілізують фермент на твердому носії, через який перепускають субстрат. У даних проточних реакторах фермент застосовується досить ефективно і багаторазово, що й виправдовує використання високоочищених препаратів. Але не варто сприймати так, що перспективи біотехнології у харчовій промисловості є обмеженими, краще сказати про витрати на виробництво їжі у розумних межах. В цій ситуації необхідний великий вихід продукту, а також проста технологія. Саме з цих причин основні в біотехнології харчової промисловості – це способи великомасштабного виробництва продуктів.

6.2.1. Межі застосування біотехнології у харчовій промисловості

Діапазон продуктів харчування, які отримують за допомогою мікроорганізмів, досить великий: від вироблюваних давним-давно через бродіння хліба, йогурту, сиру, пива і вина до такого нового типу харчового продукту як грибний білок мікопротеїна. При цьому мікроорганізми мають різне значення: використовуються ферменти, які продукуються ними, або ж якісь інші метаболіти, за допомогою їх зброджується харчова сировина, а також деякі з них вирощуються саме для споживання. Для здійснення

процесів у харчовій промисловості використовують і чисті культури мікроорганізмів, і дикі форми, що у значній кількості містяться у сировині, та які розмножуються при створенні відповідних умов.

Особливо характерний останній спосіб для традиційних бродильних виробництв, які ще зародилися в часи, коли ще нічого не знали про мікроби. У промисловому виробництві ці процеси ведуться здебільшого під суворішим контролем. Насамперед це відноситься до вибору штаму, а також до чистоти культур мікроорганізмів, які використовуються. До сьогодні біотехнологія здебільшого застосовувалася у харчовій промисловості задля удосконалення освоєних процесів, а також більш ефективного використання мікроорганізмів, але майбутнє належить генетичним дослідженням зі створенню продуктивніших штамів для конкретних потреб, упровадженню все нових методів у технології бродіння. За допомогою цього можна підвищити вихід, а також якість продукції, яка випускається й освоїти виробництво вже нових її різновидів.

6.3. Молочні продукти

Ферментацію у харчовій промисловості використовують здебільшого для одержання молочних продуктів. У сквашуванні молока насамперед беруть участь молочнокислі бактерії і стрептококи; при цьому лактоза перетворюється у молочну кислоту. За допомогою використання інших реакцій, які супроводжують основний процес або проходять у подальшій обробці, одержуються й інші продукти переробки молока. Ними є сметана, сир, йогурт і пахта.

Властивості самого кінцевого продукту при цьому напряму залежать від характеру й інтенсивності реакцій ферментації. Реакції, які допомагають головному процесу утворення молочної кислоти, саме і визначають основні

властивості продуктів. Саме вторинні реакції ферментації, які проходять при дозріванні сирів, можуть визначати смак деяких їх сортів. У певних таких реакціях беруть участь амінокислоти, пептиди та жирні кислоти, які містяться у продуктах.

Під час ферментації у молоці можуть протікати шість головних реакцій, в результаті чого утворюються молочна, лимонна або пропіонова кислота, масляна кислота, спирт або ж здійснюються коліформні газоутворення. Головною реакцією є утворення молочної кислоти, на якій засновані всі методи ферментації (скашування) молока. При цьому лактоза молока гідролізується з утворенням глюкози і галактози. Традиційно галактоза перетворюється у глюкозу ще до етапу скашування. Бактерії, які містяться у молоці перетворюють глюкозу в молочну кислоту. Утворення згустку казеїну здійснюється у ізоелектричній точці даного білка (рН 4,6) під впливом молочної кислоти. Такий процес лежить в основі сироваріння.

У виробництві швейцарського сиру ключовим є маслянокисле бродіння із подальшим утворенням вуглекислого газу. Воно і обумовлює своєрідний смак таких сирів та утворення очок. Характерний смак сметани, пахти і вершкового сиру утворюється внаслідок лимоннокислого бродіння. Його складовими смаками є діацетил, пропіонова і оцтова кислоти, а також інші близькі до них сполуки. Молочні продукти, які одержують шляхом спиртового бродіння, досить мало відомі як в Європі, так і в Америці. Цей тип бродіння застосовується при переробці молока в Росії, проте у виробництві інших продуктів його вважають небажаним. Також небажаним є маслянокисле бродіння й коліформні газоутворення. На сьогодні різні процеси ферментації молока проводяться у контрольованих умовах. Тисячоліттями їх здійснювали за участю бактерій, які містяться у молоці. У наш же час використовуються

різноманітні закваски, за допомогою яких можна одержати молочні продукти необхідної якості та типу. При цьому культури живих бактерій, які застосовуються, становлять або один штам певного виду (культури моноштамів), або ж декілька штамів і/або видів (багатоштамові чи змішані культури).

Комерційні культури-закваски містять бактерії, які утворюють молочну кислоту, а також пахучі речовини. У табл. 6.2 зазначені деякі види бактерій, які застосовуються у виробництві молочних продуктів шляхом ферментації, та їхнє значення у даних процесах, а також продукти, що отримують за їх допомогою. Самі вибір і склад комбінацій цих штамів, а також видів бактерій визначаються бажаними умовами отримання і властивостями продуктів. Прикладом цього може бути швидкість утворення молочної кислоти.

Таблиця 6.2

**Функціональна роль деяких видів бактерій,
які використовуються у переробці молока**

Культура	Функція	Використання
<i>Propionibacterium</i> <i>P. shermanii</i> <i>P. petersonii</i>	Формування смаку, утворення очок	Виробництво швейцарського сиру
<i>Lactobacillus</i> <i>L. easel</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. lactis</i>	Утворення кислоти	Дозрівання, закваска для швейцарського сиру, виробництво сирів типу швейцарського
<i>Leuconostoc</i> <i>L. dextranicum</i> <i>L. citrovorum</i>	Утворення смакових речовин з лимонної кислоти (здебільшого диацетила)	Виробництво вершкового масла, сметани, заквасок
<i>Streptococcus</i> <i>S. thermophilus</i> <i>S. lactis</i> <i>S. cremoris</i>	Утворення кислоти	Виробництво йогурту, швейцарського сиру, закваски для сирів

В наступних розділах розглянемо різноманітні молочні продукт, які виробляються методом ферментації, а також способи їх виробництва та шляхів їх удосконалення.

6.3.1. Сир

Одним із найдавніших процесів, які засновані на ферментації є **сироваріння**. Під час виробництва сиру зберігається саме поживна цінність молока. Згадується сир ще у книгах письменників Давнього Риму та Греції. Відомо дуже багато видів сиру – від досить м'яких до твердих. Різницею між ними є те, що всі натуральні м'які сири складаються з великої кількості води близько 50-60%, а тверді – лише 13-34%. Властивості всіх сирів досить різноманітні, та в процесі їх вироблення є багато однакового. Першою стадією є підготовка культури молочнокислих бактерій, а також засів нею молока. На наступному етапі молоко звертається, для чого в більшості випадків використовують фермент ренін. Далі відділяють рідку рідину (сироватку) та одержану сирну масу піддають термообробці, а також пресують у формах. Після цього згусток солять, а далі ставлять на дозрівання.

Інокуляція

У давнину сировари покладалися лише на бактерії, які є в натуральному молоці. Проте присутність у ньому і потрібних, і небажаних мікробів спричиняло те, що різні партії сиру могли відрізнятися один від одного.

На сьогодні у сироварінні використовують молоко з мінімальною кількістю бактерій, а також застосовують закваски з різними мікроорганізмами у пропорції, яка забезпечує відмінну якість. Набір бактерій визначається саме температурою термообробки (табл. 6.3).

Наявні п'ять причин, за якими утворення молочної кислоти особливо важливе при сироварінні:

- 1) молочна кислота сприяє утворенню згустку під час додавання реніна;
- 2) вона зменшує обсяг згустку, внаслідок чого полегшується відділення сироватки;
- 3) вона перешкоджає розвитку небажаних мікроорганізмів під час виробництва, а також при дозріванні сиру;
- 4) молочна кислота впливає на еластичність згустку, а також сприяє злипанню та затвердінню сирної маси;
- 5) вона позначається на вираженості й характері ферментативних перетворень під час дозрівання, а також бере участь у формуванні смаку сиру.

Таблиця 6.3

Закваски, які використовуються за різних температур обробки згустку в процесі виробництві сиру

Закваска	Температура формування згустку, °C
<i>S. lactis</i> або <i>S. cremoris</i>	>38
<i>S. thermophilus</i> + <i>S. lactis</i>	42–46
<i>S. thermophilus</i> + <i>L. bulgaricus</i> або <i>L. helveticus</i> або <i>L. lactis</i>	49–54

Під час виробництва деяких сортів сиру швидкість утворення кислоти напряму залежить від використання

відповідних заквасок. Новинкою у даній сфері є концентровані, дуже заморожені або ж ліофільно висушені закваски, які додаються сироварами саме у молоко. В процесі одержання сухих заквасок основною проблемою є не пошкодити клітини. Склад різних заквасок постійно змінюється. Так, у 60-х роках застосовували закваски на основі молока, а також фосфатного буфера, а пізніше – вже на основі сироватки. Далі почали використовувати дуже забуферені середовища, що дозволяло запобігати падінню рН нижче за 5,2. Також можна застосовувати великі об'єми заквасок із контрольованими властивостями, що сприяє підтримці рН на рівні 6,2.

Згущення

Після додавання закваски для утворення згустку та сироватки традиційно вносять сичуг. Його завдання – перетворити рідке молоко в гель, тобто згусток. Якщо не застосовується екстракт сичуга, то одержують сирну масу параказеїната кальцію. Відмінність цих двох способів зтворожування молока полягає в тому, що без сичуга цей процес може займає до 16 год, а з ним – всього лише 15-30 хв. Проміжок часу від моменту додавання закваски до самого внесення сичуга, називають часом дозрівання молока (приблизно до 60 хв в залежності від сорту сиру). За цей час бактерії встигають виробляти достатню кількість кислоти, щоб активувати вже ренін.

Сичуг, який використовують у сироварінні, це певна частина шлунка теляти. За останні два десятиріччя, через нестачу даної сировини, проводилися пошуки її замінників. Функції реніна можуть виконувати більшу кількість протеїназ, але ренін ще окрім зтворажування молока бере участь також і в протеолізі, який здійснюється у сирі під час дозрівання. Замінник сичуга, крім зтворажування молока, повинен ще забезпечувати і дану реакцію. Велика кількість існуючих замінників реніна володіють більшою, ніж у сичуга,

протеолітичною активністю за рівної здатності до зтворажування. Ось така надмірна активність здебільшого призводить до зменшення виходу сиру та вмісту у ньому жирів.

Крім цього, певні продукти протеолізу можуть спотворювати смак вже готового сиру. Так, наприклад, гіркоту сиру визначають деякими пептидами, які при тривалій витримці утворюються у сирах. Досить швидко дозрівають також цвілеві сири, які менш схильні до псування через те, що під час дозрівання протеоліз заходить досить не далеко. Більшість протеїназ можуть зтворажувати молоко, тому пошук заміників сичуга спочатку вели серед протеїназ рослин, тварин, грибів і бактерій. Дослідження показали, що більшість препаратів-коагулянтів із рослин володіють дуже великою протеолітичною активністю. Найкращими заміниками, як вияснилося, стали замітники одержані з мікробів; їх у достатній кількості доставляють на ринки Америки та Європи.

Сьогодні пропонуються постачальниками два замітника сичуга, які одержують досить проблематично із цвілевих грибів *Mucor miehei*. Дані замітники вважаються найпридатнішими у виробництві більшої кількості сирів, ніж такі ж речовини з *M. pusillus*. У США близько 60% сиру виробляють за допомогою саме коагулянтів із мікробів. В майбутньому ця галузь нерозривно пов'язана із застосуванням методів генетичної інженерії, а саме: ренін будуть синтезувати бактерії.

Термообробка та пресування

Після процесу коагуляції згустки подрібнюються, внаслідок чого відбувається повне відокремлення сироватки. Далі таку суміш деякий час нагрівають. Закінчивши термообробку відділяють сироватку та

створюють відповідні умови для накопичення молочної кислоти, яка в свою чергу, змінює хімічний склад маси. Під час цього процесу, як і при обробках в подальшому, створюється характерна текстура (будова маси) сиру. На наступному етапі проводять посол, пресування та за необхідності ще одну особливу обробку.

Особлива обробка необхідна під час виробництва деяких сортів сиру і полягає у такому:

1) зараженні спорами блакитних цвілевих грибів у процесі виробництва рокфору, а також блакитних сирів;

2) покритті поверхні спорами білих цвілевих грибів у процесі виробництва камамберу та брі;

3) нанесення бактерій, які необхідні під час дозрівання деяких видів сирів (Port Salut, St. Paulin). Такими бактеріями поверхневого дозрівання, наприклад, можуть бути *Brevibacterium linens*.

Дозрівання

За необхідності, наступним етапом є відправлення сирів на дозрівання чи ж витримку. До даної групи сирів відносять швейцарський і чеддер; вершкові сири не піддають витримці. Дозрівання здійснюється у спеціальних приміщеннях із відповідною контрольованою температурою, а триває близько чотирьох років.

В залежності від сорту сиру температура дозрівання може коливатися від 2 до 16°C. Ферменти та мікроорганізми під час даного процесу гідролізують білки, жири, а також інші речовини молодого сиру. Внаслідок їхнього розпаду утворюються речовини, які надають характерний смак сирам. Через те, що цей процес досить тривалий, його скорочення економічно вигідно.

Здебільшого методи прискорення дозрівання базуються на збільшенні швидкості ферментативного перетворення жирів або білків сиру. Сири, які мають різкий

смак типу Danish Blue виготовляти набагато простіше, ніж з досить тонким. Ще складнішим є одержання прискореним способом сиру чеддер. Для досягнення природного поєднання речовин, які забезпечують смак, необхідно дуже ретельно підбирати ферменти, що вносяться до вихідного продукту. Ми вже говорили про утворення пептидів за допомогою бактерій закваски. Такі пептиди можуть надавати сиру гіркоту, що псує його смак.

Внесення протеїназ надасть необхідний результат лише при відповідному рівні активності, інакше постраждає сам смак сиру. Є надія, що дану проблему можна вирішити з допомогою нових мікробних пептидаз. Ефективними виявилися результати одержані з такої протеїнази *Bacillus subtilis*, як нейтраза. Для сирів, які мають середню інтенсивність смаку тривалість дозрівання скоротили із чотирьох місяців до двох, а з повним смаком – із двадцяти місяців до шести. При додаванні ферменту в міру, гіркота не виникне.

Зручна нейтраза ще й тим, що при витримці сиру в 6°C, швидкість дозрівання є такою, як у сирі без добавки, а це при неочікуваному падінні попиту на сир надасть значні переваги. Впливи липаз на дозрівання менше визначені, хоча зазначалося, що вони його прискорюють під час виробництва сиру чеддер. При застосуванні ферментів, які додають до молока, їх частина втрачається разом із сироваткою при відокремленні її від згустку. А це є не вигідним, та ще крім того, присутність ферментів у сироватці досить ускладнює її продаж. Одним із можливих шляхів вирішення даних проблем є використання ферментів, укладених у мікрокапсули.

Можна зменшити тривалість виробництва й дозрівання застосовуючи молоко з гідролізованою лактозою. Сам гідроліз лактози до глюкози та галактози реалізується β -галактозидазою (лактазою). Для його здійснення до

сирого молока додають *S. lactis*, а лактоза гідролізується на 70%.

Пришвидшення виробництва і дозрівання сиру здійснюється, напевно, внаслідок стимулюючої дії глюкози на ріст і утворення кислоти саме бактеріями закваски. Проте, багато вчених вплив молока з гідролізованою лактозою трактують дещо інакше. Одні вважають, що глюкоза хоч стимулює зростання бактерій закваски, але не пришвидшує дозрівання. Сам механізм дії молока з гідролізованою лактозою ще не з'ясований, проте відомим є той факт, що сир, які одержують на даній основі, дозрівають дійсно швидше. Коли механізм стане відомим загалом, його можна буде застосовувати на практиці.

Пришвидшити дозрівання можна за допомогою іще одного методу – через збільшення кількості бактерій у заквасці. У цьому випадку вміст пептидаз і протеїназ буде вищим, що й спричинить пришвидшення дозрівання. Суттєво, що швидкість накопичення кислоти залишиться такою ж як раніше, а у виробництві деяких сирів це є дуже важливо. Зараз для запобігання надлишкового накопичення кислоти генетично встановлені властивості бактерій заквасок замінюють способами сенсibiliзації, теплового шоку й обробкою розчинниками.

Певні мутантні форми бактерій формують більше протеази або ліпази на основі базової кількості кислоти. Застосування заквасок на базі цих мутантів здебільшого призводить до швидшого дозрівання; при цьому початкові етапи процесу не змінюються. Коли вже генетика бактерій закваски отримає відповідний розвиток, можна буде створювати мікроорганізми для конкретних цілей. Перевагою є те, що на відміну від ферментів модифіковані закваски – природний компонент системи. Приклади застосування ферментних добавок для пришвидшення дозрівання сирів наведено у табл. 6.4.

**Приклади застосування ферментних добавок
для пришвидшення дозрівання сирів**

Тип сиру	Ферменти, які додаються		Етап додавання
	<i>тип</i>	<i>джерело</i>	
Cheddar	Кислі та нейтральні протеїнази, ліпази, пептидази, декарбоксилази	Різноманітні комерційні препарати і ферменти тварин	Згусток
Cheddar Parmesan Romano	Ліпаза, протеїназа	Тканини шлунка теляти	Молоко, згусток
Gouda	Протеїназа	<i>Aspergillus oryzae</i>	Те ж
Cheddar Edam	Протеїназа + пептидаза	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Молоко
Rossiiskii	Протеїназа	Панкреатин	<
Mozzarella	Ліпази, естерази (Мікроінкапсульовані)	Секрет з сичуга телят	<
Blue	Ліпаза	<i>Aspergillus</i> spp.	Згусток

Сироватка

Сироватка – вторинний продукт сироваріння. Недавно вона відносилася до відходів промисловості, але останніми роками в даній галузі помітні певні зміни: все поширенішим стає застосування сироватки у виробництві підсолоджувачів за допомогою лактази. Наприклад, в Англії глюкозу і галактозу, які при цьому отримують, використовують у кондитерській промисловості, хлібопеченні, а також для виробництва морозива. Лактазу

одержують із *Aspergillus niger*. Одержання цукрів із сироватки здійснюється і в США (Corning/Kroger), і в Англії (Corning/Dairy Crest).

6.3.2. Йогурт

Йогурт є одним з прадавніх продуктів, які отримують за допомогою ферментації. Молоко після термообробки заквашують через додавання 2-3% закваски йогурту. Основна роль відводиться тут бактеріям *Streptococcus thermophilus* та *Lactobacillus bulgaricus*. Задля одержання необхідної консистенції продукту, а також запаху та смаку, дані організми мають бути в культурі більш-менш у рівних кількостях. На початковому етапі заквашування кислоту утворює здебільшого *S. thermophilus*. Змішані закваски необхідно досить часто оновлювати, через те, що повторні пересівання є несприятливими у співвідношенні видів і штамів бактерій (починає у них домінувати *L. bulgaricus*).

6.3.3. Масло

Найпростіше отримувати з молочних продуктів масло. В залежності від сорту масла, яке виробляють, застосовують вершки з концентрацією від 30-32 до 30-40%. Під час їхнього збивання емульсія масла у воді трансформується в емульсію води у маслі.

У процесі виробництва масла для поліпшення смаку, а також кращого його збереження використовують спеціальні культури бактерій. Покращення смаку було досягнуто за допомогою створення спеціальних штамів бактерій, які були відібрані за здатністю їх синтезувати необхідні речовини, що впливають на смак. Для цього першими були використані штами *Streptococcus lactis* і близькі до них види, а далі – змішані культури, які містять *Streptococcus lactis*, *L. dextranicum* і *Leuconostoc citrovorum*.

Але крім покращення смаку, таким чином можна також усунути певні небажані присмаки. Ефективний метод доопрацювання масла, який базується на додаванні липаз. Його впровадження дасть змогу продавати масло безпосередньо з маслобійні.

6.3.4. Зброджена пахта

Вже зброджений продукт одержують із свіжої пахти, а найчастіше із знятого молока за допомогою додавання закваски, яка застосовується у процесі виробництва масла. Така закваска – суміш молочнокислих стрептококів, таких як *S. lactis* або *S. cremoris*, а також бактерій, які утворюють ароматичні речовини – це *L. citrovorum* і *L. dextranicum*. Обидва види бактерій необхідні для формування відповідного смаку і запаху пахти; при цьому домінують стрептококи. Функцією молочнокислих стрептококів у заквасці є утворення молочної кислоти (саме вона дає кислуватий смак), згортання молока, а також зниження рН до тих значень, при яких бактерії, які утворюють ароматичні речовини, можуть синтезувати найбільшу кількість летючих кислот.

6.3.5. Сметана

Вона готується практично так само, як зброжена пахта. У вершки додають 0,5-1% закваски, яка застосовується у процесі виробництва масла. Потім продукт витримується, до того часу коли концентрація кислоти не досягне 0,6%.

6.3.6. Нові продукти

Відомий той факт, що в деяких людей непереносимість лактози; для них мають випускати молоко, яке оброблене β-галактозидазою – ферментом, що знижує вміст лактози. Для цього необхідно розробити недорогий промисловий

метод виробництва даного молока. β -галактозидазу одержують із дріжджів, бактерій і цвілі.

6.4 Хлібопродукти

Більшість хлібопродуктів у Англії виробляються за технологією Chorleywood Bread Process, проте інші країни застосовують і велику кількість інших технологій хлібопечення. У процесі виробництва хліба і до тепер здебільшого використовують дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. Традиційно їх вирощують у ферментерах періодичної дії на цукровій або тростиновій малясі.

Найпростіший спосіб приготування тіста – змішати при кімнатній температурі воду, дріжджі, борошно та сіль. Під час замісу шари тіста переміщуються, а тому створюються необхідні умови для утворення бульбашок газу та підйому тіста. Вже замішане тісто залишають на деякий час щоб «підійшло», потім ділять на шматки необхідної ваги, а далі формують (перед цим тісто декілька разів розкачують і складають, для того щоб одержати необхідну текстуру) та видержують у вологій атмосфері. Під час витримки на всіх стадіях випічки «зародки» газових бульбашок, що утворилися в процесі замісу і формуванні, наповнюються вуглекислим газом. Він виділяється у процесі анаеробного зброджування мальтози і глюкози борошна. Тісто, яке піднялося випікають. Під час такого термічного процесу сам крохмаль желатинізується, дріжджі гинуть, а тісто місцями зневоднюється. Врешті-решт ми одержуємо продукт, який має певну форму, досить щільний за консистенцією; з легкою комірчастою структурою, а також дуже смачною скоринкою. При анаеробному бродінні крім вуглекислого газу утворюються й різноманітні органічні кислоти, ефіри і спирти. Вони всі мають вплив на формування самого смаку хліба.

У США та Німеччині з житнього борошна випікають хліб з пікантною кислинкою. Технологія випікання хліба при цьому така сама, що з пшеничного борошна, але під час замісу тіста додають до нього попередньо зброжену суміш води і житнього борошна, яка заквашена змішаною культурою лактобацил. Кислота, яка міститься у даній заквасці (опарі) і надає хлібу відповідного смаку.

6.5. Продукти гідролізу крохмалю

Три основні сорти крохмалю (пшеничного, кукурудзяного і картопляного), які надходять на ринок, одержують за традиційною технологією. У промисловому масштабі гідроліз даних сортів крохмалю здійснюється за допомогою різних способів: лише кислотою, кислотою та ферментами, або лише ферментами. На початку нашого століття застосовувалася звичайна обробка кислотами, але сьогодні на зміну їй прийшли набагато досконаліші технологічні процеси. Сама історія розвитку даної галузі може слугувати гарним прикладом відгуку біотехнології на запити виробництва і споживачів.

У 60-х рр. на зміну кислотно-ферментативному і кислотному процесам прийшов ферментативний метод переробки крохмалю, який базується на послідовному використанні α -амілази *B. subtilis*, а також амілоглюкозидози *A. niger* або *A. oryzae*. Його перевагами є збільшення швидкості самого процесу, зменшення рівня забрудненості продуктами реверсії, отримання продукту із досить високим декстрозним еквівалентом (ДЕ). Дана величина ДЕ гідролізату (у шкалі, яка використовується, глюкоза чи декстроза дорівнює 100 од.) показує глибину гідролізу крохмалю, для якого ДЕ дорівнює нулю.

Важливим кроком далі було впровадження у виробництво термостабільних α -амілаз, в основному з *B. amyloliquefaciens* і *B. licheniformis*, які можуть працювати

за температури 100°C, а також дають можливість після обробки аміноглюкозідазою одержувати продукцію з ДЕ, наближеним до 100.

На сьогодні високотемпературне зрідження крохмалю є звичним промисловим процесом, а от наступний етап, оцукрювання, і зараз реалізовується за допомогою «звичайної» глюकोамілази *A. niger* через одноразову обробку. Для цього було запропоновано застосовувати іммобілізовані ферменти, але широкого використання вони так і не знайшли.

Також окрім виробництва глюкози, досить ефективним у даній галузі промисловості стало виробництво сумішей фруктози і глюкози. Продукт відомий під такою назвою як ізоглюкоза або ж кукурудзяний сироп із досить високим вмістом фруктози. Промислове використання цієї технології стало можливим і успішним у США, де сировина, яка містить крохмаль виробляється у надлишку, а свого цукру не вистачає. Ізоглюкоза має здатність замінювати сахарозу майже у всіх видах їжі. У Європі ж виробництво ізоглюкози стримується через конкретні економічні причини.

Сировиною ж для виробництва ізоглюкози слугує деіонізований гідролізат крохмалю, який одержується раніше описаним способом, з ДЕ близько 100. Ізомеризацію здійснюють ферментами із різних організмів. Їх вибір залежить від того, наскільки легко з ними працювати, також чи потребують вони кофакторів, а також чи стабільні вони. Найчастіше джерелом ферменту бувають види *Streptomyces*, *Actinoplanes missouriensis*, *B. coagulans*, а також *Arthrobacter*. Після закінчення ізомеризації та наступної обробки утворюється продукт, який містить близько 90% фруктози, при чому вихідна сировина, що виходить внаслідок встановлення рівноваги у реакції ізомеризації, це суміш глюкози (51%), фруктози (42%) із олігосахаридами (7%).

Застосовуючи різноманітні трансглюкозидази, амілази і ферменти, а також атакуючі розгалужені молекули, можна одержати велику кількість різновидів гідролізату крохмалю, які широко використовуються у промисловості. На рис. 1.1 зіставлено дані про сировину, а також проміжні й кінцеві продукти даного виробництва.

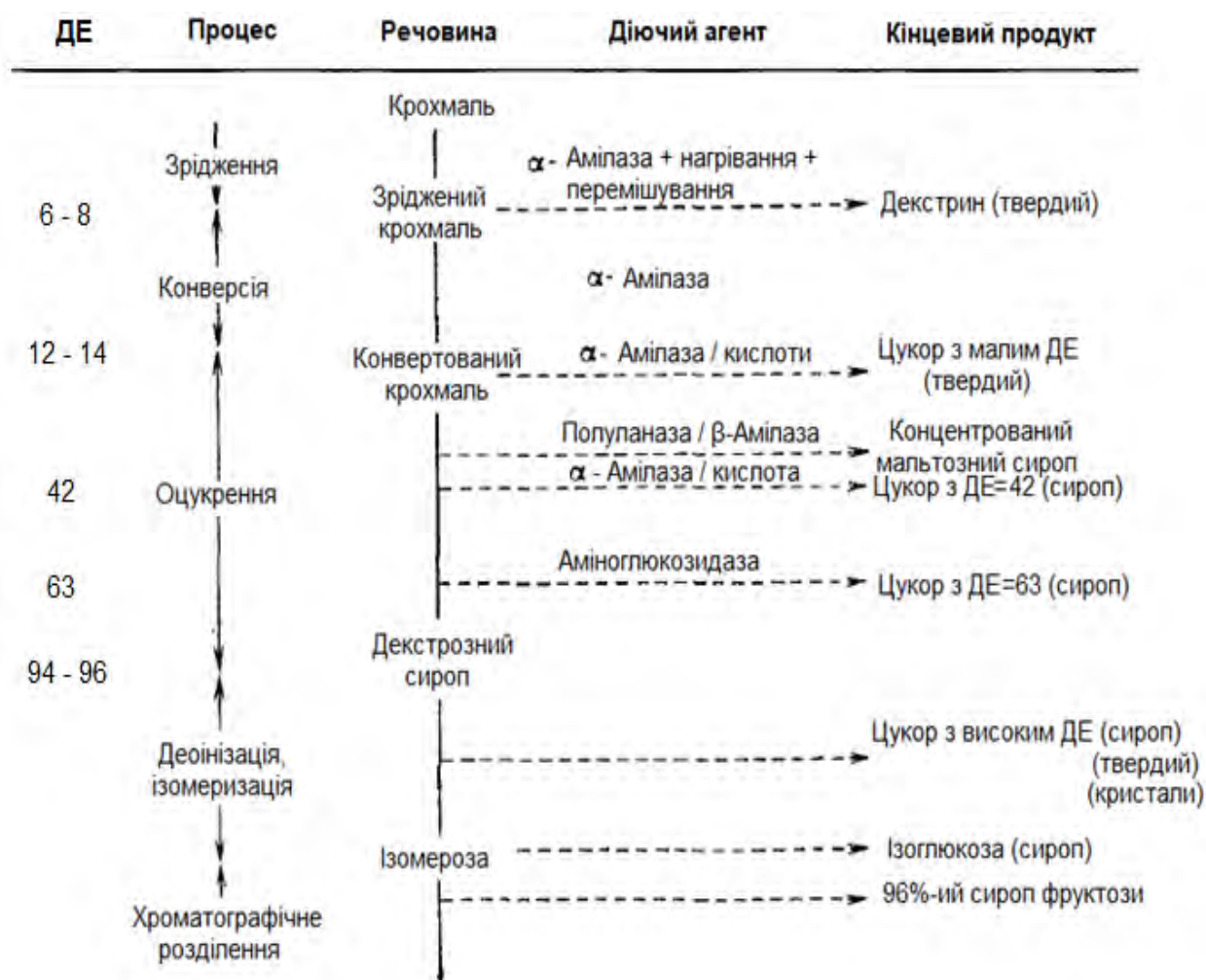


Рис. 6.1. Стадії гідролізу крохмалю

6.6. Бродильні виробництва

6.6.1. Виробництво алкогольних напоїв

Одним з найдавніших бродильних виробництв є одержання напоїв за допомогою спиртового бродіння. Серед перших таких напоїв були пиво та вино. До появи в кінці XIX ст. робіт Пастера про сутність процесів, які відбуваються під час бродіння та їх механізмів було майже

нічого не відомо. Пастер показав, що без доступу повітря бродіння здійснюється за допомогою живих клітин дріжджів, а цукор при цьому перетворюється на вуглекислий газ і спирт. В той же час було показано, що бродіння відбувається під впливом якихось речовин, які містяться всередині дріжджових клітин. Найважливіше нововведення у галузі мікробіології бродіння було винайдено Хансеном, який працював з дріжджами дикого типу в дослідницькому центрі Карлсберг у Копенгагені. У процесі виробництва пива дикі дріжджі доставляли масу незручностей. Вчений Хансен виділив чисті культури дріжджів, а потім застосовував їх у пивоварінні; він став першим у використанні цих культур у процесі виробництві пива.

Алкогольні напої одержують за допомогою зброджування сировини, яка містить цукор, внаслідок чого утворюються вуглекислий газ і спирт. Здійснюється зброджування дріжджами роду *Saccharomyces*. У деяких випадках застосовують природний цукор (наприклад, той, який міститься у винограді, з якого виробляють вино), в інших випадках цукор одержують із крохмалю (наприклад, під час переробки зернових культур в процесі пивоваріння). Обов'язковою для спиртового бродіння є наявність вільних цукрів за участю *Saccharomyces*, через те, що такі види дріжджів не гідролізують полісахариди. Утворення етилового спирту із глюкози здійснюється за схемою Ембдена-Мейергофа-Парнаса (рис. 6.2).

У процесі виробництва спиртних напоїв використовують такі штами дріжджів як *S. carlsbergensis* або *Saccharomyces cerevisiae*. Відмінність між ними лише в тому, що *S. Carlsbergensis* повністю зброджують рафінозу, а *S. cerevisiae* не здатні це робити.

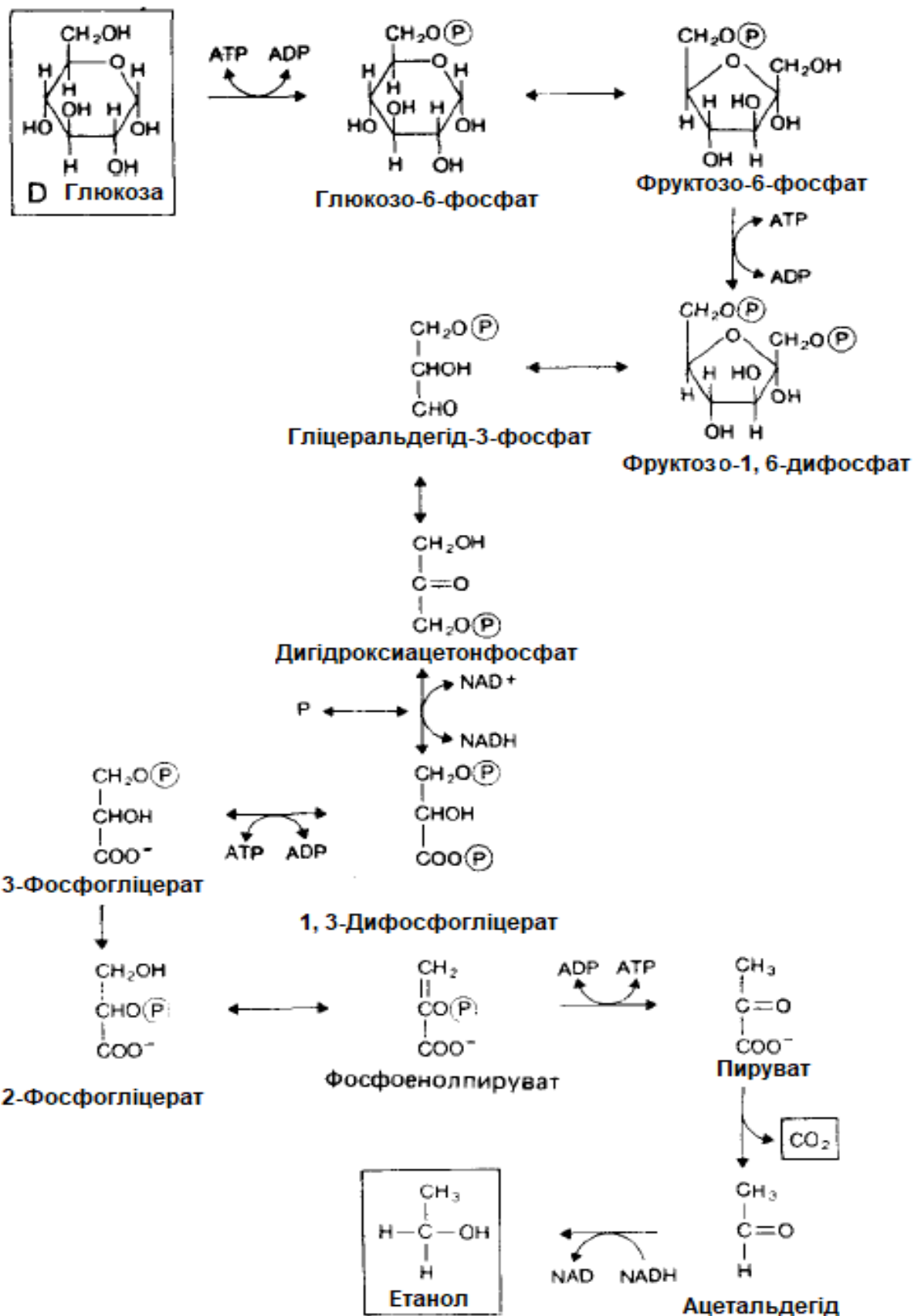


Рис. 6.2. Реакції метаболічного шляху Ембдена-Мейергофа-Парнаса

6.6.2. Пиво

Для реалізації спиртового бродіння, насамперед, потрібно щоб утворився цукор у пивоварній сировині. Звичайним для цього джерелом необхідних полісахаридів постійно був ячмінь, але як додаткові застосовуються й інші види сировини, яка містить вуглеводи. В наші дні ячмінний солод – основа пива. Ячмінний солод, а також інші компоненти подрібнюються і змішуються з водою за температури до 67°C. В процесі мішання природні ферменти ячмінного солоду повністю руйнують вуглеводи зерна. На останній стадії розчин (сусло) відділяють від нерозчинних залишків. Далі додають хміль та кип'ятять його в мідних котлах. Якщо пиво виробляється з певним вмістом алкоголю, то після кип'ятіння сусло доводять до необхідної густоти. Питому щільність сусла визначають вмістом екстрагованих цукрів, які потім підлягають зброджуванню. Після завершення відповідного часу бродіння закінчується, затим дріжджі відділяють від пива та в подальшому витримують його певний час для дозрівання. Після завершення фільтрації та інших процедур пиво є готовим до вживання. Схему виробничого процесу подано на рис. 6.3.

Ініційоване Хансеном застосування у пивоварінні індивідуальних штамів дріжджів сьогодні є вже нормою: ці культури *S. carlsbergensis* і *S. cerevisiae*. Перші – це дріжджі глибинного бродіння, вони використовуються у процесі виробництва легкого пива. Другі – дріжджі поверхневого й глибинного бродіння: використовуються під час виробництва елю.

Хоч генетика дріжджів розвивається вже досить давно, лише нещодавно ми навчилися здійснювати селекцію дріжджів, які застосовуються у процесі виробництва пива. По мірі поглиблення знань щодо властивостей дріжджів і якостей, які вони присвоюють кінцевому продукту, все ефективніше йде робота щодо виведення нових штамів

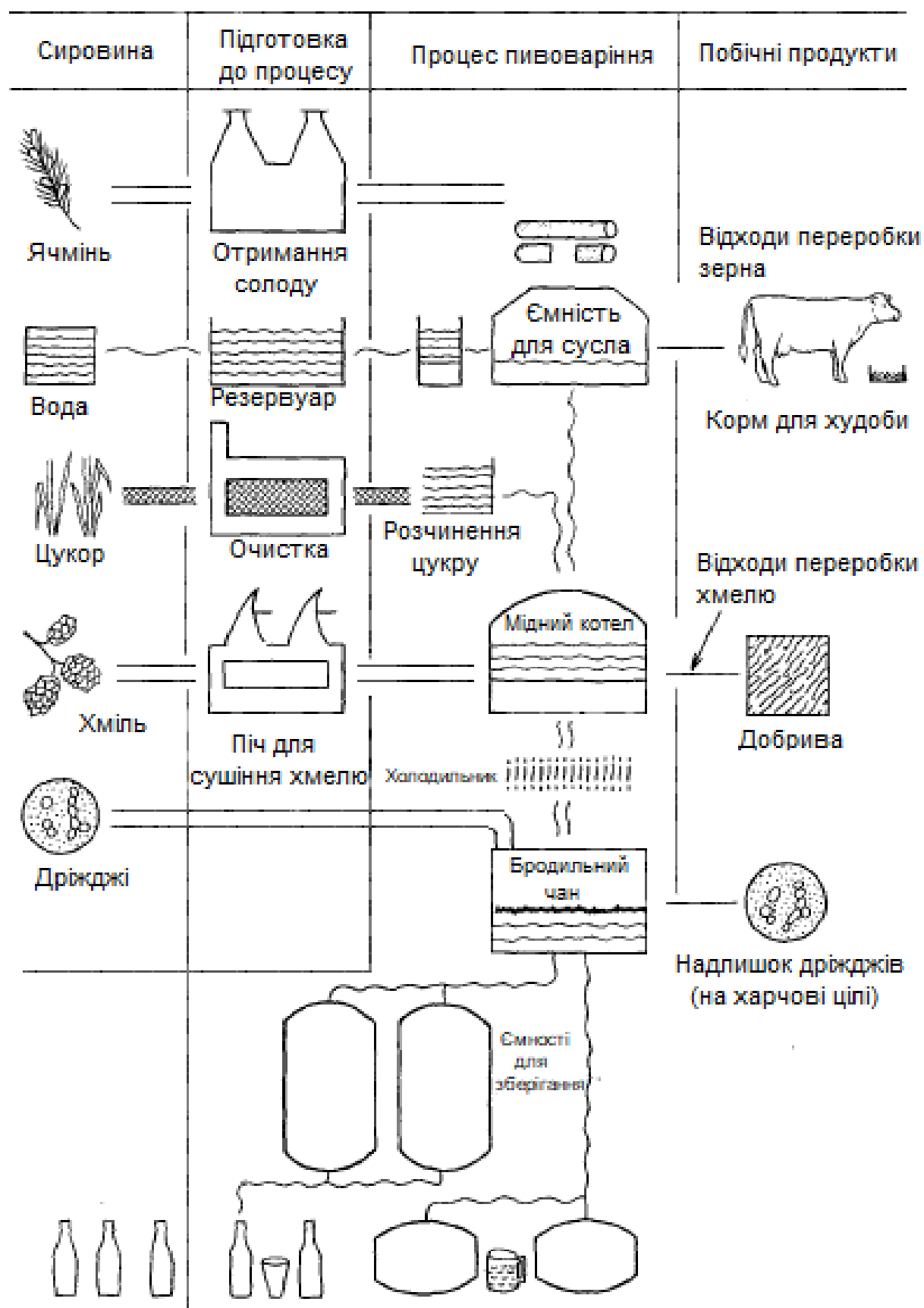


Рис. 6.3. Операції, які лежать в основі пивоваріння

пивних дріжджів. В кінці-кінців ми все ж зможемо створити штам, який даватиме можливість одержувати ідеальний продукт. Вимоги ж до цих ідеальним дріжджів будуть, звичайно, залежати від методу зброджування, а також бажаних якостей пива. До найважливіших властивостей відносять продуктивність, здатність зброджувати мальтотріозу, формувати осад тощо. Також слід брати до уваги смакові якості пива, яке отримуємо, тобто утворення речовин, відповідальних за їхнє формування.

Основним способом одержання штамів, які б давали продукт необхідної якості, раніше, був їхній відбір із вже існуючих пивних дріжджів. Проводити відбір було набагато вигідніше, ніж займатися самою гібридизацією, через малу здатність пивних дріжджів до спороутворення, а також низьку життєздатність аскоспор. У кожному з асків утворюється від 1 до 4 спор, але вони не всі звільняються під час дозрівання. Дріжджі роду *Sacharotnyces* здебільшого розмножуються вегетативно. Водночас за рахунок множинного латерального брунькування утворюються еліпсоїдні, сферичні або циліндричні (рідше ніж перші) дочірні клітини. Через те, що для розвитку технології пивоваріння можуть виявитися необхідними штамми дріжджів, які мають інші властивості від традиційно використовуваних, прийдеться звертатися до гібридизації. Найголовнішим внеском біотехнології у пивоварну промисловість стане створення штамів дріжджів, які здатні робити пиво з бажаними властивостями.

6.6.3. Вино

Наявність цукру в сировині є необхідною умовою будь-якого спиртового бродіння. У процесі виробництва вина застосовується цукор з виноградного соку. Практично всі вина світу виробляються із такого сорту винограду як *Vitis vinifera*. Сік такого винограду є найкращою сировиною для

виробництва вина, адже містить багато поживних речовин та цукру, є джерелом утворення приємних смаку і запаху, а природна кислотність цього винограду пригнічує ріст небажаних мікроорганізмів.

На відміну від пивоваріння виноробство до останнього часу ґрунтувалося на застосуванні диких місцевих дріжджів. Єдиною обробкою, якій до віджиму піддавали виноград було його обкурювання сірчистим газом, задля того щоб сік не темнів. Окрім цього, сірчистий газ має здатність пригнічувати діяльність невинних дріжджів, що у свою чергу, дозволяє винним дріжджів, які до нього не такі чутливі, здійснювати бродіння без перешкод. У процесі виробництва червоного вина шкірка, гребні та кісточки до завершення бродіння перебувають у виноградному суслі, а от біле вино виготовляють лише з чистого соку. Традиційно обкурювання сірчистим газом здійснюють до того, як розчавлюють виноградні ягоди, але в деяких випадках додають його і на пізніших стадіях.

У табл. 6.5 приведені види дріжджів, які найчастіше зустрічаються на шкірці виноградних ягід. Раніше саме такі дикі дріжджі здійснювали спиртове бродіння. В наші дні у районах, де займаються виноробством недавно, широко використовуються дріжджові закваски. Це пов'язано, насамперед з тим, що бажаної мікрофлори може й не бути, а інокуляція стандартною культурою дріжджів дає можливість одержувати вина із необхідними властивостями. А ще обсяги сірчистого газу, який застосовується, обмежено законом, що спонукає також до використання дріжджових культур-заквасок. Самі винороби не дуже покладаються саме на дріжджі дикого типу, якщо немає впевненості в тому, що конкуренція збоку невинних дріжджів не є подавленою. Застосування заквасок має ряд таких переваг: зменшується лаг-період розмноження дріжджів, утворюється продукт із вже відомими властивостями,

зменшується ймовірність появи небажаного смаку, через те що у бродінні не беруть участі невинні дикі дріжджі. Через деякий час застосування спеціально створених штамів буде іще поширюватися, адже це гарантує отримання необхідних смакових якостей вин. Змішані закваски дають змогу одержувати продукцію із повним букетом, на відміну від роботи з індивідуальними штамми.

Таблиця 6.5

**Дріжджі, які існують на винограді,
виноградному суслі та вині**

Роди і види	Джерело
<i>Candida pulcherrima</i> (нова назва – <i>Metschnikowia pulcherrima</i>)	Традиційні для вина і сусла; на винограді
<i>C. scottii</i> (нова назва – <i>Leucosporidiurn scottii</i>)	Чехословаччина; незрілий виноград у Новій Зеландії
<i>Debaryomyces phaffii</i>	Виноград у провінції Коньяк
<i>Endomycopsis lindneri</i>	Виноград та сусло, Бразилія
<i>Hansenula saturnus</i>	Вино, одержане із пізно зібраного винограду
<i>Kloeckera africana</i>	Звичні для винограду, вина та сусла
<i>K. apiculata</i>	Вкрай звичайні
<i>Pichia fermentans</i>	Виноград, сусло та вино
<i>Saccharomyces acidifaciens</i> (нині – різновид <i>S. bailii</i>)	Вина, які зіпсувалися, виноград; є стійкими до сірчистого газу (фруктофіли)
<i>S. bayanus</i> (включно <i>S. oviformis</i>)	Виноград, вино та сусло
<i>S. bisporus</i>	Виноград; утворюють невелику кількість спирту
<i>S. carlsbergensis</i> (нова	Виноград, рідше вина

назва – <i>S. uvarum</i>)	(використовуються під час виробництва легкого пива)
<i>S. cerevisiae</i>	Класичні винні дріжджі; очевидно, найбільш поширені
<i>S. chodatai</i> (нова назва – <i>S. italicus</i>)	Виноград у Грузії
<i>S. coreanus</i>	Виноград; досить рідкісний вид
<i>S. elegans</i> (нова назва – <i>S. Bailii</i> var. <i>Bailii</i>)	Виноград та вино (фруктофіл)
<i>S. elegans</i> var. <i>intermedia</i> (нова назва – <i>S. bailii</i> var. <i>Bailii</i>)	Виноград у Бразилії
<i>S. globosus</i>	Виноград і виноградний сік, вино; зустрічаються дуже рідко
<i>S. heterogenicus</i>	Виноград, виноградний сік, сусло; зустрічаються рідко
<i>S. italicus</i>	Виноград, виноградний сік, який виробляють у місцевостях з теплим кліматом
<i>S. oviformis</i> (нова назва – <i>S. bayanus</i>)	Виноград, вино і сусло; звичайний вид
<i>S. pastorianus</i> (нова назва – <i>S. bayanus</i>)	Виноград, сусло; звичайні для бродіння по типу Loire
<i>S. rosei</i>	Виноград і вино; традиційний вид
<i>S. rouxii</i>	Перезрілий виноград
<i>S. steineri</i> (нова назва – <i>S. italicus</i>)	Виноград і вино
<i>Torulopsis bacillaris</i> (нова назва – <i>Torulopsis stellata</i>)	Виноград, вино (фруктофіл)
<i>Torulopsis burgeffiana</i> (нова назва – <i>Metschnikowia pulcherrima</i>)	Виноград, сусло

Смакові відмінності між сортами винограду визначаються відповідними речовинами. Наприклад, за формування смаку мускатних сортів відповідають похідні ліналол, терпенів і гераніол. Різноманітні смакові присмати з'являються вже при витримці вина; відомо, що свій вклад також вносить взаємодія повітря з деревиною при зберіганні вина у дерев'яних бочках.

В закінченні спиртового бродіння молоде вино зберігається у спеціальних умовах, щоб не зіпсувалося. Якщо вино не буде піддаватися яблучно-молочнокислому доброжуванню, воно обробляється сірчистим газом, який пригнічує окислювальні процеси, що можуть викликати його потемніння. Тому перед цим з вина видаляють дріжджі, для припинення процесу бродіння.

Вина першого сорту піддають різного роду витримці залежно від типу вина, а дешеві, здебільшого, розливають у того ж року, у який вони вироблені. Проблеми під час вироблення дешевих вин здебільшого пов'язані зі схильністю їх до повторного, яблучно-молочнокислого бродіння, яке відбувається ще до часу розливу. При схильності вина до цього бродіння, вино штучно викликається до розливу, а якщо її немає, то воно пригнічується. У процесі виробництва червоних вин першого сорту дане бродіння є навіть бажаним, адже воно складає природну частину процесу і здійснюється під час зберігання. Даний вид бродіння відбувається за допомогою молочнокислих бактерій, таких як *Lactobacillus*, *Leuconostoc* і *Pediococcus*. Воно не відбувається за низьких значень рН, тому створивши такі умови, можна його придушити. Яблучно-молочнокисле бродіння у білих винах відбувається рідко, через те, що рН у них досить низьке. В даній галузі серед нововведень можна пригадати застосування ініціації бродіння замість самих бактерій іммобілізованих ферментів.

Певні сорти вин, такі як сотерни, одержують з додаванням гриба *Botrytis cinerea*. Розвиток цього гриба на ягодах може призвести до їхнього зневоднення та збільшення вмісту цукру, а це й визначає солодкуватий смак вина. Зараження повинно здійснюватися лише перед збиранням винограду. Викликає цікавість також процес, який називається *вуглекислотою мацерацією*. Одержують особливим методом і червоні вина, які мають дозрівати до 15 листопада у рік збирання винограду. Виноград не далять, а цілком поміщають у бродильні чани, де витримують у атмосфері вуглекислого газу. Процес бродіння відбувається напряду в ягодах, в анаеробних умовах, або ж у соку, який витікає внаслідок руйнації шкірки вуглекислим газом. Сама мікробіологія такого процесу поки ще не досліджена.

Що ж до кріплених вин, то тут одна частина спирту виходить під час зброджування винограду дріжджами, а ще одна додається. До таких вин відносяться херес, портвейн, та мадера.

У майбутньому успішність виноробства буде визначатися застосуванням ефективніших штамів винних дріжджів, а також комерційних препаратів дріжджових заквасок. Саме це дасть змогу одержувати вина високої якості.

6.6.4. Спирт

Виробництво перегнаного спирту є молодшим, за непереганані спиртні напої, але і його коріння загублене у віках. Щоб отримати напій, який містить 40% спирту, необхідною є перегонка. Сьогодні, як і раніше, вона здійснюється у перегінних апаратах, які є модифікаціями пристрою, запропонованого ще у 1830 р. Коффі, що також носить його ім'я. Різниця у сортах спиртових продуктів може залежати здебільшого від природи сировини та від того, чи

піддавався витримці кінцевий продукт. У процесі спиртового виробництві застосовуються придатні для цього штами *Saccharomyces*. Потужні спиртові заводи постійно ведуть власну культуру дріжджів у відповідних спеціальних середовищах. Під час виробництва спирту вибір штаму дріжджів визначається їхньою продуктивністю у спеціальних умовах бродячого сусла. Процес бродіння має проходити активно з утворенням спирту в обсязі, наближеному до теоретичної межі. Хоча сировиною для виробництва можуть бути різні продукти, певні сорти спирту традиційно виробляються лише з певних його типів. Наприклад, коньяк, який одержують при перегонці вина, виробляють з винограду, а от шотландський віскі – із ячмінного солоду. Такі напої як американський віскі, горілка і джин, які традиційно виробляються із зерна (наприклад, пшениці), також можна виробляти на основі схожої сировини. Ром здебільшого одержують із меляси буряку або цукрової тростини. Якщо сировина – зерно (наприклад, кукурудзи), до процесу зброджування гідролізується крохмаль до цукрів. Наприклад, віскі є продуктом перегонки пива без хмелю. Його перші стадії виробництва такі ж, як і в приготуванні сусла у пивоварінні. Проте у випадку використання кукурудзи чи інших зернових, до приготування сусла вже в бродильних чанах здійснюється обробка крохмалю у зерні ферментами солоду.

При використанні у виробництві спирту меляси, дані попередні операції не потрібні, адже в ній містяться вуглеводи у формі, яка придатна для зброджування. Але сировину все ж готують до процесу: освітлюють, підігрівають та розводять водою, задля одержання концентрації цукру, оптимальної для бродіння. Після завершення підготовки сировини вносять культуру відповідних дріжджів та здійснюють зброджування. Наприкінці процесу зброджування, коли концентрація

спирту досягне 9-11%, відділяють дріжджі за допомогою відстоювання. Їх залишки перед перегонкою видаляються центрифугуванням. Використовують два методи: кубовий, а також безперервної перегонки (патент Коффі). Далі продукт або відсилають на дозрівання (як наприклад, віскі), або ж здійснюють завершальні операції, а потім розливають у пляшки (горілка, джин). Для продажу традиційно спиртові продукти розводять до стандартної концентрації спирту в них (40% за обсягом).

Розглянемо детальніше важливі особливості впровадження деяких різновидів спиртовмісних продуктів. Важливим аспектом є використання правильного штаму дріжджів. У виробництві сортів рому із сильним запахом традиційно використовуються штами дріжджів *Schizosaccharomyces*, а із менш вираженим – швидкодіючі *Saccharomyces*. Слід зазначити, що процес утворення спирту прискорюється за допомогою бактерій *Clostridium saccharobutyricum*. Одержання найкращого рому можливе лише тоді, коли пропорція бактерій до дріжджів складає 1:5. Культура бактерій вноситься тоді, коли концентрація етанолу становить 3,5-4,5%, а цукру – близько 6% (вага / об'єм).

Штами дріжджів, які застосовуються у спиртовій промисловості, мають зберігати життєздатність до самої концентрації етанолу 12-15% (за обсягом). Також, якщо за сировину використовують зерно, то дріжджі повинні бути такі, які здатні гідролізувати низькі олігосахариди до глюкози. Така необхідність виникає задля повної трансформації крохмалю у етиловий спирт та вуглекислий газ.

Досить вартісним етапом процесу є перегонка, через те що він енергоємний. Застосування дріжджів, які мають здатність витримувати підвищені концентрації спирту, значно зменшує енерговитрати на даному етапі, адже для

досягнення однієї і тієї ж концентрації спирту необхідно відганяти меншу кількість води. Є сподівання, що створення нових штамів дріжджів, які будуть стійкі до ще вищих концентрацій спирту, буде успішним.

Поки ще вуглеводи не перекладено в форму, яка засвоювана дріжджами, саме бродіння не здійснюється. Додавання ферментів, які можуть гідролізувати крохмаль, значно прискорює даний процес. Для цього традиційно використовують амілазу з культуральної рідини штамів *Bacillus subtilis*, а також амілоглюкозидазу, яка береться із культур грибів штамів *Aspergillus niger* та подібних форм. Такі ферменти застосовуються як під час підготовки сусла, так і при спиртовому бродінні (див. розд. 1.3.2, у якому дані питання розглядаються детальніше).

6.6.5. Сидр

Зброджений яблучний сік нам більш відомий за назвою сидр. У технологіях виробництва сидру і вина є досить багато подібного.

При виробництві сидру, яблука подрібнюють у кашку, а потім віджимають сік. Для цього процесу використовують преси й інші пристрої, які працюють на інших принципах. Методи підготовки соку перед самим бродінням різноманітні; його можна використовувати і без попередньої обробки, і після придушення природної мікрофлори в ньому, та її заміни дріжджами відповідних штамів. Традиційно до соку додають сірчистий газ, що дозволяє пригнічувати розвиток *Kloeckera apictilata*, які мають несприятливий вплив на смак вже готового сидру. Далі можна вже починати процес бродіння. Він здійснюється за участю диких дріжджів, або після додавання дріжджової культури-закваски. Необхідними вимогами при виробництві сидру, які висуваються до дріжджів, в принципі є тими ж, що і для інших бродильних процесів: вони мають забезпечити повне

зброджування, його високу швидкість, а також легко випадати в осад. Через те, що *Saccharomyces* ростуть досить повільно, під час великомасштабного виробництва сидру часто додають до соку, обробленого сірчистим газом, будь-які чисті культури дріжджів. Різні штами дріжджів можуть утворювати специфічні ароматичні речовини. Саме тому в процесі виробництва сидру так як і у пивоварінні, використовують різні штами, щоб придати сидру специфічний смак. Для одержання сидру певного сорту, дріжджі, які додають, мають мати перевагу над дикими, а саме – швидше розмножуватися, а також визначати фінальні властивості продукту. Запуск процесу за допомогою домінуючої форми дріжджів є одним з найбільш застосовуваних способів, які використовуються в процесі великомасштабного виробництва сидру. Суттєво, щоб дріжджі мали здатність утворювати полігалактуронідазу, яка є дуже необхідною для гідролізу деетерифікованих пектинів до галактуронової кислоти. Бо в іншому випадку після бродіння сидр не освітлюється. Для його просвітлення досить часто додають ферменти, які гідролізують пектин (одержують з грибів), в тому числі полігалактуронідазу.

Щоб призупинити розвиток всіх штамів дріжджів під час виробництва сидру, окрім тих, які необхідні для ферментації, використовують сірчистий газ дотримуючись тієї схеми, що і при виноробстві. При недотриманні чистоти апаратури та не застосовуванні до неї газу, дикі дріжджі будуть розмножуватися та витісняти культурні. Під час вибору того чи іншого штаму дріжджів слід враховувати і які смакові речовини вони нададуть продукту, який утвориться; адже можна одержати сидр як з малим, так і з насиченим вмістом сивушних масел. Щоб надати сидру необхідних якостей, насамперед, необхідно застосовувати конкретний штам дріжджів.

Після процесу бродіння сидр відділяється від дріжджів та освітлюється. Через те, що сидр містить яблучну кислоту, то, як і у вині, у ньому може розпочатися процес яблучно-молочнокислого бродіння. Це бродіння відбувається, якщо сидр надто кислий або ж його витримують на холоді.

Розвиток виробництва сидру, як і у випадку пивоваріння, буде визначатися виведенням нових штамів дріжджів, які б давали змогу одержувати продукти із властивостями, що відповідали б смакам різних споживачів.

6.6.6. Оцет

Відомо, що оцет не належить до алкогольних напоїв, проте зупинимося більш детально на його виробництві, оскільки однією з двох стадій одержання оцту є спиртове бродіння.

Оцет – продукт, що вміщує не менше 4% (вага/об'єм) оцтової кислоти; отримують його за допомогою двохстадійного процесу. Спершу проводять спиртове бродіння, у процесі якого цукор сировини трансформується у спирт за участю *S. cerevisiae*. У якості сировини може бути будь-який продукт, який зброджується із подальшим утворенням спирту. Після закінчення даного етапу дріжджам дають можливість осісти та збирають надосадову рідину. Вміст самого спирту доводять до 10-13% і, якщо під час бродіння додавався сірчистий газ для вповільнення росту бактерій, то його видаляють. Наступний етап передбачає перетворення етилового спирту в оцтову кислоту (проміжний продукт – ацетальдегід). Всі процеси виробництва оцту відбуваються за участі змішаних культур *Acetobacter*; в окремих випадках використовують закваски. Основна роль на цій стадії належить бактеріям *Acetobacter schuetzenbachii*, *A. orleanense*, *A. curvim*, а також наближеним до них мікроорганізмам. Процес бродіння здійснюється в аеробних умовах зі споживанням достатньої

кількості кисню та виведенням тепла. Колись цей процес проходив досить повільно, але вдалося його вдосконалити, а також збільшити конверсію етилового спирту в оцтову кислоту. Спосіб глибинної ферментації у процесі даного виробництва використовувати не вдавалося протягом тривалого часу. Цю проблему змогли вирішити лише після закінчення другої світової війни, а саме допомогли дослідження з аерації культур в процесі виробництва антибіотиків. В наші дні дана технологія набула широкого застосування.

«Види бродіння. Молочнокисле бродіння».

Мета: ознайомлення із хімізмом молочнокислого бродіння, а також із якісними реакціями на молочну кислоту та морфологією молочнокислих бактерій.

Матеріали та обладнання: свіже й кисле молоко, кислі вершки, ряжанка, кефір, сметана, вершкове масло, розсоли огірків, капусти, 0,1 н розчин NaOH, насичений розчин CuSO_4 , розчин 10-відсоткової сірчаної кислоти, 2-відсотковий розчин спиртового тιοфена, 0,5-процентний аміачний розчин AgNO_3 , 2-процентний розчин KMnO_4 , концентрована H_2SO_4 , спиртовий 5-процентний розчин фенолу, р-н фенолфталеїну, 5-відсотковий розчин FeCl_3 , рідина Никифорова, водний р-н метиленового синього, р-н генціанвіолету, р-н люголя, р-н карболового фуксину, дистильована вода, 96-процентний спирт, піпетки на 10 мл, колби на 50 мл, вата, фільтрувальна папір, предметні скельця, мікроскопи, спиртівки, настільні лампи, промивалки, скляні штативи із кристалізаторами.

ХІД РОБОТИ

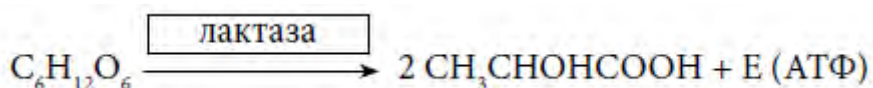
1. Створити якісні реакції на молочну кислоту та записати рівняння цих реакцій.
2. Визначити кислотність молока, розрахувати обсяг молочної кислоти у 100 мл молока, а також збільшення кислотності по ходу скисання молока.
3. Ознайомитися із морфологією молочнокислих бактерій. Приготовити препарати, пофарбувати за допомогою метиленового синього і за Грамом, а також розглянути з імерсією та замалювати.

Бродіння – найдревніший та найлегший спосіб одержання енергії, який притаманний більшості груп прокаріот. Основними типами бродіння є спиртове, молочнокисле, а також маслянокисле. Вони були

відкритими Л. Пастером у 1860-ті роки, хоч відомими людині продукти бродіння були ще дуже за давніх часів.

Хімізм молочнокислого бродіння

Молочнокисле бродіння спричиняється молочнокислими бактеріями, які завдяки ферментам зброджують молочний цукор (лактозу), а також будь-який інший цукор (глюкозу) до молочної кислоти й інших продуктів:



Сам процес протікає із накопиченням енергії у формі АТФ. Молочнокислі бактерії за характером бродіння поділяють на дві групи: гомоферментативні (якщо продуктом розкладання є молочна кислота) та гетероферментативні, які окрім молочної кислоти можуть викликати утворення інших продуктів бродіння таких як оцтова кислота, спирт, CO₂ тощо.

У першу групу відносять: молочнокислий і вершковий стрептококи, болгарську і ацидофільну палички.

Представники гомоферментативного бродіння

Молочнокислий стрептокок (*Streptococcus lactis*). Має форму овальних коків з діаметром 0,5-1 мкм, які попарно розташовуються у культурі. Вони називаються диплококами, а з короткими ланцюжками – стрептококами. Мікроорганізми грам (+), оптимальною температурою розвитку є 30-35°C. Має здатність зброжувати молочний цукор (лактозу) і мальтозу. Молоко згортатиметься протягом 10-12 годин.

Вершковий стрептокок (*Streptococcus cremoris*). Здебільшого зустрічається у молочнокислих продуктах із досить великою жирністю та має форму більш довгих

ланцюжків. Застосовується у виробництві сирів, масла й сметани.

Болгарська паличка (*Lactobacterium bulgaricum*). Нерухома, грам (+), розміщується у формі окремих клітин, а також коротких ланцюжків. Її оптимальною температурою розвитку є 40-45°C.

Ацидофільна паличка (*Lactobacterium acidophilum*). Близька за морфологією до болгарської палички, проте в неї інша оптимальна температура розвитку – 37°C. Застосовується у виготовленні ацидофіліну.

Огіркова паличка (*Lactobacterium cucumeris*). Нерухома, коротка, грам (+) бактерія. Вона розвивається у розсолі засоленої капусти, огірків або в силосі.

У другу групу гетероферментативних бактерій відносять капустяну паличку, ряд лактобацил (*Lactobacillus plantarum*, *L. fermenti*, *L. brevis*), кефірні дріжджі, а також молочну цвіль. Мікроорганізми даної групи здебільшого зустрічаються у силосі та заквашених овочах. Молочнокислі бактерії дуже поширені у природі. Вони є постійно в ґрунті, а також на поверхні рослин, що виступає джерелом постійної появи їх у молочних й інших продуктах. Так, у промисловості застосовують культурні раси бактерій, які мають значну перевагу перед дикими формами.

Представники гетероферментативних бродіння

Капустяна паличка (*Lactobacterium brassicae*). Так як і огіркова зустрічається у квашених овочах, грам (+), скріплена парами і ланцюжками. Оптимум температури розвитку – 25°C. Також у молочнокислих продуктах зустрічаються пропіонові бактерії, які потрапляють у молоко або із ґрунту або з рослин. Вони відіграють важливу роль у дозріванні сичужних сирів.

Кефірні дріжджі (*Saccharomyces kefir*). Переводять молочний цукор у спирт, певна кількість якого виробляється цими ж організмами.

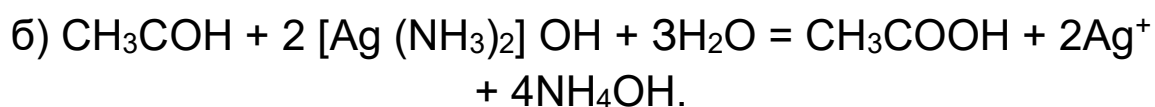
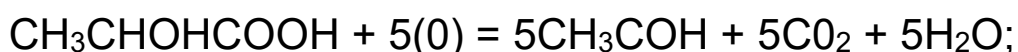
Молочна пліснява (*Oidium lactis*). Її можна побачити зверху на молочнокислих продуктах, вона має міцелій, який розпадається на чотирикутні або ж овальні клітини, що можуть відрізнятися досить великими розмірами. Молочна пліснява окисляє молочну кислоту до CO₂ й води, при цьому погіршуючи якість кислого молока.

Якісні реакції на молочну кислоту

1. *Визначення оцтового альдегіду.* Кисле молоко фільтрується через складчастий фільтр, до 10 мл фільтрату добавляють 1 мл 10-відсоткового розчину сірчаної кислоти, потім нагрівають у конічній колбі до кипіння, далі по краплях добавляють 2-процентний розчин (2 мл) KMnO₄. У даних умовах здійснюється окислення молочної кислоти з KMnO₄ до CH₃COH (оцтовий альдегід):



Далі накривають шийку колби фільтрувальним папером, який перед тим змочують аміачним розчином оксиду срібла (спочатку змочують папір 0,5-процентним розчином AgNO₃, а потім розчином NH₄OH. Сам папір темніє під дією парів оцтового альдегіду:



2. *Реакція Уфельмана* (проба з фенолом). До пробірки у 10 мл 5-відсоткового розчину фенолу добавляють

декілька крапель 5-відсоткового розчину хлорного заліза (FeCl_3).

Внаслідок цього спостерігається утворення інтенсивно забарвленого синього розчину. Додавання 1-2 крапель сироватки кислого молока, яка вміщує молочну кислоту, забарвлює розчин у жовтий колір.

3. *Реакція зі спиртовим розчином тιοфена.* Кисле молоко фільтрується за допомогою складчастого фільтру. У 2 мл фільтрату додають 5 мл концентрованої сірчаної кислоти, а також 10 крапель насиченого розчину мідного купоросу. Далі нагрівають протягом 5 хв на водяній бані при 100°C періодично струшуючи. Після охолодження додають 3-5 крапель 0,2-відсоткового розчину тιοфена у спирту. За присутності молочної кислоти може виникати вишнево-червоне забарвлення.

Визначення кислотності молока

До широкодонної колби об'ємом 150 мл вливають 40 мл свіжого молока, потім закривають ватним корком та розміщують у термостаті при температурі $30-35^\circ\text{C}$ до наступного заняття. В другій порції молока визначають вихідну його кислотність. Для її визначення у конічну колбу на 50 мл вливають 10 мл молока, доливають 20 мл дистильованої води та 2-3 краплі фенолфталеїну. Цю суміш збовтують ретельно та титрують 0,1 н розчином їдкого натру доти, доки не з'явиться рожевувате забарвлення індикатора. Розраховується кислотність у градусах Тернера. *Градус Тернера ($^\circ\text{T}$)* – умовна величина, що дорівнює кількості мілілітрів 0,1 н розчину лугу, який витрачається на нейтралізацію 100 мл молока.

Приклад розрахунку кислотності у градусах Тернера: на титрування 10 мл молока витратили 5 мл 0,1 н розчину лугу; розраховуємо кількість лугу, який було витрачено на титрування 100 мл молока:

5 мл лугу – 10 мл молока;
х мл лугу – 100 мл молока.

Кислотність у градусах Тернера складатиме:

$$X = 5 \cdot 100/10 = 50^{\circ}\text{T}.$$

Кислотність парного молока коливається у межах від 10 до 25°Т. Гранична кислотність молока коливається у межах від 110 до 115°Т.

Приготування препаратів із молочнокислих продуктів

Нанести на предметне скло краплю будь-якого молочного продукту, розбавити його з краплею дистильованої води і зробити тоненький мазок, підсушити на повітрі, а далі зафіксувати разом із знежиренням сумішшю Никифорова (протягом не менше 10 хв.). Фарбування здійснюють біля 3-5 хв. із застосуванням водного розчину метиленового синього, далі промивають водою і висушують, а потім проводять мікроскопію за допомогою імерсійного мікроскопа. Мікрофлора розсолів огірків і капусти препарується традиційним способом, без знежирення сумішшю Никифорова. Саме забарвлення мазка досягається карболовим фуксином або метиленовим синім 3-5 хв.

«Види бродіння. Спиртове бродіння»

Мета: ознайомлення із хімізмом, якісними реакціями спиртового бродіння, а також з морфологією збудників даного виду бродіння.

Матеріали та обладнання: дріжджі пекарські, 10-відсотковий розчин їдкого натру, 10-відсотковий розчин сахарози, йод кристалічний, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ або $\text{Ba}(\text{OH})_2$, колба на 200-250 мл, спиртівки або плитки, пробка з газовідвідної трубкою, концентрована сірчана кислота, штатив, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

За годину до заняття у колбі настояти дріжджі, 50 мл 10-відсоткового розчину сахарози, а також біля 1 г дріжджів.

ХІД РОБОТИ:

1. Ознайомитися із хімізмом та морфологією мікроорганізмів, підготувати препарати, пофарбувати, замалювати.
2. Здійснити якісні реакції й записати рівняння цих реакцій.
3. Виконати вимірювання розмірів клітин дріжджів.
4. Закласти досліди на маслянокисле, а також оцтовокисле бродіння.

Хімізм і представники спиртового бродіння

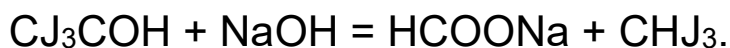
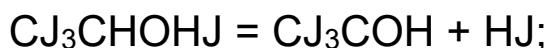
Досить поширеними у природі збудниками спиртового бродіння є дикі дріжджі. До них належать дріжджові гриби роду *Torula* і *Mycoderma*, плісняві гриби роду *Mucor*, а також деякі види бактерій. Культурні дріжджі є виведені за допомогою тривалої селекції із диких дріжджів. До таких належать: *Saccharomyces cerevisiae*, а також *S. vini* та *S. ellipsoides*. Такі види дріжджів від диких відрізняються тим, що вони здатні витримувати у середовищі великі концентрації спирту, при цьому утворюючи меншу кількість побічних продуктів бродіння, і через що інтенсивніше йдуть

самі процеси бродіння. Спиртове бродіння відбувається в анаеробних умовах, в той час як розмноження дріжджів здійснюється при широкому доступі кисню за оптимальних температур 30-35°C. Спирт, який утворився шкідливий для дріжджів, тому при накопиченні бродіння його зупиняється. Проте за високої концентрації цукру у розчині, дріжджі мають здатність залишатися живими у середовищі, які вміщує до 15% спирту. Сумарно цей процес бродіння виражається рівнянням:

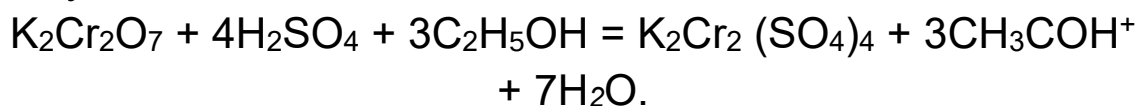


Якісні реакції на бродіння

1. Реакція із кристалічним йодом. У пробірку з 10 мл рідини, яка бродить додати 1-2 мл концентрованого розчину 10-відсоткової лугу, а потім підігріти на спиртівці, не доводячи його до кипіння (60°C). Далі додають декілька кристаликів йоду й знову нагрівають. За наявності спирту випадає жовтий осад йодоформу, якому притаманний характерний запах:



2. Реакція із двохромовокислим калієм. До пробірки із 2-3 мл рідини (яка досліджується) додаємо кристалик двохромовокислого калію, а також декілька крапель концентрованої сірчаної кислоти, далі суміш нагріваємо на спиртівці. Змінюється колір на зелений через відновлення хрому:



Оцтовий альдегід, який виділяється досить відчутний за запахом.

3. Виявлення вуглекислого газу. До колби обсягом 250 мл додають 50 мл 10-відсоткового розчину сахарози, а також біля 1 г пекарських дріжджів, які попередньо розводять у 10 мл 10% сахарози. Закривають колбу пробкою із зігнутою трубкою, нижній кінець якої опускають у пробірку з баритом або ж із вапняною водою. Колбу з рідиною, яка бродить, занурюють у водяну баню на плитці, де удержується температура 35-40°C із періодичним підігріванням. За декілька хвилин після занурення у пробірку з баритом здійснюється надходження бульбашок газу, з часом їх потік стає рівномірним. Інтенсивно мутніти починає баритова вода. Потрібно стежити за виділенням бульбашок, а також помутнінням рідини.

«Види бродіння. Оцтовокисле бродіння».

Мета: ознайомлення із хімізмом процесу бродіння, а також морфологією мікроорганізмів.

Матеріали та обладнання: чайний гриб, кисле пиво, 10-відсотковий розчин хлорного заліза (FeCl_3), 10-відсотковий розчин соди, р-н люголя, р-н йоду, спирт, фуксин, генціанвіолет, предметні скельця, смужки фільтрувального паперу, спиртівки.

ХІД РОБОТИ

1. Розглянути та описати мікроорганізми, а також їх замалювати з живих та фіксованих препаратів. Приготувати живі препарати за допомогою методу роздавленої краплі й висячої краплі з плівки і розчину чайного гриба, а також кислого пива, далі підфарбувати розчинами люголя та йоду. Мазки забарвити за Грамом.

2. Здійснити якісну реакцію на оцтову кислоту.

Процес оцтовокислого бродіння здійснюється за допомогою групи бактерій, які є облігатними аеробами. Ці бактерії окислюють етиловий спирт до оцтової кислоти, а також води в суворо аеробних умовах:



За цього процесу виділяється значний обсяг енергії. Різні продукти, які вміщують алкоголь (вино, спирт, пиво) – це сприятливий субстрат для розвитку оцтовокислих бактерій, які сюди потрапляють із повітря.

Дані бактерії можуть зустрічатися будь-де як у природі, пилу, так і на фруктах та овочах. Оцтовокислі бактерії належать до роду *Acetobacter*. Зверху на розчинах бактерії формують плівки, які у своєму складі містять полісахариди. Типовим видом *Acetobacter aceti* є малорухомі

паличкоподібні еліптичні клітини, які є поодинокими, у парах чи ланцюжках розмірами 0,6-0,8 x 1,0-3,0 мкм.

Беззаперечно це грамнегативні палички, облігатні аероби, які ростуть та розмножуються зверху на поживних середовищах, формуючи тонкі плівки. Досить часто утворюють вони інволюційні форми у вигляді розгалужених, роздутих або ниткоподібних утворень. *Acetobacter aceti* утворює певну гладку слизову плівку, яка жовтіє від розчину йоду. Активно розвивається паличка за температури біля 34°C, витримує 6% концентрацію оцтової кислоти. *Acetobacter xylinum* у культурі утворює зморшкувату, грубу, слизову плівку великої товщини. Клітини йодом фарбуються у синій колір. Живуть бактерії у плівці чайного гриба, разом із дріжджами. Цей симбіоз є взаємовигідним, адже дріжджі зброджують цукор у спирт, а оцтовокислі бактерії, в свою чергу, окисляють спирт у оцтову кислоту.

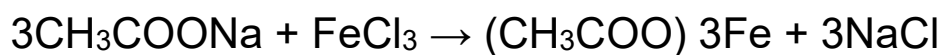
Acetobacter pasteurianum утворює зморшкувату суху плівку, яка підіймається стінками колби, а потів забарвлює йодом у синій колір. Сама форма бактерій є морфологічно наближеною до *Ac. aceti*. Вона розвивається на алкогольних напоях.

Проведення якісної реакції на оцтову кислоту

Заготовка досліду: десь за тиждень-півтора до заняття наливають у конічні колби невеликий шар пива (біля 1 см). Для результату досліду суттєве значення має товщина шару пива, адже для оцтовокислих бактерій мають створюватись аеробні умови. У пива добавляють трішки (0,5 мл) спирту. Самі колби зачиняють ватними тампонами, а потім поміщають до термостату за температури 30-35°C на декілька діб.

Склад у колбах аналізують та описують характер плівок, які утворилися, далі мікроскопують пофарбовані мазки та здійснюють якісну реакцію на CH_3COOH . Щоб це

зробити в пробірку до 5 мл кислого пива додають 2 мл 10-відсоткового розчину соди та невелику кількість хлорного заліза (3) такої ж концентрації. Цю суміш нагрівають. За присутності оцтової кислоти утворюється червоне забарвлення в результаті утворення ацетату заліза:



«Види бродіння. Маслянокисле бродіння»

Мета: ознайомлення із морфологією, хімізмом та якісними реакціями маслянокислого бродіння.

Матеріали та обладнання: 5-відсотковий розчин FeCl₃, концентрована сірчана кислота, 95-відсотковий етиловий спирт, р-н люголя, фуксин, спиртівки, предметні скельця, культура картопляної палички.

ХІД РОБОТИ

1. Ознайомлення із закладанням досліду культури маслянокислих бактерій, а також хімізмом процесу бродіння.
2. Приготовити препарати маслянокислих бактерій способами роздавленої краплі та мазка.

3. Здійснити якісні реакції на масляну кислоту. *Маслянокисле бродіння* являє собою складний процес перетворення вуглеводів на масляну кислоту, а також інші продукти, який спричиняється групою анаеробних спороносних бактерій. Хімізм такого процесу складний і до сьогодні недостатньо вивчений. Схематично цей процес виглядає так:



Розкладанню можуть піддаватися не лише цукри, але і складніші вуглеводи під тиском різних складних активних ферментів маслянокислих бактерій. Масляна кислота у низьких концентраціях, яка утворюється, є стимулятором росту рослин. Саме маслянокисле бродіння спричиняється облігатними анаеробними бактеріями роду *Clostridium*. Приблизно за тиждень-півтора до заняття вже закладають досвід. Беруть промиту неочищену картоплю ріжуть на скибочки, якими наповняють на 1/3 об'єму пробірку, далі добавляють трішки крейди, а також заповнюють водою

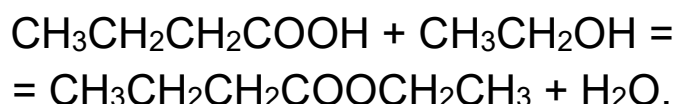
практично доверху. Пробірки за температури 80°C опускають у водяну баню на 10-15 хв., закривають їх пробками, а далі ставлять у термостат із наявною температурою 35°C. За таких умов протягом двох-трьох днів у рідині знаходять бактерії маслянокислого бродіння. При цьому культура маслянокислих бактерій є елективною. Для ефективного їх розвитку створені анаеробні умови, безспорові форми інших видів, які знищені попереднім нагріванням, додавання крейди, що нейтралізує кислоти, які утворилися, а також сприяє розвитку бактерій.

Другим методом одержання культури маслянокислих бактерій: 5 г ячменю (тобто солоду), 5 г цукру, 2 г крейди – все заливають 100 мл води та після закипання проварюють 5 хв. Цю гарячу рідину далі переливають у високу пробірку, на дно якої додають грудочку ґрунту або ж насіння гороху. Тримають пробірку в термостаті за температури 30-35°C протягом 7 днів. Наступне заняття передбачає здійснення мікроскопування рідини, в якій знаходять здебільшого *Clostridium pasteurianum*, рухливі палички із заокругленими кінцями, парні й одиночні. У старих культурах виявляють спору на одній зі сторін клітини.

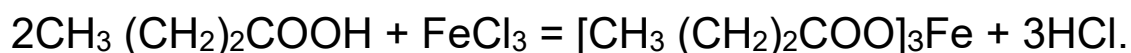
Clostridium pasteurianum – це вільноживучий анаеробний азотфіксатор, який проживає у ґрунті. Клітини даних бактерій містять гранулезу, яка забарвлюється у синій колір за допомогою розчину люголя. Є можливість її побачити при мікроскопуванні живих бактерій у краплині суспензії культуральної рідини із додаванням реактиву за допомогою методу роздавленої краплі із масляною імерсією. Ця краплина суспензії відбирається трубкою із дна пробірки. Із культуральною рідиною якісні реакції проводяться на масляну кислоту.

Якісні реакції

1. В пробірку із 3-4 мл рідини додають 0,5 мл 95-відсоткового спирту, а також 1-2 краплі концентрованої сірчаної кислоти. Суміш гарно збовтують, а далі нагрівають. За наявності масляної кислоти утворюється запах олійно-етилового ефіру, який схожий на запах ананаса:



2. У 5 мл рідини, яка досліджується, додають 2 мл 5-відсоткового FeCl_3 . При нагріванні цієї суміші з'являється маслянокисле залізо коричневого кольору:



РОЗДІЛ 7

ФАРМАЦЕПТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Основні групи лікарських засобів та фармацевтичних субстанцій, одержані біотехнологічними методами:

- антибіотики (пеніциліни, макроліди, тетрациклін, стрептоміцин);
- гормони (інсулін, стероїдні гормони, соматотропін);
- моноклональні антитіла;
- цитокіни (інтерферони);
- вакцини нового покоління;
- пробіотики (лактобактерин, біфідобактерин);
- сироватки (проти отрути змій, комах);
- культури калусних рослин (суспензійна культура клітин женьшеню);
- ферменти (стрептокіназа, амілаза, ліпаза, протеаза) і їх блокатори;
- вітаміни (B2, B12, D3);
- амінокислоти (лізин, триптофан);
- декстрини (плазмозаміняючі розчини);
- спирти (етанол);
- пилкові алергени;
- низькомолекулярні гепарини;
- стовбурові клітини.

Відмінності біотехнологічних процесів від виробництва синтетичних лікарських засобів

У порівнянні з хімічною технологією біотехнологія має ряд наступних переваг:

1. Можливість отримання специфічних і унікальних

природних речовин, частина з яких (наприклад, білки, ДНК) важко отримувати шляхом хімічного синтезу.

2. Проведення біотехнологічних процесів при відносно невисоких температурах і тисках.

3. Мікроорганізми мають значно вищу швидкість росту і накопичення клітинної маси, аніж інші організми. Наприклад, за допомогою мікроорганізмів в ферменторі об'ємом 300 м³ за добу можна виробити 1 т білка (365 т/рік). Для того, щоб виробити таку кількість білка за допомогою великої рогатої худоби, потрібно мати стадо 30 000 голів. Якщо ж використовувати для виробництва білка бобові рослини, наприклад горох, то потрібно буде мати поле гороху площею 5400 га.

4. В якості сировини в процесах біотехнології можна використовувати дешеві відходи сільського господарства і промисловості.

5. Біотехнологічні процеси в порівнянні з хімічними зазвичай більш екологічні, мають менше шкідливих відходів, близькі за протіканням до природних процесів.

6. Зазвичай, технологія і апаратура біотехнологічних виробництв більш проста і дешева.

Насьогодні лідерами біотехнології вважають США і Японію, які накопичили багаторічний досвід біотехнологій для сільського господарства, фармацевтичної, харчової та хімічної промисловостей. Провідне становище у виробництві ферментних препаратів, амінокислот, білка, лікарських засобів займають країни Західної Європи (Німеччина, Франція, Великобританія, Швейцарія), Китай, Індія, а також Росія. Ці країни характеризуються потужним потенціалом техніки і технології, інтенсивними фундаментальними і прикладними дослідженнями в різних областях біотехнології.

7.1. Основні біооб'єкти біотехнології

Біооб'єкт – це продуцент, що синтезує потрібний продукт, або каталізатор, фермент, який каталізує властиву йому реакцію.

У виробництві лікарських засобів використовують наступні біооб'єкти:

- макроорганізми тваринного і рослинного походження;
- гриби, бактерії, віруси, культури клітин еукаріот, біологічні макромолекули з інформаційної (ДНК або рибонуклеїнова кислота (РНК)) або функціональною активністю (ферменти).

Біотехнологічні об'єкти знаходяться на різних щаблях організації:

- а) субклітинні структури (віруси, плазмідни, ДНК мітохондрій і хлоропластів, ядерна ДНК);
- б) бактерії і ціанобактерії;
- в) гриби;
- г) водорості;
- д) найпростіші;
- е) культури клітин рослин і тварин;
- ж) рослини – нижчі (Анабазолла) і вищі (Ряскова).

ДНК, плазмідни і віруси

Основним об'єктом генної інженерії є молекула ДНК - полімерна дволанцюжкова молекула, побудована за принципом комплементарності. Молекула ДНК утворена двома полінуклеотидними ланцюгами, спірально закрученими один біля одного і навколо уявної осі, тобто є подвійною спіраллю.

Молекули ДНК є генетичною інформацією, важливою одиницею якої є гени – елементарні носії, що кодують інформацію про синтез певного продукту. Тому кожен ген характеризується строго визначеною послідовністю

нуклеотидів. Велика частина генів містить інформацію про будову білків. Однак, крім хромосом, бактерії містять велику кількість дуже маленьких кільцевих молекул ДНК - плазмід. Одна з найбільш часто вживаних плазмід для клонування рBR 322, створена на основі плазмід природного походження, виділених з *E. coli*. Ця плазміда містить гени стійкості до двох антибіотиків: ампіциліну і тетрацикліну.

Віруси є головними претендентами на роль векторів для введення чужорідної ДНК. При вірусній інфекції кожна клітина може отримати велике число копій чужорідного гена. ДНК можна вбудовувати так, щоб вона перебувала під контролем сильних вірусних промоторів, що забезпечить високий рівень експресії гена, і його продукти будуть більш доступні для дослідження. У генній інженерії часто використовують 35S-промотор вірусу мозаїки цвітної капусти. Цей промотор не володіє видовою специфічністю і активний не тільки в клітинах хрестоцвітних, але і в клітинах рослин інших сімейств. Вірус повинен бути життєздатним після рекомбінування його ДНК. Найлегше віруси вводяться в бактерії. Недоліком вірусів як векторів є їх невелика ємність. Крім того, віруси заражають невелике коло господарів.

Бактерії і ціанобактерії

Мікроорганізмів, які синтезують продукти або здійснюють реакції, які корисні для людини, кілька сотень видів. Біотехнологічні функції бактерій різноманітні. Бактерії використовуються для виробництва:

- харчових продуктів, наприклад, оцту (*Gluconobacter suboxidans*), молочнокислих напоїв (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*) тощо;
- мікробних інсектицидів (*Bacillus thuringiensis*);
- білка (*Methylomonas*);
- вітамінів (*Clostridium* – рибофлавін);

- розчинників і органічних кислот;
- біогазу та фотоводень.

До молочнокислих бактерій зараховують представників родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc* і *Streptococcus*, які не утворюють спор, грампозитивні і не чутливі до кисню. Гетероферментативні молочнокислі бактерії роду *Leuconostoc* перетворюють вуглеводи в молочну кислоту, етанол і вуглекислий газ. Гомоферментативні молочнокислі бактерії роду *Streptococcus* продукують тільки молочну кислоту, а бродіння, здійснюване представниками роду *Lactobacillus*, дозволяє отримати не тільки молочну кислоту, а й різноманітні продукти.

До бактерій роду *Corynebacterium*, нерухомі грампозитивні клітини яких не утворюють ендоспори, зараховують патогенні (*C. diphtheriae*, *C. tuberculosis*) і непатогенні ґрунтові види, що мають промислове значення. *C. glutamicum* служить джерелом лізину. Корінебактерії, хоча і вважають факультативними анаеробами, краще ростуть аеробно.

Широко використовують таку властивість деяких бактерій, наприклад діазотрофних, як здатність до фіксації атмосферного азоту.

Мікробні клітини можуть використовуватися для трансформації речовин.

Бактерії широко використовують в генно-інженерних маніпуляціях при створенні геномних клонотек, введення генів у рослинні клітини (агробактерії).

Виробничі штами мікроорганізмів повинні відповідати певним вимогам: здатність до зростання на дешевих поживних середовищах, висока швидкість росту цільового продукту, мінімальне утворення побічних продуктів, стабільність продуцента щодо виробничих властивостей, нешкідливість продуцента і цільового продукту для людини і навколишнього середовища. У зв'язку з цим всі

мікроорганізми, які використовують в промисловості, проходять тривалі випробування на нешкідливість для людей, тварин і навколишнього середовища. Важливою властивістю продуцента є стійкість до інфекції і фагостійкість.

7.2. Особливості розробки та реєстрації біотехнологічних лікарських засобів

7.2.1. Оригінальний лікарський засіб, біоаналоги. Еквівалентність і її види

Більшість біотехнологічних лікарських засобів (ЛЗ) – це значно більші за розміром і складніші за складом молекули, аніж синтезовані хімічним шляхом низькомолекулярні препарати; для їх виробництва використовують живі організми, а сам процес виробництва значно впливає на їх головні характеристики і властивості. Біотехнологічні лікарські засоби відрізняються великою різноманітністю: від інноваційних препаратів для лікування хронічних захворювань (рак, цукровий діабет і ревматоїдний артрит) і гострих захворювань (інфаркт міокарда та інсульт). На відміну від біотехнологічних, низькомолекулярні препарати отримують шляхом поетапного хімічного синтезу, при цьому значно меншого розміру і простішої структури молекули дозволяють точно охарактеризувати продукт і спрощують їх відтворення.

Процес реєстрації генериків сьогодні є скороченою процедурою. Досить довести їх біоеквівалентність в порівнянні з оригінальним лікарським засобом. Однак при проходженні реєстрації високомолекулярних біоподібних лікарських засобів виникає ряд ускладнень. Кількість порівнюваних фармакологічних показників у них значно перевищує ідентичні оцінки характеристик генериків, але

набагато менше в порівнянні з оригінальними біотехнологічними ЛЗ.

Виробництво біотехнологічних ЛЗ – це дуже складний і високотехнологічний процес. У той час як відтворення синтезованих хімічним шляхом низькомолекулярних препаратів близьке до абсолютного, синтезовані живими клітинними системами біотехнологічні ЛЗ характеризуються мікрогетерогенно – це означає, що кінцевий продукт слід розуміти, як суміш білкових молекул. Саме походження, а також ступінь гетерогенності сильно залежить від процесу виробництва: незначні зміни в цьому процесі можуть призвести до суттєвих змін складу кінцевого продукту, що неминуче спричинить за собою і клінічні наслідки. Часто вживають пов'язану з біотехнологічними ЛЗ фразу «Процес визначає продукт». Вона відображає значимість процесу виробництва для досягнення ідентичності всіх партій виробленого продукту.

Як тільки ексклюзивне право на виробництво і патентний захист певного оригінального (інноваційного) біотехнологічного ЛЗ закінчується, стає можливою реєстрація і продаж подібних **біологічних аналогічних ЛЗ**, або біосимілярів (біоаналогів), тобто генериків існуючого оригінального біотехнологічного ЛЗ. Але біоаналоги не те ж саме, що і генерики, які складаються з більш простих активних субстанцій, ідентичність референтної молекули яких може бути легко продемонстрована. Через складну природу біопрепаратів реєстрація біоаналогів вимагає створення спеціалізованих регуляторних підходів і специфічних стандартів розробки та експертизи, які відповідали б їх унікальній природі. Ряд регіональних і національних регуляторних органів вже почали приймати законодавства і впроваджувати керівництва, необхідні для регулювання обігу біотехнологічних ЛЗ. Наприклад, у 2005 р. Європейське агентство з лікарських засобів

(European Medicines Agency, далі ЕМА) ввело в дію перші регуляторні вимоги спеціально для реєстрації біосимілярів. Кількома роками пізніше, в 2009 р, Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) розробила Керівництво, яке послужило основою для розробки та експертизи подібних біотерапевтичних препаратів. Ці рекомендації і посібники містять корисну інформацію для розуміння унікальних характеристик біоподобних препаратів і їх значних відмінностей від відтворених низькомолекулярних лікарських засобів (генериків), синтезованих хімічним шляхом.

ЕМА стверджує, що біосиміляр – це біологічний лікарський препарат, який містить версію активної речовини вже зареєстрованого оригінального біологічного лікарського препарату (референтний лікарський препарат).

Біосиміляр демонструє подібність референтного лікарського препарату за параметрами якості, біологічної активності, безпечності та ефективності, що ґрунтується на всебічному порівнянні.

Високий ступінь подібності визначається в специфічному порівнянні, визначеному ВООЗ як «порівняння біотерапевтичного препарату з зареєстрованим оригінальним препаратом за принципом «один до одного», з метою встановити подібність за якістю, безпекою та ефективністю». Метою цього дослідження біоподібності є демонстрація того, що обидва ЛЗ подібні на рівні кінцевого продукту, отже, пацієнт може розраховувати на порівнянну клінічну ефективність двох препаратів.

Еквівалентність лікарських засобів, її види

Фармацевтична еквівалентність – лікарські засоби є фармацевтично еквівалентними, якщо вони містять однакову кількість однієї і тієї ж активної речовини (або речовин) в одній і тій же лікарській формі, відповідають

одним і тим же порівнянним стандартам і застосовуються однаковим способом. Однак, фармацевтична еквівалентність не обов'язково передбачає біологічну або терапевтичну еквівалентність, так як відмінності в наповнювачах і/або в процесі виробництва можуть призводити до відмінностей в ефективності препарату.

Біологічна еквівалентність (біоеквівалентність)

– два лікарських засоби біологічно еквівалентні, якщо вони є фармацевтично еквівалентними або вони фармацевтично альтернативні і їх біологічні доступності (швидкість і ступінь доступності), після прийому в одній і тій самій молярній дозі, схожі до такої міри, що можна припускати, що їх терапевтичні ефекти і показники безпеки будуть однаковими.

Терапевтична еквівалентність – лікарський засіб є терапевтично еквівалентним іншому лікарському засобу, якщо вони фармацевтично еквівалентні йому, і після прийому в одній і тій самій молярній дозі його клінічний вплив з погляду і ефективності, і безпеки буде однаковим засобу, ефективність і безпека якого встановлена, про них свідчать дані відповідних досліджень (біоеквівалентність, фармакодинамічні, клінічні або дослідження *in vitro*).

7.3. Основні етапи розробки біотехнологічних лікарських засобів

Основні етапи розробки біотехнологічного ЛЗ

На першому етапі розробник визначається з напрямком дослідження (економічно вигідніше розробляти лінійку близьких по терапевтичній дії засобів) і складається план досліджень.

На другому етапі в лабораторних умовах отримують продуцент-мутант (гриби, бактерії, віруси, культури клітин еукаріот, біологічні макромолекули з інформаційної ДНК або

РНК), оптимізуються умови, що забезпечують максимальне зростання і отримання цільового продукту.

На третьому етапі розробляють технологію виділення та очищення кінцевого продукту, а також створюють лікарську форма, методики контролю якості (готують нормативну документацію з якості).

На четвертому етапі проводять доклінічні дослідження.

Доклінічні дослідження враховують дві фази і проводяться згідно Належної лабораторної практики (ТКП 125-2008 (02040)) на тварин *in vivo* або в культурі клітин тварин або людини *in vitro*. Перша фаза містить вивчення загальнотоксичної дії (гостра, підгостра та хронічна токсичність) і специфічної токсичності (імунотоксичність і алергенність, вплив на репродуктивну функцію і ембріотоксичність, мутагенність і канцерогенність), а також сили і тривалість фармакологічної дії. Друга фаза сфокусована на дослідженні фармакокінетики і фармакодинаміки, повторному вивченні токсичності (на іншому виді тварин). Також на цьому етапі напрацьовуються дослідно-промислові зразки ЛЗ, які закладаються на зберігання.

На п'ятому етапі проводяться клінічні випробування згідно Належної клінічної практики (ТКП 184-2009 (02040)) на здорових і хворих добровольцях.

Клінічні випробування містять чотири фази.

Фаза 1 проводиться на здорових добровольцях (до 20 осіб). Вивчають фармакокінетику на людях. Встановлюють вищі добові і вищі разові дози (для ЛЗ списку А), побічні ефекти. Додаткові дослідження можуть бути проведені на тваринах з моделюванням процесів захворювань. Проводять патентування лікарського засобу.

Фаза 2 проводиться на обмеженій групі хворих добровольців (до 100 осіб). Перевіряють ефективність і

підбирають оптимальні терапевтичні дози. Відчувають короткострокову безпеку для людей. Випробування проводять на базі 1-2 клінік.

Фаза 3 передбачає дослідження на розширеній групі хворих добровольців (від 100 до кількох тисяч чоловік). Випробування з ефективності і безпеки проводяться в декількох клініках різними лікарями в умовах, наближених до клінічної практики (різна стать, вік, супутні захворювання тощо). Порівнюють з відомою терапією. Встановлюють можливі лікарські взаємодії, проводять збір даних з побічних реакцій.

7.4. Апаратура для біотехнологічного виробництва.

Біореактори

7.4.1. Технологічний регламент виробництва лікарських засобів

Технологічний регламент охоплює всі аспекти технологічного процесу, вимоги до якості сировини, внутрішньовиробничий контроль, контроль якості, безпеки праці, екологічної безпеки, утилізації відходів. Технологічний регламент, основний технологічний документ, є частиною організаційно-розпорядчої та організаційно-технологічної систем документації підприємства, а також системи менеджменту якості, тому при його розробці не порушують відповідність між документами підприємства, дозвільною документацією і реєстраційним досьє, а також враховують вимоги наглядових органів, нормативних і нормативно-правових документів, дія яких поширюється на виробництво лікарських засобів. Технологічний регламент виробництва ЛЗ використовують в якості основного технологічного документа:

- при проведенні технологічних процесів у серійному виробництві;
- розробка вихідних даних для проектування чи реконструкції промислового виробництва;
- встановлення техніко-економічних нормативів, зокрема норм витрат сировини і матеріалів;
- розробці технологічних інструкцій, а також інструкцій з техніки безпеки, виробничої санітарії протипожежним заходам;
- розробка й здійснення заходів з утилізації відходів виробництва, знешкодженню й очистці промислових стоків і викидів в атмосферу.

Залежно від призначення технологічні регламенти поділяють на лабораторні, дослідно-промислові, пускові, промислові.

Серійний випуск товарної продукції здійснюють на основі промислового регламенту, який оформляють після завершення періоду освоєння промислового виробництва нового ЛЗ замість пускового регламенту. Промисловий регламент складається з наступних розділів:

- характеристика продуцента (в цьому розділі проекту дають родова і видова назва культури, а також номер штаму продуцента. При використанні у виробництві селекційованих штамів вказують, за допомогою яких методів селекції він отриманий. Наводять характеристику морфолого-культуральних ознак продуцента: форма і розмір колоній, характер поверхні колоній, колір субстратного і повітряного міцелію. При неоднорідності популяційного складу культури дають характеристику основного типу колоній, що володіє найбільшою активністю. Також необхідно вказати термін зберігання і кількість генерацій, який витримує культура без втрати біологічної активності.);
- характеристика сировини, проміжних продуктів,

вихідних і пакувальних матеріалів (у цьому розділі наводять характеристику сировини і матеріалів, які використовують на проєктованих стадіях технологічного процесу. Всі дані подають у вигляді таблиці з регламенту відповідного виробництва. У примітці зазначають, на якій стадії технологічного процесу використовують цей вид сировини або матеріал);

- характеристика готового продукту (у цьому розділі наводять назву готового продукту проєктованого виробництва відповідно до нормативно-технічних документів (ФСП, АНД, ТУ, ГОСТ, ОСТ), призначення, основних фармакологічних властивостей, відомостей про показники якості, фізико-хімічних і біологічних властивостей і інших інформаційних даних);

- технологічна схема виробництва;
- апаратурна схема виробництва та специфікації обладнання;
- виклад технологічного процесу;
- матеріальний баланс;
- переробка і знешкодження відходів виробництва;
- контроль виробництва;
- безпечна експлуатація виробництва;
- охорона навколишнього середовища;
- перелік виробничих інструкцій;
- техніко-економічні нормативи;
- інформаційні матеріали.

7.5. Блок-схема біотехнологічного виробництва

Загальна схема технологічного процесу повинна наочно відображати послідовність виконання у виробництві по стадіях і операціях із зазначенням основних точок надходження сировини і матеріалів, отримання проміжних

продуктів, точок технологічного контролю, місць утворення відходів, стічних вод, викидів в атмосферу, систем очищення та утилізації. Загальну технологічну схему виробництва представляють у вигляді блок-схеми. Розрізняють технологічні схеми двох видів:

- *технологічна блок-схема виробництва;*
- *технологічні схеми окремих стадій виробництва.*

У технологічній блок-схемі повинні бути відображені функціональний зв'язок і сутність виробничих процесів і їх послідовність, а також вказані види контролю на кожній стадії.

Блок-схема складається із зазначенням місць утворення проміжних і кінцевих продуктів, а також втрат цільового продукту. На схемі відображають місця утворення відходів, стічних вод, викидів. Графічно стадії виробництва зображують в прямокутниках із зазначенням параметрів контролю. Кожна стадія виробництва повинна мати індекс, назву і порядковий номер (Рис. 7.1).

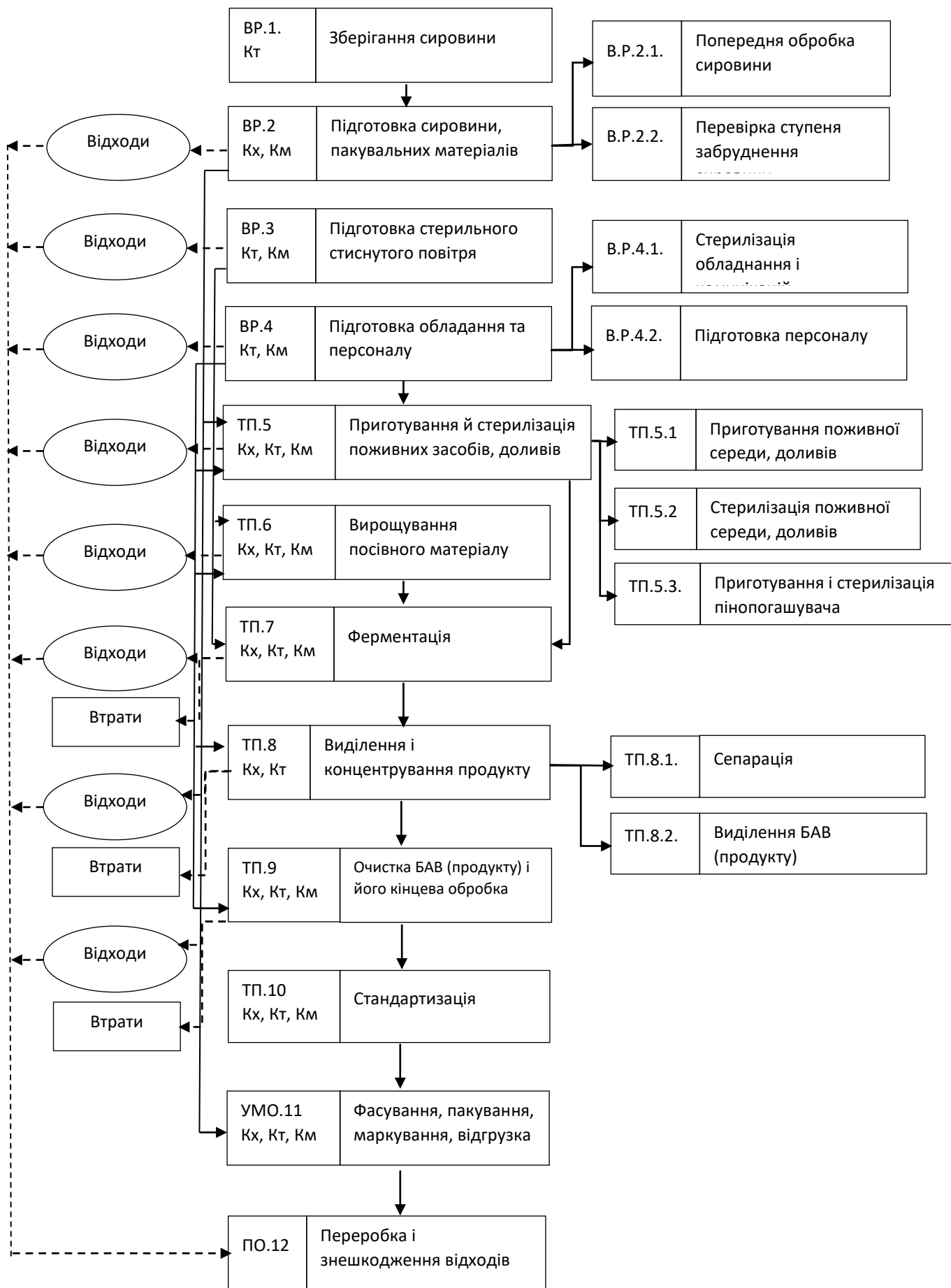


Рис. 7.1. Загальна технологічна схема біотехнологічного виробництва

В технологічній схемі використовують такі умовні позначення стадій (індекси):

«ДР» - стадії допоміжних робіт;

«ТП» - стадії основного технологічного процесу;

«ЗВ» - стадії знешкодження відходів;

«ЗВВ» - стадії знешкодження технологічних і вентиляційних викидів в атмосферу;

«УМВ» - стадії упаковки, маркування, відвантаження готового продукту;

«ПВ» - стадії переробки відходів.

Стадії технологічного процесу мають наскрізну нумерацію незалежно від їх індексу. Стрілки, що з'єднують елементи, демонструють послідовність виконання і взаємозв'язок стадій, а також напрямок руху матеріальних потоків. Послідовність технологічних операцій зазначена на рис. 7.2.

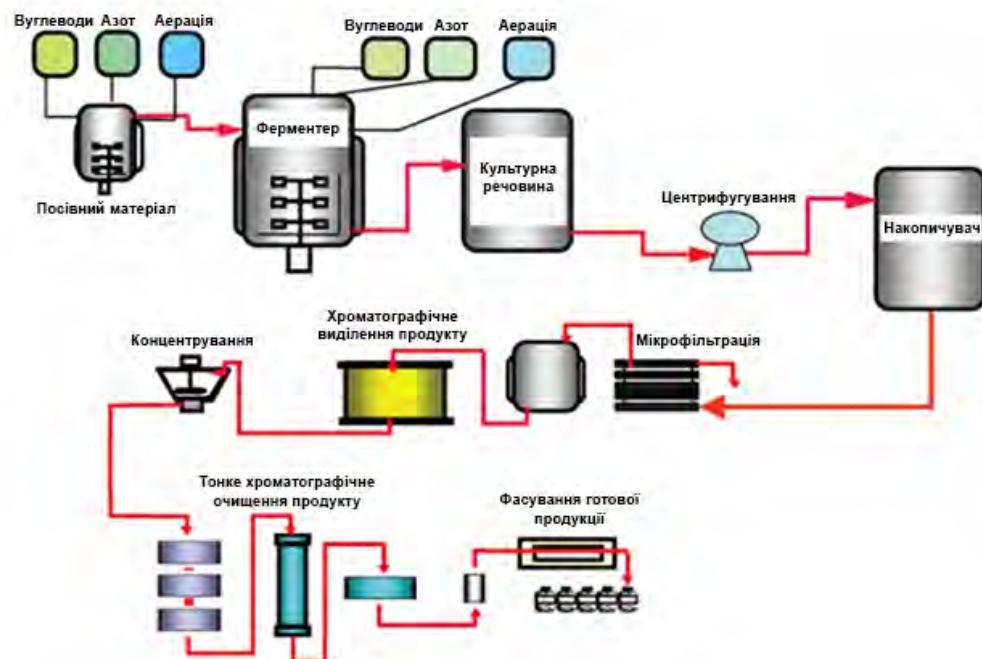


Рис. 7.2. Послідовність технологічних операцій

7.6. Підготовчі операції біотехнологічного виробництва

Підготовка повітря полягає в його стерилізації шляхом пропускання через мембранні фільтри з розміром менше 0,45 мкм (стерилізуюча фільтрація).

Підготовка води проводиться в 4 етапи:

- 1) видалення механічних забруднень на префільтрі (пористе скло, електрокоагуляція);
- 2) очищення від органічних домішок на активованому вугіллі;
- 3) деіонізація з використанням аніонітів та катіонітів;
- 4) стерилізація на мембранних фільтрах з розміром від 0,22 до 0,45 мкм.

Для стерилізації поживних середовищ використовують періодичну (для деяких термолабільних компонентів - вітаміни, гормони) і безперервну термічну стерилізацію під тиском і стерилізуючу фільтрацію.

Перед роботою ферментери миють із застосуванням миючих і дезінфікуючих засобів і стерилізують гострою парою під тиском.

7.7. Біореактори (ферментери). Обв'язування ферментера

Біореактор – це апарат для проведення ферментації і водночас – це техногенна екологічна ніша. Існує також під такою назвою «Обв'язування ферментера», що представляє всі основні робочі вузли цього апарату (рис. 7.3):

- мішалка, для рівномірного розподілу всіх продуктів середовища;
- теплова сорочка для обігріву;
- відбійники, що перешкоджають утворенню «мертвих

зон» – недоступних зон для регулювання ферментаційного процесу;

- зливання культуральної рідини для наступного виділення цільового продукту;
- барботер з повітрям для аерації процесу ферментації;
- клапани для входу і виходу повітря;
- вхідний отвір для завантаження ферментера.

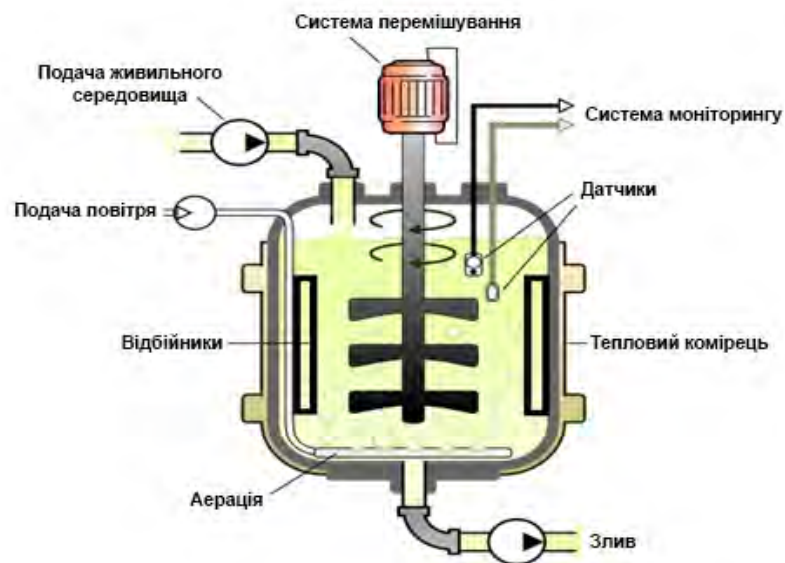


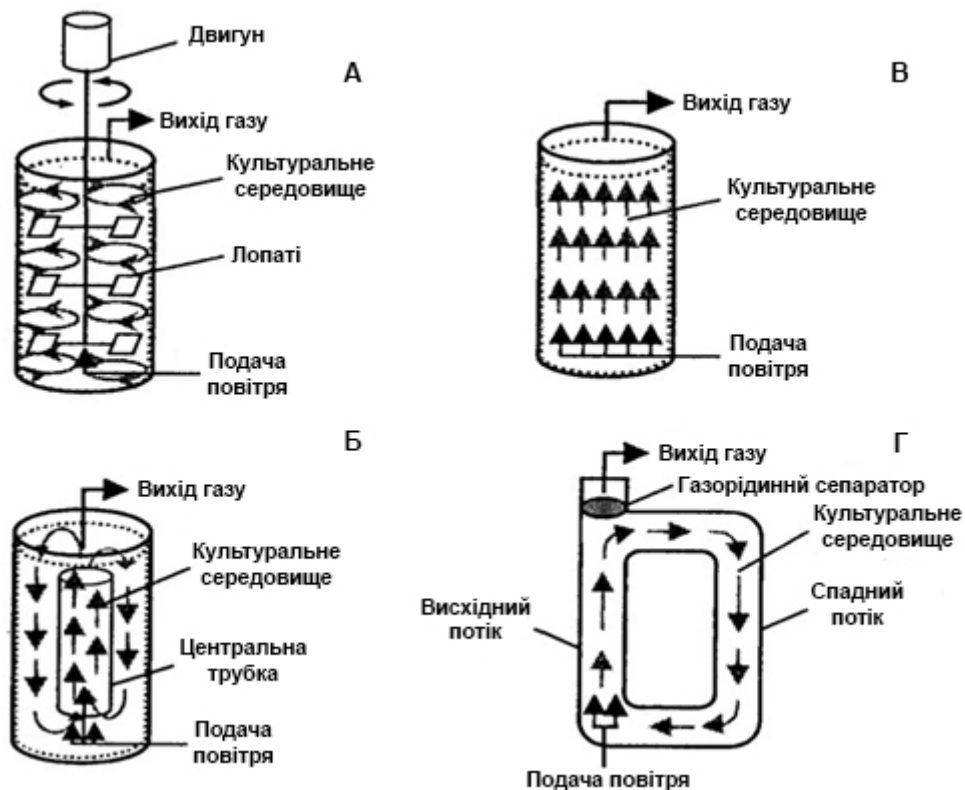
Рис. 7.3. Схема ферментера

Біореактори класифікуються на *твердофазні* (середовище щільне, в'язке або напіврідке) і *рідкофазні* (середовище рідке). Твердофазні реактори поділяються на біореактор типу лотка, біореактор типу обертового барабана, що коливається, біореактор з мішалкою, повітряний біореактор псевдорідинного шару.

Розрізняють:

- біореактори з механічним перемішуванням;
- барботажні колони (для перемішування через біореактор пропускають повітря);
- ерліфтні реактори (перемішування забезпечується внутрішньою або зовнішньою циркуляцією культурального середовища за рахунок потоку повітря).

Водночас між верхніми і нижніми шарами культуральної рідини створюється градієнт щільності). У біореакторах з механічним перемішуванням, повітря подається під тиском через розбризкувач (кільце з безліччю маленьких отворів). Водночас утворюються дрібні бульбашки повітря і завдяки механічному перемішуванню (за допомогою мішалок) забезпечується їх рівномірний розподіл (Рис. 7.4).



А – реактор з механічним перемішуванням; Б – ерліфтний реактор з внутрішньою циркуляцією; В – барботажна колона; Г – ерліфтний реактор із зовнішньою циркуляцією. *Стрілками позначено напрямок руху культурального середовища.*

Рис. 7.4 Схеми реакторів різних типів

У барботажних колонах перемішування відбувається рівномірно по всьому об'єму висхідними потоками повітря, що робить їх більш економічними. Відсутність мішалки запобігає потраплянню всередину мікроорганізмів. Це не викликає сильних гідродинамічних збурень. Недоліки: у міру

підйому дрібні бульбашки збільшуються, що робить їх розподіл нерівномірним; сильне піноутворення.

У ерліфтних біореакторах повітря подають в нижню частину вертикального каналу. Піднімаючись, повітря захоплює за собою рідину до верхньої частини каналу, де розташований газорідинний сепаратор. Деаерована рідина опускається по іншому вертикальному каналу до дна біореактора і процес повторюється.

Існують два типи:

- 1) із внутрішньою циркуляцією – є центральна труба, яка забезпечує циркуляцію рідини;
- 2) із зовнішньою циркуляцією – середовище проходить через окремі незалежні канали.

7.8. Процес ферментації. Способи ферментації

Кожен біотехнологічний продукт, який отримують за своєю технологією, має свої відмінні риси, деталі, свої способи організації виробництва. Однак, у всіх виробництвах, що використовують біологічні об'єкти, є головна, продуктивна стадія – *стадія ферментації*.

Під **ферментацією** розуміють будь-який процес вирощування (культивування) мікроорганізмів в певних умовах, в результаті якого утворюється цільовий продукт.

Ферментація буває аеробна і анаеробна. Розрізняють такі види аеробної ферментації: поверхнева і глибинна.

Технологія вирощування мікроорганізмів поверхневим способом досить проста. Вона полягає в тому, що мікроорганізми культивують на поверхні щільних, сипучих або рідких поживних середовищ. Це періодичний процес.

Вирощування мікроорганізмів глибинним способом відбувається по всьому об'єму рідкого живильного середовища в промислових умовах в апараті, який називається ферментатором (або біореактором), а в

лабораторних умовах – в колбах на спеціальних гойдалках. Вирощування мікроорганізмів глибинним способом може бути періодичним і безперервним.

При періодичному способі глибинного культивування в ферментатор (або ферментер) завантажують відразу весь обсяг стерильного живильного середовища і вносять посівний матеріал. Вирощування мікроорганізмів проводять при оптимальних умовах протягом певного часу, після чого процес зупиняють, зливають вміст ферментатора і виділяють цільовий продукт.

При безперервному способі глибинного культивування стерильне живильне середовище безперервно подається в ферментатор, в якому створюються оптимальні умови для росту мікроорганізмів, а з ферментатора також безперервно витікає культуральна рідина, що містить залишки поживного середовища і клітини мікроорганізмів.

Рідина, яка утворюється в процесі ферментації мікроорганізмів і містить цільовий продукт, називається культуральною рідиною.

Основне завдання стадії ферментації – забезпечити максимально високий синтез цільового продукту, що досягається дотриманням ряду умов.

Для успішного проведення процесу ферментації і досягнення високого рівня накопичення продукту необхідно дотримуватися наступних умов проведення процесу:

- підготувати якісне, стерильне, живильне середовище;
- отримати активний посівний матеріал;
- проводити процес вирощування мікроорганізмів в біореакторах спеціальної конструкції;
- не допускати забруднення культури-продуцента сторонніми мікроорганізмами, іншими словами, забезпечити «стерильність» процесу ферментації;
- підтримувати необхідну температуру;

- дотримуватися оптимального значення рН середовища і культуральної рідини в процесі ферментації;
- забезпечувати культуру достатньою кількістю кисню;
- не допускати інтенсивного спінювання за рахунок використання етанолу і поверхнево-активних речовин в якості піногасників.

Культури штамів зберігають на косому агарі при температурі $+1-5^{\circ}\text{C}$; замороженими при -20°C або ліофілізованими в ампулах. Культури клітин тварин і людини зберігають замороженими в спеціальному середовищі при 180°C .

Перед початком технологічного процесу культуру беруть з банку клітин і розмножують в стерильних умовах протягом 24 годин на щільних або рідких середовищах. Спочатку вирощують вихідну культуру, потім пересівають її в колбу, переносять в ферментер для посівного матеріалу, а потім в промисловий ферментер. При цьому контролюють життєздатність штамів і їх забрудненість іншими мікроорганізмами.

Процес ферментації може бути умовно розділений на чотири фази (Рис.7.5).

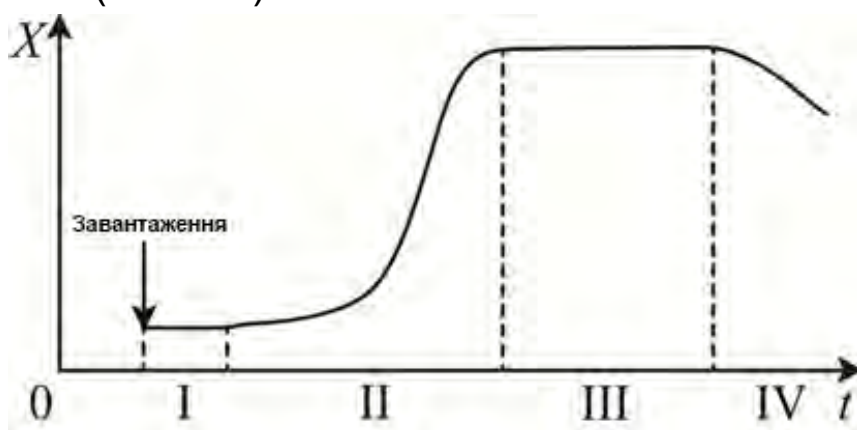


Рис. 7.5. Визначення фаз ферментації по кривій росту біомаси в періодичному процесі I – лаг-фаза; II – лог-фаза; III – стаціонарна фаза; IV – фаза відмирання

На початку ферментації мікроорганізми деякий час ніби пристосовуються до нового середовища. Ця фаза називається лаг-фазою і характеризується низькою швидкістю росту біомаси, низьким споживанням поживних речовин.

Друга фаза – фаза експоненціального зростання, або log-фаза, характеризується інтенсивним зростанням культури і швидким споживанням всіх поживних речовин середовища з переважним використанням їх в конструктивному обміні, тобто як пластичний матеріал. При цьому концентрація вихідних речовин в середовищі різко знижується, деякі речовини (наприклад, мінеральний фосфор) зникають повністю, і в середовищі можуть накопичуватися продукти окисного обміну, зокрема, кислоти. У цей період відбувається активне напрацювання первинних метаболітів.

У третій фазі (стаціонарна фаза) в результаті зміни складу середовища і накопичення біомаси змінюється характер розвитку культури. Зростання культури сповільнюється, потім припиняється. Починається загибель клітин (автоліз). Споживання живильних речовин також сповільнюється. До кінця ферментації вуглеводи, жири і азотисті речовини використовуються майже повністю. Ця фаза характеризується максимальним накопиченням вторинних метаболітів, причому для кожного продукту існують свої специфічні умови, наявність яких в цей період сприяє інтенсивному утворенню продукту, а відсутність - зниженню або навіть повному припиненню біосинтезу.

Коли процеси автолізу починають переважати над зростанням культури, настає фаза відмирання. Знижується концентрація життєздатних клітин, збільшується викид продуктів автолізу.

7.9. Живильні середовища для культивування мікроорганізмів

Отримання будь-якого біотехнологічного продукту пов'язане з вирощуванням (культивуванням) біологічного об'єкта (мікроорганізмів, клітин рослин, тварин) в живильному середовищі.

Компонентний склад живильного середовища забезпечує життєдіяльність, зростання і розвиток біооб'єктів, ефективний синтез цільового продукту. Із живильного середовища жива клітина отримує необхідні речовини для росту (конструктивний метаболізм) і енергії (енергетичний метаболізм).

Для отримання продуктів біотехнології в залежності від біологічного об'єкта і технології виробництва використовують різні поживні середовища.

7.9.1. Класифікація поживних середовищ

За складом компонентів поживні середовища поділяють на три основні групи: на натуральні середовища (що складаються з продуктів тваринного і рослинного походження – м'яса, кісткового борошна, кормових дріжджів, компонентів крові), синтетичні (певні хімічно чисті органічні і неорганічні сполуки, взяті в точно зазначених кількостях), а також комбіновані середовища.

За фізичним станом середовища поділяються на три групи: щільні (додається агар-агар або желатин), рідкі і сипучі.

Живильні середовища повинні містити в легко засвоюваному вигляді всі речовини, необхідні для задоволення харчових і енергетичних потреб. При культивуванні ряду мікроорганізмів в середовище вносять фактори росту – вітаміни, деякі амінокислоти, які клітина не

може синтезувати. Крім цього в поживних середовищах має суворо дотримуватися значення рН і ізотонічність. При культивуванні більшості мікроорганізмів і тварин клітин оптимальна слаболужне середовище (рН 7,2-7,4). При порушенні ізотонічності, виникає осмотичний шок, що приводить до розриву клітинної стінки або втрати життєздатності клітини.

До базових компонентів поживних середовищ зараховують джерела вуглецю, азоту і мінеральних сполук. До найбільш доступних джерел вуглецю належать вуглеводи.

Отримують поживні середовища масооб'ємним способом, при необхідності розраховують кількість сухої речовини, яку потрібно додати до середовища, або готують долив. Після приготування середовище стерилізують, при неможливості – стерилізують окремі компоненти до змішування. У ряді випадків сухі концентрати поживних середовищ розводять в необхідній кількості стерильної води.

Більшість використовуваних поживних засобів є «іменними». Середовище Мурасіге-Скуга (MS0 або ЕмЕс-нуль) – це живильне середовище, використовуване в лабораторіях для вирощування рослинних клітин. Це середовище було запропоновано фізіологами рослин Тошио Мурасіге і Фольке К. Скугом в 1962 році. При проведенні експериментів було встановлено, що за рахунок варіювання кількості мінеральних речовин і органічно пов'язаного азоту можна домогтися істотного прискорення зростання в порівнянні з існуючими складами.

Це середовище і його модифікації – найбільш використовуване в лабораторній практиці для експериментів на культурах рослинних клітин.

Середовище Мюллер-Хінтон (універсальне середовище на основі м'ясо-пептонного бульйону або агару

використовується для культивування більшості мікроорганізмів), середовище Сабуро (культивування грибів), середовище Мозера-Рогоза-Шарпа (MRS) (культивування лактобацил), середовище Ендо (визначення лактазної активності мікроорганізмів). Середовище RPMI (Roswell Park Memorial Institutemedium) і його модифікації використовують для вирощування лімфоїдних клітин людини. Середовище містить значну кількість фосфатів і може використовуватися в CO²-інкубаторах.

7.9.2. Джерела вуглеводів

У біотехнологічній промисловості широко використовують чисті вуглеводи, а також природні і технічні продукти, багаті вуглеводами. До них належать: глюкоза, зелена патока, сахароза, меляса, лактоза, крохмаль, кукурудзяна мука, пшенична мука. Вуглеводи засвоюються клітинами у вигляді моносахаридів, тому для гідролізу олігосахаридів необхідна наявність ферментів-гідролаз.

Глюкоза (виноградний цукор). У фармацевтичній промисловості для приготування поживних середовищ використовується технічна глюкоза. Вона містить не менше 99,5% редукуючих речовин в перерахунку на суху речовину, тобто фактично є майже чистим вуглеводом і є досить стандартною сировиною. Найчастіше використовують у культивуванні клітин тваринного походження.

Зелена патока і гідрол. Є відхідом крохмале-патокового виробництва у вигляді густої сиропообразної непрозорої рідини, коричневого кольору, з характерним запахом. Цей продукт отримують при первинній (зелена патока) або вторинній (гідрол) кристалізації гідратної глюкози з розчинів оцукреного крохмалю. Зелена патока і гідрол містять 58-65% сухої речовини, 50-72% в перерахунку на суху масу редукуючих речовин (переважно

глюкози), 7-20% золи, 6-19% NaCl, pH = 4-4,4. Крім глюкози в них наявні незброджуваний цукор (близько 18% сухої речовини) і органічні кислоти, а також містяться фосфор, магній, залізо в мінімальних кількостях. У зв'язку з тим, що склад зеленої патоки і гідролу непостійний, кожену партію перевіряють в контрольній ферментації на придатність для біосинтезу.

Сахароза (буряковий або тростинний цукор). Є дисахаридом, що складається з глюкози і фруктози. У промисловості використовують технічну сахарозу, яка містить щонайменше 99,75% сахарози.

Лактоза (молочний цукор). Вона міститься тільки в молоці, а в інших природних продуктах її не виявлено. Отримують лактозу з молочної сироватки, яка утворюється при виробництві сирів і казеїну. Є дисахаридом, що складається з глюкози і галактози.

Крохмаль. Один з найбільш поширених запасних полісахаридів рослинного походження. Він інтенсивно накопичується в результаті фотосинтезу і відкладається в насінні, бульбах і інших частинах рослин. Найчастіше крохмаль отримують з картоплі та кукурудзи. Зустрічається також рисовий і пшеничний крохмаль. Крохмаль на 90-95% складається з полісахаридів, водночас, у ньому присутні мінеральні речовини, жирні кислоти і білки (у незначній кількості). Природний крохмаль складається з двох різних фракцій, що відрізняються за своєю будовою і властивостями. Приблизно 20% крохмалю становить амілоза і 80% – амілопектин.

Амілоза - лінійний полімер глюкози. Вона добре розчиняється в теплій воді, утворюючи розчини порівняно невисокої в'язкості. У молекулі амілози залишки глюкози послідовно пов'язані між собою α (1-4)-глікозидними зв'язками. Амілопектин насилу розчиняється в гарячій воді, причому розчин виходить колоїдним. Саме високий вміст

амілопектину в крохмалі надає йому в'язкості і клейкості. Амілопектин теж є полімером глюкози, але в його молекулі глюкозні залишки сполучені не тільки α (1-4)-глікозидними зв'язками, але і мають зв'язку типу α (1-6). У середньому на 25 залишків глюкози доводиться один α (1-6)-глікозидний зв'язок. Таким чином, в молекулі амілопектину глюкозні залишки утворюють розгалужену структуру.

Якщо крохмаль у воді поступово нагрівати, то він все сильніше набрякає і, нарешті, буде досягнута температура, при якій крохмаль утворює в'язкий колоїдний розчин, названий крохмальним клейстером. Водночас відбувається частковий гідроліз крохмалю з утворенням більш простих сахаридів з меншим ступенем полімеризації, так званих декстринів. У такому вигляді крохмаль після клейстеризації легше піддається дії ферментів мікроорганізму-продуцента. Крохмаль буває розчинний і нерозчинний у воді. Розчинний крохмаль при заварюванні не утворює колоїдного розчину, а залишається практично прозорим.

Кукурудзяне борошно. Отримують при розмелюванні зерен кукурудзи. Вона є найдешевшим продуктом з усіх зернових, і її ціна залежить лише від ступеню помелу зерна. У зв'язку з цим розрізняють шпалерне і сортове кукурудзяне борошно. Шпалерне борошно отримують при розмелюванні цілого зерна кукурудзи з оболонкою, сортове борошно містить тільки розмолоту крохмалисту частину зерна (без оболонки). Кукурудзяне борошно містить 67-70% крохмалю, близько 10% інших вуглеводів (клітковина, декстрин, розчинні вуглеводи), близько 12% білка, 4% жиру, не більше 15% вологи і 0,9% золи.

Серед зольних елементів в найбільшій кількості присутні іони калію, магнію, натрію, кальцію, заліза, а також фосфати, сульфати і хлориди. Великий вплив на біосинтез, наприклад, антибіотиків, надає ступінь подрібнення кукурудзяного борошна, його дисперсність. Використання

борошна більш дрібного помелу з виходом під час помелу 85% дозволяє підвищити рівень утворення антибіотиків на 12-24%. У промислових середовищах кукурудзяне борошно часто замінює крохмаль, будучи більш дешевою сировиною.

У промисловості використовують і пшеничне борошно, яке отримують при розмелюванні зерен пшениці. За складом і застосуванням пшеничне борошно аналогічне кукурудзяному борошну.

Меляса. Відхід цукрового виробництва. Це матковий розчин, що утворюється при відділенні кристалів сахарози на центрифугі при кристалізації. За зовнішнім виглядом меляса – густа в'язка рідина темно-коричневого кольору. Склад меляси непостійний, залежить від ґрунтових і кліматичних умов вирощування буряка, технології переробки, умов транспортування і зберігання меляси. Нормальна меляса містить 45-50% сахарози, 1,2-2,2% загального азоту, 6-10% золи. У мелясній золі є багато калію, магнію, кальцію, але порівняно мало фосфору. У мелясі міститься ряд амінокислот, органічних кислот, вітамінів групи В.

7.9.3. Джерела азоту

Джерелами азотного харчування для продуцентів слугують різні речовини неорганічного і органічного (амінокислоти, білки, сечовина) походження. Розрізняють загальний азот (азот всіх хімічних форм), аміноазот (азот вільних амінокислот) і білковий азот (азот амінокислот, що входять до складу білків). Джерелами мінерального (неорганічного) азоту найчастіше є амонієві солі азотної, сірчаної та соляної кислот (амонійний азот) або нітрати (нітратний азот). В якості органічного азоту в промисловості найбільш широко використовують кукурудзяний екстракт і соєве борошно.

Кукурудзяний екстракт. Відхід виробництва крохмалю з кукурудзи. Це густа, непрозора, рідка маса від світло-жовтого до темно-коричневого кольору. При довгому стоянні маса ущільнюється з утворенням осаду. Тому перед вживанням кукурудзяний екстракт ретельно перемішують.

Кукурудзяний екстракт – складно стандартизована сировина. Його хімічний склад залежить від сорту кукурудзи, умов вирощування, переробки, зберігання, умов отримання крохмалю із зерен.

Загальний склад кукурудзяного екстракту:

- загальний азот: 6-8%;
- аміноазот: 1-3%;
- білковий азот: 0,8-2%;
- вуглеводи: 0,1-10%;
- органічні кислоти: 15-20%;
- зола: 20-24%;
- вода: 45-55%.

Кукурудзяний екстракт володіє буферними властивостями, в його складі присутні амінокислоти і органічні кислоти, що надає йому в залежності від вмісту цих речовин основні або кислотні властивості.

З огляду на це при приготуванні поживних середовищ, що містять кукурудзяний екстракт, його спочатку кип'ятять з крейдою (CaCO_3) при 100°C протягом 20-30 хвилин. Відбувається реакція нейтралізації кислот, і кукурудзяний екстракт втрачає властивість буферної ємності. Це дозволяє в подальшому встановити певне значення рН в живильному середовищі.

Соєве борошно. Отримують при розмелюванні соєвих бобів, а також соєвого шроту і макухи, що залишаються після вилучення соєвої олії. Соєве борошно поділяють на незнежирене, напівзнежирене і знежирену.

Незнежирене борошно отримують після розмелювання

соєвих бобів. *Напівзнежирене борошно* отримують після віджиму соєвої олії із зерна. Віджим, який називають макухою, розмелюють і отримують *напівзнежирене борошно*. Іноді макуху піддають додатковій обробці для витягнення залишкового масла. У результаті отримують шрот, при розмелювання якого отримують *знежирене борошно*.

Крім того, соєве борошно буває дезодороване (оброблена паром) і недезодороване. Обробка паром сприяє інактивації ферментів сої, що руйнують білки, що покращує збереження соєвого борошна (до 1 року).

Недезодороване борошно зберігається 1,5-3 місяці.

З основних компонентів соєвого борошна особливе значення для процесів ферментації мають азотисті речовини, представлені зокрема білками, на їх частку припадає до 40%. Крім білків, у соєвому борошні міститься до 25% вуглеводів, до 2,5% органічних кислот і 4-6% золи.

На виробництві при приготуванні поживних середовищ, що містять соєве борошно, попередньо готують суспензію, яку згодом заварюють. Заварювання суспензії проводять для полегшення утилізації соєвої муки мікроорганізмом, тобто розщеплення її протеолітичними ферментами продуцента. Крім того, після заварювання соєве борошно рівномірно (без грудочок) розподіляється по всьому об'єму апарату.

Соєве борошно є дуже пеногенним компонентом, викликаючи сильне спінювання культуральної рідини в процесі ферментації. У процесі заварювання білки соєвого борошна частково денатуруються, що зменшує здатність до піноутворення. Потім, для видалення летких компонентів, що сприяють піноутворенню, через заварену муку продувають стисле повітря.

7.9.4 Джерела мінерального живлення

Мінеральні компоненти (макро- і мікроелементи) відіграють важливу роль в життєдіяльності мікроорганізмів. Багато з них входять до складу протоплазми мікробної клітини в якості складових частин деяких ферментів, інші елементи виступають в якості компонентів, що регулюють осмотичний тиск або змінюють гідрофільність протоплазми клітин.

Макроелементи. (P, S, K, Na, Ca, Mg, Fe) виконують найважливіші фізіологічні функції клітини: регулюють проникність клітинної мембрани, беруть участь в перенесенні енергії, виконують роль активаторів ряду ферментів тощо. Найважливішим з макроелементів є фосфор, який необхідний для життєдіяльності всіх мікроорганізмів, тому що входить до складу найважливіших сполук клітини: нуклеопротейдів, нуклеїнових кислот, поліфосфатів, фосфоліпідів тощо.

До 5% фосфору міститься в кукурудзяному екстракті або фосфор додають в живильні середовища у вигляді солей фосфорної кислоти.

Мікроелементи. (Cu, Zn, Mn, Mo, Co тощо) Відіграють значну роль у життєдіяльності мікроорганізмів, тому що майже всі процеси синтезу і перетворення речовин здійснюються за допомогою ферментів, до складу яких часто входять мікроелементи. Названі елементи мають високу каталітичну активність в процесах внутрішньоклітинного обміну.

До складу поживних середовищ мікроелементи додають у вигляді солей неорганічних кислот в дуже незначних кількостях.

7.9.5 Середовища для вирощування біооб'єктів

Для промислового культивування продуцентів біотехнологічних продуктів зазвичай використовують рідкі поживні середовища, що містять різні джерела вуглецю, азоту, набори мінеральних солей.

Для кожного біооб'єкту вивчають поживні потреби і створюють свою індивідуальну композицію (пропис, рецептура) живильного середовища.

При вирощуванні мікроорганізмів використовують, як правило, натуральні поживні середовища, які мають простий склад, кількість компонентів в них не більше 8-15, але компоненти, особливо джерела вуглецю (крохмаль, кукурудзяна мука), додають у високих концентраціях (5-10%).

При культивуванні клітин рослин частіше використовують синтетичні середовища з великою кількістю інгредієнтів (до 25). Ефективним джерелом вуглецю є глюкоза або сахароза, а джерелом азоту – амонієві солі неорганічних кислот, сечовина і суміш амінокислот.

Обов'язково до складу середовищ вводять різні мікроелементи, які для зручності дозування додають у вигляді концентрату, що містить до 6-8 солей, причому обов'язково марки «Х.Ч.», що не містять домішок.

Важливим і обов'язковим компонентом поживних середовищ для вирощування рослинних клітин є фітогормони (ауксини, кінетин, індолуксусна і гіберелінова кислоти).

Потреби в харчуванні у клітин ссавців набагато складніші, ніж у прокаріотів мікроорганізмів. У зв'язку з цим поживні середовища для вирощування цього біооб'єкту складніші за складом і містять до 50-60 компонентів. Для синтезу білків їм потрібна суміш амінокислот, а для синтезу нуклеїнових кислот – суміш пуринів і піримідинів. Живильне

середовище, яке готується на високоочищеній воді, повинне містити глюкозу як джерело вуглецю та енергії, суміш вітамінів і збалансовану суміш мінеральних речовин для підтримки потрібного осмотичного тиску в клітинах і оптимального рН середовища (близько 7,2). У середовище необхідно додавати невелику кількість антибіотиків щоб уникнути бактеріального зараження. Крім того, це середовище повинне містити 5-20% сироватки крові (людини або теляти).

До ростових речовин, специфічних для росту клітин тварин, можна зарахувати: інсулін, глюкагон, простагландини E1 і E2, соматомедин C, гідрокортизон, прогестерон, естрадіол, тестостерон та інші. Для оптимального росту культури потрібна температура, близька до 37°C. При температурі нижче 36°C клітини діляться дуже слабо або не діляться зовсім, а вище 38°C – клітини гинуть.

7.10. Методологічні підходи до виділення та очищення біологічно активних речовин

7.10.1. Стратегія виділення цільових продуктів

Виділення і очищення продукту біотехнологічного виробництва відбувається на постферментативній стадії, для якої характерний низький вміст цільового продукту і наявність великої кількості домішок. Процес виділення і очищення являє собою ряд послідовних технологічних операцій, кількість яких зростає з підвищенням бажаної чистоти кінцевого продукту.

Залежно від типу культурального середовища підходи до виділення цільового продукту можуть варіюватися (Рис. 7.6).

Якщо ми працюємо зі щільним або сипучим середовищем, то для виділення біологічно активних речовин (БАР) спершу необхідно провести гомогенізацію субстрату і продуцента з метою руйнування клітинних стінок і клітинних структур. Або провести екстракцію (змив) БАР зі щільного або сипучого середовища. Потім відбувається виділення, концентрування і очищення цільового продукту.

Якщо процес ферментації відбувався на рідкому поживному середовищі, то необхідно провести процес сепарації. Далі надходять туди, де накопичується цільовий продукт: у біомасі або в культуральній рідині.

Цільовий продукт може бути клітинами мікроорганізмів, які після відділення від культуральної рідини необхідно додатково обробити (наприклад, піддати ліофільному сушінню). Так отримують готові лікарські засоби – пробіотики.

У разі, якщо цільовий продукт накопичується всередині клітин, необхідно проводити процес дезінтеграції.

У культуральній рідині після закінчення процесу ферментації містяться мікроорганізми, продукти їх

життєдіяльності, залишки поживного середовища, піногасник, розчинні і нерозчинні речовини. Якщо цільовим продуктом біосинтезу є метаболіти, розчинені в культуральній рідині, то проводять виділення продукту, його концентрування і очищення в майбутньому.



Рис. 7.6. Стратегія виділення і очищення цільових продуктів у залежності від типу живильного середовища

Екстракцію БАР (наприклад, ферментів) з поверхні поживних середовищ проводять за допомогою розчинників.

Для виділення БАР з дріжджів або бактерій необхідно піддати механічному або автолітичному руйнуванню їх клітинні стінки, що володіють високим дифузійним опором.

На повноту екстрагування БАР з культур впливає багато факторів: температура, рН, тривалість процесу, конструктивні особливості екстракційних апаратів, природа витягування БАР, кількість відібраного екстракту з одиниці маси завантаженої в апарат культури тощо.

Для екстракції широко використовують дифузійні

батареї, що складаються з декількох екстракторів.

Гомогенізацію (отримання однорідної маси, що супроводжується руйнуванням клітинних структур) культур проводять за допомогою ножових, маточних гомогенізаторів, валкових або кульових млинів (для щільного матеріалу), змінного заморожування – відтавання тканини (руйнується клітинна оболонка), ультразвукової обробки, пресметоду (заморожений матеріал пропускають через маленькі отвори сталевого преса під високим тиском – «м'ясорубка») і методу «азотної бомби», при якому мікробні клітини спочатку насичують азотом під високим тиском, потім різко скидають тиск, як наслідок виділяється газоподібний азот, який руйнує клітини.

Наступним етапом є відділення фрагментів клітинних стінок. Використовують ті ж методи, що і при сепарації клітин: центрифугування або фільтрацію. Однак застосовують більш високошвидкісні центрифуги і фільтри з меншим діаметром пор (часто мембранні), ніж при сепарації клітин. У більшості біотехнологічних процесів клітинні стінки відкидають, як баласт, але можливо і промислове отримання компонентів клітинних стінок як цільового продукту. Подальше виділення цільового продукту з гомогенізат здійснюють за допомогою загальних методів виділення і концентрування.

Якщо цільовий продукт знаходиться в культуральній рідині, очищеній від біомаси, то проводять його виділення з культуральної рідини і його концентрування. Більшість цільових продуктів мікробіологічного синтезу нестабільні і схильні до впливу різних чинників. Білки, наприклад, дуже чутливі до нагрівання, змін рН середовища, до багатьох фізичних і хімічних впливів. Дуже часто виділити цільовий продукт за допомогою одного методу практично неможливо. Тому застосовують комбінацію декількох методів.

При виборі методу виділення та концентрування того

чи іншого продукту мікробіологічного синтезу необхідно враховувати наступні фактори:

1. Фізико-хімічні властивості культуральної рідини.
2. Властивості виділення продукту (термолабільність, стійкість до різних хімічних агентів тощо).
3. Вимоги до кінцевої форми продукту (ступінь чистоти і ступінь концентрування).
4. Технологічні та техніко-економічні показники (вихід продукту, продуктивність обладнання, необхідність подальшої обробки тощо).

7.10.2. Методи виділення та концентрування

Всі методи виділення продуктів мікробіологічного синтезу з культуральної рідини ділять на дві групи:

1. Екстракція, іонний обмін, адсорбція, кристалізація – якщо цільовий продукт в розчині.
2. Осадження, фільтрування, центрифугування, сепарування – якщо цільовий продукт у вигляді твердої фази.

Осадження

Осадження (седиментація) – це процес розшарування дисперсних систем під дією сили тяжіння і відділення дисперсної фази у вигляді осаду.

Найпростіший випадок седиментації – рвідстоювання – застосовують в наступних випадках:

1. При діаметрі частинок більше 3 мкм, коли броунівський рух не робить істотного впливу на процес відстоювання.
2. При виділенні стабільних продуктів, коли фактор часу не має вирішального значення.
3. При більш низьких, ніж при інших методах, витратах.
4. В особливих випадках, коли необхідно розділити

частки на фракції за розміром або щільністю на підставі їх різних швидкостей осадження.

5. Якщо необхідно попередньо розділити суспензію на дві фракції – осад і надосадову рідину, які в подальшому можна обробляти на різному устаткуванні.

Швидкість осадження біомаси з культуральної рідини невелика і складає близько 10^{-6} – 10^{-7} м/с.

Для прискорення процесу осадження застосовують:

1. Коагулянти – речовини, що переводять зважені частинки в агрегатно-нестійкий стан.

2. Флокулянти – речовини, що сприяють руйнуванню колоїдних структур і утворенню великих пластівців.

Як коагулянт застосовують зазвичай желатин, рибний клей, казеїн, як флокулянт – метилцелюлозу, пектин, альгінат натрію тощо.

Центрифугування

Центрифугування – це поділ неоднорідних систем під впливом поля відцентрових сил. Для центрифугування застосовують центрифуги різних конструкцій. Різні типи центрифуг оцінюють по так званому фактору поділу, який показує у скільки разів прискорення відцентрового поля більше прискорення вільного падіння

У звичайних центрифуг цей фактор становить до 3500, а у суперцентрифуг вище – 5000-7000. Ультрацентрифуги можуть мати фактор поділу до 20 000. Центрифуги, що мають високий фактор поділу і оснащені тарілчастим барабаном, називають сепараторами. У мікробіологічній промисловості сепаратори є одним з найпоширеніших типів центрифуг. Сепаратори дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60-90%.

Останнім часом з'явилися спеціальні герметичні сепаратори, що дозволяють вести процес сепарування в автоматизованому режимі, оптимально підібраному для специфічних умов конкретних культуральних рідин.

Області застосування центрифугування:

1. Виділення біомаси з культуральної рідини (бактерії, гриби, дріжджі).
2. Відділення різних цільових продуктів мікробіологічного синтезу (антибіотики, ферменти, вітаміни та інші), переведених попередньо в тверду фазу.
3. Поділ емульсій, що утворюються при екстракції.

Недоліки центрифугування:

- складність конструкції, висока енергоємність і вартість;
- складність експлуатації (ненадійність, вібрація, шум, необхідність періодичного розбирання і мийки);
- вплив на клітину відцентрової сили, нагрів, складність герметизації і забезпечення асептичних умов ведення процесу.

Головні *переваги центрифугування* і сепарування – висока продуктивність і високий ступінь концентрування – дозволяють успішно конкурувати з іншими способами виділення і концентрування як в промислових, так і в лабораторних умовах.

Фільтрування

Фільтрування - це поділ твердої і рідкої фаз суспензії при пропущенні її через пористу перегородку. Кінцева мета фільтрування – отримання твердої або рідкої фази (коли одна з них є відходом), а також одночасне отримання твердої і рідкої фаз.

Фільтрування – гідродинамічний процес, швидкість якого прямо пропорційна різниці тисків, створюваної по обидва боки фільтрувальної перегородки і обернено пропорційна опору, який випробують рідиною при її русі через пори перегородки і шар утвореного осаду.

На процес фільтрування впливає ряд факторів, які можна розділити на дві групи:

1. Макрофактори – різниця тисків, товщина шару

осаду, в'язкість рідкої фази тощо. Ці фактори свідомо відомі і контролюються за допомогою приладів.

2. Мікрочинники – розмір і форма частинок осаду і пор фільтрувальної перегородки, товщина подвійного електричного шару на поверхні частинок тощо. Ці фактори менш вивчені і їх характеризують лише непрямими методами. Саме мікрочинники мають вирішальний вплив на процес фільтрування і ускладнюють його масштабування.

При фільтруванні культуральної рідини утворюються здебільшого драглисті пухкі або дрібнозернисті опади, що володіють великим опором. Середня швидкість фільтрації при цьому становить всього 50 л/м² на годину.

Для збільшення швидкості фільтрування зазвичай використовують два прийоми:

1. Попередня обробка суспензій.
2. Застосування допоміжних фільтрувальних матеріалів.

Попередня обробка культуральної рідини дозволяє більш повно перевести цільовий продукт в рідку або тверду фазу, забезпечити краще розділення фаз і отримати продукт, придатний для подальшого очищення і виділення. У результаті попередньої обробки відбувається коагуляція зважених часток.

Найбільш поширені такі способи попередньої обробки:

1. Кислотна коагуляція (застосовується для виділення антибіотиків, стійких до низьких рН).
2. Обробка електролітами.
3. Теплова коагуляція (можлива в тих випадках, коли продукт стійкий до нагрівання до 70-80°C).
4. В якості допоміжних фільтрувальних матеріалів використовуються фільтрувальні порошки, які вносять у фільтровану рідину як наповнювачі або попередньо

наносять на робочу поверхню фільтра у вигляді ґрунтового шару.

Ультрафільтрація

В основі **ультрафільтрації** лежить використання мембран з діаметром пор від 0,001 до 0,1 мкм. Ультрафільтрація застосовується для поділу клітин і молекул.

Мембранні методи розділення мають ряд переваг:

1. Концентрування і очищення здійснюються без зміни агрегатного стану і фазових перетворень.
2. Перероблюваний продукт не піддається тепловим і хімічним впливам.
3. Механічний та аеродинамічний впливи на біологічний матеріал незначні.
4. Легко забезпечуються герметичність і асептичні умови.
5. Апаратурне оформлення компактне, відсутні рухомі деталі.
6. Процес мало енергозатратний, в більшості випадків енергія витрачається тільки на перекачування розчинів.

Екстракція

Екстракція – процес поділу суміші твердих і рідких речовин за допомогою виборчих (селективних) розчинників (екстрагентів).

Фізична суть екстракції полягає в переході витягуваного компонента з однієї фази (рідкої або твердої) в фазу рідкого екстрагента при їх взаємному зіткненні. Екстраговані компоненти переходять з вихідного розчину в розчинник внаслідок різниці концентрацій, тому даний процес належить до дифузійних. Процес екстракції проводиться зазвичай в двофазних системах: «тверде тіло-рідина» або «рідина-рідина».

Галузь застосування екстракції: виділення і очищення

антибіотиків, вітамінів і амінокислот.

Переваги методу:

1. Низькі витрати.
2. Висока швидкість екстракційних процесів.

Недоліки методу: використання шкідливих, вибухонебезпечних органічних розчинників.

Хроматографічні методи

Хроматографічне розділення БАР використовують в різних варіантах: гель-фільтрація, іонообмінна хроматографія, афінна хроматографія. Поділ речовин шляхом хроматографії засновано на їх неоднаковому розподілі між двома незмішуваними фазами.

1. Іоннообмінна хроматографія:

Колонка наповнюється гранулами адсорбенту, які несуть заряджені катіонні (NH_4) або аніонні (SO_4) групи, здатні захоплювати іони протилежного заряду. Цей метод використовується для виділення іонізованих речовин з рідини, а також для очищення нейтральних сполук від домішок іонної природи.

2. Метод «молекулярних сит», гель-хроматографія, гель фільтрація.

Види хроматографії, засновані на поділі речовин з різною молекулярною масою і діаметром частинок. Адсорбент захоплює і утримує, наприклад, тільки низькомолекулярні сполуки, пропускаючи з'єднання з більш високою молекулярною масою.

3. Афінна хроматографія.

Метод ґрунтується на затримуванні комплексу, що утворюється з компонента суміші, і ліганда, який фіксований на частинках носія (наповнювача колонки). При цьому методі використовуються агенти, здатні специфічно зв'язувати якусь конкретну речовину. Наприклад, фермент очищають на колонці, заповненій його субстратом або

специфічним інгібітором.

Дуже ефективний метод розділення і очищення білкових і небілкових речовин заснований на взаємодії антигенів і антитіл. Розроблений на підставі таких взаємодій спосіб отримав назву *імуноафінної хроматографії* і суттєво підвищив роздільну здатність при введенні в практику використання моноклональних антитіл.

Блискучою ілюстрацією його ефективності є високий ступінь одноетапною очищення людського інтерферону (чистота підвищується приблизно в 500 разів). У афінній хроматографії можуть використовувати групові ліганди, що зв'язують, наприклад, група схожих за структурою ферментів. Такими лігандами є кофактор ферментів або їх аналоги. Можуть застосовуватися і ще менш специфічні ліганди, які зв'язують досить великі класи речовин; наприклад, алкільні і арильні групи або ліганди, що є текстильними барвниками.

Перевага афінної хроматографії полягає в тому, що з її допомогою можна в одну стадію здійснити повне очищення продукту зі складної багатокомпонентної суміші (культуральної рідини, цільних клітинних екстрактів тощо), тоді як інші способи вимагають багатоетапного очищення і пов'язані з великими затратами праці і часу.

Однак метод має і ряд *недоліків*, зокрема висока ціна використовуваних матеріалів (наприклад, речовин, які застосовуються як ліганди), а також швидке забивання колонки пропускаючими речовинами (це змушує використовувати їх в періодичному, а не в безперервному режимі). Після кожного виділення продукту колонки промивають і частки, які заповнені гелем також піддаються очищенню.

Крім афінної хроматографії (яка іноді називається ще афінною адсорбцією в гелі) у великомасштабних

біотехнологічних процесах для очищення продуктів застосовують *афінну преципітацію і афінний поділ*.

При **афінній преципітації** ліганд з'єднується з розчинним носієм і після взаємодії з виділеним з'єднанням, що утворює комплекс, випадає в осад. Іноді прискорення випадання преципітату досягається шляхом додавання електролітів.

Афінний поділ ґрунтується на використанні системи, що складається з двох водорозчинних полімерів, один з яких несе специфічні ліганди, а інший має спорідненість з домішковими компонентами. Наприклад, поділ нуклеїнових кислот і білків. Для полімеру, що з'єднується з лігандом, береуть поліетиленгліколь, а іншим компонентом є декстран.

Електрофорез

Поряд з хроматографією перспективними методами розділення речовин при біотехнологічних процесах є *електрофорез і його модифікації*. У цих методах суміш, що розділяється поміщається в потужне електричне поле, що забезпечує рух іонізованих компонентів суміші. Різниця в електрофоретичній рухливості дозволяє просторово розділити компоненти, що входять до її складу.

Сучасні варіанти електрофорезу використовують (як і хроматографія) пластинки або колонки з утворюючим гелем-наповнювачем (агароза, поліакриламід, сефароза, оксіапатит тощо).

Модифікацією методу електрофорезу є ***ізоелектричне фокусування, або електрофокусування***. У цьому методі розчин, що насичує гель, містить з'єднання з кислотно-основними групами. Під впливом електричного поля кислотно-основні групи буферного з'єднання змінюють ступінь іонізації, створюючи градієнт рН в напрямку електричного поля. Електрично заряджені компоненти

суміші, нанесеної на гель, мігрують у напрямку до електроду протилежного знака. Оскільки ці компоненти пересуваються по градієнту рН, то вони поступово втрачають свої заряди і в зоні, де рН відповідає ізоелектричній точці (точці електронейтральності), їх рух припиняється. Кожен компонент концентрується (фокусується) в певній галузі гелю.

Кристалізація

Кристалізація – це виділення твердої фази в вигляді кристалів, головним чином, з розчинів і розплавів. Кристалізація антибіотиків та інших біологічно активних речовин заснована на різкому зменшенні їх розчинності в результаті зміни температури розчину (зазвичай зниження, але іноді, наприклад, в разі еритроміцину – підвищення) або переведення їх в іншу погано розчинну хімічну форму. Це досягається зміною рН розчину або додаванням відповідного реагенту, часто з одночасним зниженням температури. Кристалізація є не тільки способом отримання антибіотиків в твердому вигляді, але і дуже ефективним засобом очищення від супутніх домішок, що є суттєвою перевагою в порівнянні з деякими іншими методами поділу. Метод кристалізації знайшов застосування в технології отримання антибіотиків (тетрацикліну, еритроміцину та ін.), вітамінів, полісахаридів.

Упарювання

Упарювання – це процес концентрування рідких розчинів шляхом часткового видалення розчинника випаровуванням при нагріванні рідини. У ряді випадків упарений розчин піддають подальшій кристалізації. Концентровані розчини та тверді речовини, одержувані в результаті упарювання, легше і дешевше переробляти, зберігати і транспортувати. Наприклад, сушку в виробництві антибіотиків здійснюють при температурі 60-70°C під вакуумом, отже, даний метод неприпустимий при переробці

багатьох термолабільних біологічно активних речовин.

7.11. Сушіння біотехнологічної і фармацевтичної продукції

Отримана в кінці циклу культуральна рідина містить від 0,1 до 5% сухих речовин. На наступних стадіях з неї витягують корисні продукти (біомаса, антибіотики, ферменти, амінокислоти та інші речовини), які потім перетворюються в кінцеву товарну форму. Більшість продуктів біологічного синтезу випускаються в сухому вигляді із залишковою вологістю не більше 5-12%.

Видалення води і тепловий вплив в ході сушіння біомаси ведуть до суттєвих змін, що впливає на якість готового продукту. Найбільші труднощі виникають при необхідності зберегти такі термолабільні об'єкти, як живі мікроорганізми (бактеріальні препарати) або ферментні препарати. Основними причинами їх термолабільності є денатурація білка і інактивація ферментів при тепловій дії, збільшення концентрації електролітів і токсичних речовин при видаленні води, а також структурні та механічні пошкодження в процесі сушіння.

За агрегатним станом води розрізняють наступні методи сушіння: сушіння з рідкого стану, випаровування з твердого стану, минаючи рідку фазу, – сублімацію.

Сушіння культуральної рідини або біомаси здійснюється контактним, конвективним та радіаційним способом.

При контактному сушінні тепло передається матеріалу, який сушать, через нагріті поверхні і випаровувана вода переходить в повітря. Для сушіння продуктів біологічного синтезу застосовуються одно- і двовальцові шафкові сушарки.

При конвективному сушінні тепло, необхідне для

процесу сушіння, доставляється газоподібним сушильним агентом, який відіграє роль теплоносія і середовища, в яке переходить волога з матеріалу. Цей метод широко застосовується для сушіння продуктів біологічного синтезу і, перш за все, в пневматичних, аерофонтанних, розпилювальних сушарках і сушарках в киплячому шарі.

Оскільки більшість продуктів біологічного синтезу є термолабільними речовинами, то для їх сушіння застосовують найбільш щадні методи. При цьому прагнуть знизити температуру і час сушіння. Для цих цілей використовують вакуум або сушіння тонкодисперсного матеріалу. Ще більш вигідні умови для сушіння термолабільних речовин створюються при сублімації.

Сублімаційний метод сушіння заснований на видаленні вологи із замороженого стану, водночас, волога переходить в газоподібну фазу, минаючи рідку.

Характерними особливостями сублімації є мінімальні, у порівнянні з іншими методами сушіння, зміни структури матеріалу, що висушується, і більш низькі температури висушування. Тому сушіння сублімацією застосовується для особливо термолабільних продуктів, наприклад, живих мікроорганізмів, ферментів, деяких антибіотиків.

Причиною загибелі клітин може бути надмірне зневоднення в процесі сублімації. Для захисту клітин від загибелі при заморожуванні і наступному висушуванні застосовуються спеціальні захисні середовища, що включають гліцерин, сахарозу, полівінілпіролідон і інші речовини, що уповільнюють утворення внутрішньоклітинного льоду, що зменшують концентрування електролітів і захищають клітини від грубого незворотного зневоднення.

7.12. Біологічна і екологічна безпека в біотехнологічному виробництві

Біологічна безпека – це збереження живими організмами своєї біологічної сутності, біологічних якостей, системоутворюючих зв'язків і характеристик, запобігання широкомасштабним втратам біологічної цілісності, які можуть відбутися в результаті:

- впровадження сторонніх форм життя в сформовану екосистему;
- впровадження сторонніх вірусних і літрансенних генів або пріонів;
- бактеріального забруднення їжі;
- впливу генної терапії або інженерії, або вірусів на органи і тканини;
- забруднення природних ресурсів (води, ґрунту).

Біотехнологічне виробництво становить певну небезпеку, оскільки існує ризик потрапляння біооб'єктів в навколишнє середовище. Основну небезпеку представляють мікроорганізми. Контроль в цьому випадку передбачає:

1. Герметичність апаратури.
2. Стерилізацію ферментера і трубопроводів спеціальними речовинами, які не роз'їдають метал, з якого виготовлена апаратура.
3. Генетичні методи: вставлення дефекту в біооб'єкт, тобто знищення гену, який зумовлює утворення ферменту, що синтезує вітаміни або амінокислоту. За такої умови біооб'єкт може розмножуватися тільки у певному живильному середовищі, але при попаданні в навколишнє середовище він гине (у навколишньому середовищі немає для нього життєвонеобхідних поживних речовин, звичного для нього живильного середовища).

4. Фізичні методи, такі, як зменшення атмосферного тиску в ферменторі на кілька міліметрів ртутного стовпчику. За такої умови у разі порушення герметичності не відбуватиметься викид продуцента в атмосферу (згідно загальним фізичним законам різниці тисків).

5. Методи, які дозволяють виявлять так звані «втікаючі» у навколишнє середовище мікроорганізми. У виробничому цеху роблять змиви і в них опускають зонди. Ці зонди мають антитіла до антигенів біооб'єкту, антитіла пов'язані з залізом, що відіграє роль мітки. Якщо в змивах є клітини з антигенами, то вони будуть прилипати до зонду.

Екологічна безпека – допустимий рівень негативного впливу природних і антропогенних факторів екологічної небезпеки на навколишнє середовище і людину. З метою забезпечення екологічної безпеки здійснюється екологічний моніторинг, який містить:

- нормування впливів на навколишнє середовище;
- контроль джерел впливу на навколишнє середовище;
- контроль якості компонентів навколишнього середовища;
- моніторинг екологічних ризиків;
- моніторинг індикаторів стійкого розвитку.

Всі ці заходи спрямовані на своєчасне виявлення порушень і попередження виникнення несприятливих впливів на навколишнє середовище.

7.13. Утилізація відходів біотехнологічного виробництва

Способи попередження попадання продуцента в навколишнє середовище

По-перше, після використання культуральної рідини, її стерилізують і тільки після цього змішують зі стічними

водами.

По-друге, геномодифіковані продуценти потребують додаткового азоту, вони можуть розмножуватися тільки у хорошому поживному середовищі, тому при виході з ферментатора вони розмножуватися вже не можуть.

По-третьє, продуцент роблять примхливим, тобто залежним від будь-якої речовини живильного середовища, без якого він розмножуватися не може (наприклад, це може бути будь-яка вітамінна добавка).

Відходи біотехнологічного виробництва класифікуються залежно від фізичного стану: тверді відходи (міцелій, біомаси продуцента), рідкі відходи (відходи від культуральної рідини), газоподібні відходи.

Знищення твердих відходів

Відомо, що при відділенні міцелію фільтруванням отримують сотні тонн міцелію в рік. У ньому є і залишки цільового продукту. Нині міцелій підсушують і відвозять на міські звалища (найпримітивніший шлях утилізації). Розміщують міцелій в ґрунтові ями на бетонну підлогу, перемішують з ґрунтом і залишають на кілька років – ґрунтові мікроорганізми переробляють міцелій (цей шлях утилізації зручний, але не перспективний). Бетонну підлогу роблять для того, щоб запобігти вимиву міцелію дощовими водами та потраплянню в ґрунтові води. Більш сучасні шляхи утилізації:

1. Міцелій можна стерилізувати, перемішувати і додавати в корм сільськогосподарським тваринам.
2. Міцелій можна додавати в будівельні матеріали (наприклад, в цеглу) – за такої умови збільшується його міцність (перспективний шлях).
3. Із міцелію можна «витягати» різні фракції і використовувати для певних цілей (наприклад, з продуцента тетрацикліну можна витягти загальну ліпідну

фракцію і використовувати її як детергент).

Очищення рідких відходів (відходів культуральної рідини)

1-й етап. Культуральна рідина подається в перший відстійник з відсмоктуванням.

2-ий етап. Рідина подається в аеротенк.

Аеротенк - це великий залізобетонний басейн, на дні якого укладено труби, по яких безперервно подається повітря із зовнішнього середовища.

У зовнішньому повітрі є суміш мікроорганізмів (біоценоз). Вони окислюють органічні речовини до CO_2 і H_2O , при цьому кількість органічних речовин зменшується на 80-90%. З усіх мікроорганізмів, що потрапили із зовнішнього середовища, активно розмножуються тільки ті мікроорганізми, їжею для яких слугують органічні речовини. Ці мікроорганізми називають *активним мулом*. Він складається з декількох десятків видів мікроорганізмів, з них:

- 70% належать до роду *Pseudomonas*;
- 20 % належать до роду *Bacterium* – спороутворюючі грампозитивні палички;
- 10% належать до роду *Bacillus* і грамнегативних коків.

3-й етап. Стічні води з аеротенків подаються в другий відстійник. У ньому відбувається осадження активного мулу. Частину мулу з відстійника знову подають в аеротенк, а частину висушують і використовують як добриво.

4-й етап. Стічні води подають на біофільтри. Біофільтри складають блок доочистки. *Біофільтри* – це плівки, розташовані перпендикулярно течії рідини. У них вмонтовані штам-деструктори (руйнівники), отримані

методом генної інженерії (вони насичені плазмідами і окисними ферментами).

5-й етап. Хлорування.

Ліквідація газоподібних відходів

Ліквідацію газоподібних відходів проводять на колонках з каталізатором при температурі 3000°C (відбувається спалювання відходів до CO₂).

РОЗДІЛ 8.

ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ І СТАНДАРТИЗАЦІЯ ПРОБІОТИКІВ

8.1. Технологія отримання основних пробіотиків

Всі пробіотики отримують за схожими технологіями. Відмінності полягають лише у вигляді використовуваного мікроорганізму і складі живильного середовища. Технологію отримання пробіотиків розглянемо на прикладі лактобактерина.

Для отримання лактобактерина використовують два штами *Lactobacillus fermentum* і два штами *L. plantarum*. Це грампозитивні палички, довжиною 0,7-3,0 мкм, ростуть в середовищі вуглекислого газу, азоту і кисню. За потребою в поживних речовинах молочнокислі бактерії відносяться до найбільш складних мікроорганізмів.

Зі сполук вуглецю вони можуть використовувати незначну кількість речовин, які слугують для бактерій джерелом живлення і енергії. Це моно- і дисахариди, глюкоза або лактоза.

Молочнокислі бактерії потребують складних органічних сполук азоту. Вони ростуть у середовищах з підібраними сумішами амінокислот, ферментативними або кислотними гідролізатами білків печінки, казеїну і молока. Більшості бактерій необхідні цистеїн, триптофан, рідше – глутамінова кислота.

Також молочнокислі бактерії потребують вітамінів. Цим пояснюється вплив на їх зростання добавок до середовища: рослинних екстрактів, дріжджового автолізата і інших вітаміновмісних сполук.

Для промислового культивування лактобацил використовують живильне середовище МРС-1 (Мозера-

Рогози-Шарма-1).

Вона має наступний склад: глюкоза; гідролізат коров'ячого молока; печінковий екстракт; гідролізат казеїну; дріжджовий автолізат; пептони; цистеїн; MnSO_4 ; MgSO_4 ; KH_2PO_4 ; Твін-80.

Приготування напівпродуктів (гідролізату коров'ячого молока, печінкового екстракту, гідролізату казеїну, дріжджового автолизата) проводять за відпрацьованими методиками, що гарантує перехід поживних речовин, які містяться в сировині, у стан, найбільш доступний для споживання мікроорганізмами. Всі перераховані компоненти змішують у певній послідовності і стерилізують.

Для отримання маточної культури мікроорганізмів роблять 6 послідовних пасажів (пробірки – чашки Петрі – флакони – бутлі). Культивування здійснюють протягом 9 діб.

Вирощування молочнокислих бактерій проводять в ферментаторі при температурі 35-37°C протягом 8-12 годин в середовищі МРС-1. Періодично, через кожні 1,5-2 години, культуральну рідину перемішують для рівномірного розподілу клітин в об'ємі середовища. Ферментацію проводять в анаеробних умовах, в апарат подають азот для створення інертної атмосфери, необхідної для розвитку лактобактерій.

Необхідною умовою масового виробництва пробіотиків є збереження їх стабільності протягом тривалого часу.

Бактерійні засоби, що містять живі мікроорганізми, належать до найменш стійких, їх активність знижується через загибель клітин. Мікроорганізми, маючи низький рівень біологічної організації, зберігають життєздатність практично при повній втраті води, водночас в них можна зупинити сповільнити обмінні процеси.

Для збільшення термінів життєздатності молочнокислих бактерій використовують сублімаційне (ліофільні) сушіння, яке проводиться в умовах низької

температури і глибокого вакууму. Ліофільне сушіння здійснюється після розливу в ампули.

До факторів, що впливають на виживання мікроорганізмів в засобах сухих пробіотиків при зберіганні, належить наявність захисних середовищ.

У зв'язку з цим мікробна суспензія після стадії ферментації змішується із захисним середовищем, який є сумішшю желатину, сахарози, молока, натрію цитрату і води. Культуральна рідина лактобактерій, змішана із захисним середовищем, надходить на стадію розливу в ампули або флакони.

В якості захисних середовищ також використовують:

- цукрово-желатозне середовище (сахароза – 5%, желатин – 1-1,5%);
- обрат молока (5-10%);
- цукрово-желатозно-молочне середовище (сахароза – 5%, желатин харчовий – 3%, обрат молока – 5-10%).

Біохімічні процеси, що протікають при культивуванні молочнокислих бактерій

Молочнокислі бактерії діляться на дві великі групи: гомоферментативні (лактобактерії) і гетероферментативні (біфідобактерії), які можуть бути облігатними і факультативними.

Гомоферментативні бактерії (*S. lactis*, *S. cremoris*, *L. casei*, *L. lactus* тощо) – у результаті бродіння утворюють з глюкози молочну кислоту:

глюкоза → глюкозо-6-фосфат → фруктозо-1,6-дифосфат → фосфоенолпіруват → піровиноградна кислота → молочна кислота

У цих мікроорганізмів розщеплення глюкози здійснюється гліколітичним шляхом (ФДФ-шляхом) з утворенням пірувату.

Для цього бактерії користуються усіма необхідними ферментами, зокрема альдолазою. Потім завдяки наявності у них ферменту лактатдегідрогеназа ПВК перетворюється в молочну кислоту.

У *гетероферментативних молочнокислих бактерій* (*S. citrovorus*, *S. acetonicus*, *S. faecalis*, *S. bovis*) відсутні основні ферменти альдолаза і тріозофосфатізомерази.

Початкове розщеплення глюкози відбувається тільки пентозо-фосфатним шляхом (ПФ-шляху), тобто через глюкозо-6-фосфат і рибulozo-5-фосфат, з якого в подальшому синтезується молочна кислота. Поряд із молочною кислотою утворюється оцтова кислота і етанол:

глюкоза → глюкозо-6-фосфат гліцеральдегід-3-фосфат → піровиноградна кислота → молочна кислота → оцтова кислота → етанол

Поряд з ними утворюється гліцерин, а також діацетил і ацетілметілкарбінол – ароматичні речовини, які надають певний аромат кисломолочним продуктам і вершковому маслу.

8.2. Стандартизація лікарських засобів на основі пробіотиків

Стандартизація засобів проводиться за наступними показниками: опис, пакування, маркування відповідно до вимог фармакопейної статті виробника.

Ідентифікація: проводиться мікроскопічне дослідження з наступним підтвердженням виду мікроорганізму за біохімічними і культуральними властивостями.

Лікарські засоби на основі пробіотиків повинні мати певний рН, який контролюють потенціометрично. Ліофільні форми перевіряють на вміст вологи (втрата в масі при висушуванні), розчинність.

Обов'язково контролюють мікробіологічну чистоту. Перевіряють забрудненість іншими мікроорганізмами, зокрема патогенними. Для цього готують мазки і фарбують їх за Грамом. Повинні бути тільки грампозитивні палички, розташовані в коротких ланцюжках або безладно.

Проводять посів на середовище Сабуро, агар Ендо або м'ясопептонний агар і культивують при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 8, 2 і 8 діб відповідно (не повинно бути зростання мікроорганізмів).

Також проводять тест на специфічну безпеку. Для цього 5 білим мишам обох статей масою 14-16 г вводять перорально по 0,5 мл суспензії, отриманої шляхом розчинення однієї дози в фізіологічному розчині натрію хлориду. Спостерігають протягом 5 діб і фіксують зміну маси мишей. У разі загибелі хоча б однієї миші або при зниженні групової маси після проведення випробування (в порівнянні з вихідною груповою масою), випробування повторюють на подвійній кількості тварин.

Випробування на специфічну активність лактобактерій можна проводити двома способами. По-перше, за кількістю життєздатних бактерій в 1 дозі. По-друге, за здатністю до кислотоутворення.

Перше випробування. Суспензію, отриману з однієї дози, розводять і отримують серію розведень. Висівають у середовище МРС-4. Культивують 40-48 год при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Проводять підрахунок колоній і розрахунок змісту живих бактерій в одній дозі.

Друге випробування. Вміст розводять у середовищі МРС-4 і інкубують при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 48 год. Потім титрують вміст 0,1 М натрію гідроксидом із фенолфталейном

до стійкого ледь рожевого забарвлення.

Розрахунок ведуть за формулою:

$$T = A \times K \times 10,$$

де °T – умовна величина, виражена в градусах Тернера;

A – кількість мілілітрів розчину натрію гідроксиду в концентрації 0,1 моль/л, який використано на титрування 10 мл досліджуваної суспензії;

K – поправка до титру розчину натрію гідроксиду.

Додатково перевіряють склад компонентів середовища висушування для ліофілізованих лікарських форм.

8.3. Номенклатура лікарських засобів для відновлення нормофлори

Останні роки характеризуються бурхливим збільшенням кількості пробіотиків за рахунок модернізації і поліпшення властивостей старих лікарських засобів та появи нових, зокрема полікомпонентних, які містять нові штами мікроорганізмів, а також різні біологічно активні речовини. Це дозволило класифікувати групу пробіотиків на кілька підгруп:

I. Монокомпонентні.

1) біфідомісткі:

- Біфідумбактерин (*Bifidobacterium bifidum*);
- Біовестін (*B. adolescentis*);
- Профібор (*B. bifidum*);

2) лактомісткі:

- Лактобактерин в порошку, Ацилакт, Біобактон (*Lactobacterium acidophilus*);
- Концентрат «Наріне» (*L. acidophilus* ліофілізовані в культуральному середовищі);

- Гастрофарм (*L. bulgaricus*);
- 3) містять апатогенних представників роду *Bacillus*:
 - Бактисубтил, флонівін БС (*Bacillus cereus*);
 - Споробактерин сухий (*Bacillus subtilis*);
- 4) містять колибактерії:
 - Колибактерин сухий (*Escherichia coli*);
 - Біофлор (*E. coli* і компоненти культурального середовища);
- 5) містять дріжджі:
 - Ентерол 250 (*Saccharomyces boulardii*).

II. Полікомпонентні.

- Біфілонг (*Bifidobacterium bifidum et longum*);
- Аципол сухий (*Lactobacterium acidophilus*, *Saccharomyces kefir*);
- Біоспорин (*Bacillus subtilis et licheniformis*);
- Лінекс (*Lactobacterium acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*);
- Біфідлактестра (*Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacterium acidophilus*);
- Біфікол (*Bifidobacterium bifidum*, *Escherichia coli*);
- Біфіформ (*Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*).

III. Комбіновані.

- Кіпацід (*Lactobacterium acidophilus* і лізоцим);
- Біфідіз (*Bifidobacterium bifidum* і лізоцим).

IV. Імобілізовані на сорбенті бактерії.

Біфідумбактерин форте (*Bifidobacterium bifidum* на сорбенті з кісткового активованого вугілля).

Характеристика основних пробіотиків

Біфідо- і лактомісткі харчові продукти – Біфілакт, Біфідок тощо.

Бактусубтил (Bactisubtile) – ЛЗ на основі стійких до дії шлункового соку бактерій, проростання яких відбувається в кишечнику. Вегетативні форми бактерій вивільняють ензими, що розщеплюють вуглеводи, жири, білки; в результаті утворюється кисле середовище, припиняючий процеси гниття. Перешкоджає порушення синтезу в кишечнику вітамінів групи В і Р. Форма випуску – капсули.

Біфідумбактерин (Bifidumbacteriujnin pulveris) – це ліфілізована мікробна маса живих антагоністично активних штамів *Bifidobacterium bifidum*. Володіє антибактеріальною дією широкого спектру патогенних і умовно-патогенних бактерій, відновлює мікрофлору кишечника, нормалізує діяльність ШКТ, володіє імунорегулюючими властивостями. Призначають при дисбактеріозі у дітей і дорослих. Випускається у вигляді таблеток, у флаконах, пакетах і ампулах.

Біфікол сухий (Bificolum siccum) – це мікробна маса живих антагоністично активних штамів *Bifidobacterium bifidum* і *E. coli*. Застосовується для лікування хворих хронічним колітом різної етіології на тлі дисбактеріозу у дітей і дорослих. Форма випуску – флакони і таблетки.

Біфіліз (Bifllys) в 1 мл містить 5 млн. живих біфідобактерій, органічні кислоти, легкозасвоюваний білок, лізоцим. Показаний при гострих кишкових захворюваннях віруснобактеріальної природи.

Біфілонг сухий (Bifilong siccum) – це мікробна маса живих антагоністично активних двох штамів *Bifidobacterium bifidum* і *Bifidobacterium longum*. У вигляді ліофілізату випускається в ампулах і флаконах. Застосовується для лікування гострих і хронічних захворювань кишечника, профілактики і лікування дисбактеріозу у дітей і дорослих.

Біовестін – екологічно чиста емульсія живих біфідобактерій (активніше сухого біфідобактерину). Призначають при діатезі і імунodefіцитах з перших днів

життя.

Лактобактерин в порошок (Lactobacterinum in pulvis) – суха мікробна маса живих антагоністично активних двох штамів *Lactobacterium acidophilus*. Форма випуску – ампули.

Аципол сухий містить штами *Lactobacterium acidophilus* і полісахариду кефірних грибків. Рекомендований дітям з перших днів життя і дорослим для корекції дисбіотичних змін в кишечнику.

Лінекс (Lіnex) містить *Lactobacterium acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *E. faecalis*. Підтримує фізіологічну рівновагу кишкової мікрофлори.

Колібактерин сухий – ліофілізована мікробна маса живих бактерій *E. coli*. Застосовується для лікування дітей та дорослих, які страждають на хронічний коліт. Форма випуску – флакони, ампули та таблетки.

Споровактерин сухий – мікробна маса живих бактерій *Bacillus subtilis*. Застосовується для лікування хірургічних інфекцій м'яких тканин, остеомієліту, дисбактеріозів. Випускається у вигляді ліофілізованої маси в ампулах.

Ентерол 250 (Enterol-250) застосовується в якості активного компонента, містить ліофілізовані дріжджі *Saccharomyces boulardii*, механізм дії яких принципово відрізняється від механізму дії інших бактеріальних засобів. *Saccharomyces boulardii*, мають генетично обумовлену стійкість до антибіотиків і тому при проведенні антибактеріальної терапії зберігають свою активність. Вони не колонізують травний тракт, клітини дріжджів елімінуються з калом протягом декількох днів після завершення курсу терапії. Таким чином, *Saccharomyces boulardii* діють як «тимчасова» кишкова мікрофлора, здатна зберігати або відновлювати рівновагу екосистеми кишечника.

Концентрат «Наріне» – ліофілізована в середовищі культивування мікробна маса живого штаму *Lactobacillus*

acidophilus для новонароджених дітей, з додаванням захисного цукрово-желатино-молочного середовища. Випускається у вигляді порошку кремового кольору, кисломолочного смаку, у флаконах та пакетах.

Характеристика основних пробіотиків

Крім лікарських засобів випускають і пробіотики. Це харчові добавки, що містять різні речовини або продукти життєдіяльності мікроорганізмів, селективно стимулюють ріст і розмноження власної мікрофлори кишечника.

Найчастіше це ди- або олігосахариди, наприклад, лактулоза – синтетичний дисахарид або фрукто-олігосахарид. Ці речовини не руйнуються в організмі людини, мають солодкий смак, нешкідливі.

Наприклад, пробіотик «ШКТ-транзит», що випускається фармацевтичною компанією «Евалар» у вигляді саше, містить олігофруктозиди, інулін, полісахарид зі смоли акації, екстракт зеленого чаю, екстракт артишоку.

Пребіотик «Хілак-форте» є концентратом метаболітів декількох мікроорганізмів (*E. coli*, *Streptococcus faecalis*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*).

Лактулоза (*Lactulose*) – синтетичний дисахарид. Під впливом засобу збільшується кількість лактобактерій, що призводить до підвищення кислотності в товстому кишечнику; поряд з цим збільшується об'єм калових мас і проявляється послаблюючий ефект без впливу на слизову оболонку і гладку мускулатуру кишечника. Лактулоза зменшує утворення і всмоктування азотовмісних токсичних речовин в проксимальному відділі товстого кишечника, не зменшує абсорбцію вітамінів, не викликає звикання. Форма випуску – сироп, що складається з лактулози, галактози, лактози.

Пантотенат кальцію. Утилізується біфідобактеріями і сприяє збільшенню їх маси.

ПАМБА (Параамінобензойна кислота). Сприяє зростанню біфідо- і лактобактерій, кишкових паличок. Інгібітор фібринолізу.

Лізоцим (*Lysocim*) – мукополісахарідаза, фермент білкової природи. Надає бактеріолітичну дію, руйнує полісахариди мікробної клітини, пригнічує ріст грампозитивних бактерій, стимулює неспецифічну реактивність організму, має протизапальну і муколітичну дію.

Нормофлор – кишковий фітосорбент (коріння лепехи, трава звіробою, зніту, лист подорожника, трава пустирника, яблучний пектин).

Останнім часом стали випускати синбіотики. Це комплекс засобів з пробіотичними речовинами з метою створення нових лікарських засобів, в яких живі мікроорганізми поєднуються з субстратами, стимулюючими їх зростання.

РОЗДІЛ 9.

ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ І СТАНДАРТИЗАЦІЯ ВІТАМІНІВ

9.1. Класифікація вітамінів. Вітаміни, одержувані методами мікробіологічного синтезу

Серед біологічно активних речовин, необхідних для нормального розвитку живого організму, одне з перших місць займають низькомолекулярні органічні сполуки – *вітаміни*.

Важливе значення вітамінів пояснюється тим, що вони в якості активних груп входять до складу каталітичних ферментів, які слугують каталізаторами багатьох обмінних процесів. Наприклад, до складу простетичної групи кокарбоксілази входить тіамін (В1), коензимом ряду окислювально-відновних ферментів є рибофлавін (В2), в реакціях переамінування бере участь піридоксин (В6).

Встановлено, що організм людини і тварин не здатний до синтезу вітамінів, тоді як рослини при нормальних умовах розвитку повністю забезпечують себе всіма вітамінами (крім В12). Людина задовольняє потреби у вітамінах за рахунок надходження їх з їжею або за рахунок їх синтезу мікрофлорою шлунково-кишкового тракту.

Нестачу вітамінів людина заповнює шляхом прийому комплексу вітамінів, які випускаються в різному поєднанні. У світі існує 40 великих промислових виробників вітамінів. Провідне місце серед них займає швейцарський концерн Hoffman La Roche, що випускає 50-70% всіх вітамінів.

Класифікація вітамінів

Найбільш поширеним способом класифікації вітамінів є їх поділ на водо- і жиророзчинні. Однак, існують і інші способи класифікації: за хімічною будовою, за

фармакологічною активністю, літерна класифікація тощо.

I. жиророзчинні:

1) Вітамін А (антиксерофтальмічний); ретинол; β -каротин;

2) Вітамін D (антирахітичний); кальциферол;

3) Вітамін Е (антистерильний); токоферол;

4) Вітамін К (антигеморагічний); нафтохінони.

II. водорозчинні:

1) Вітамін В₁ (антиневритний); тіамін;

2) Вітамін В₂ (вітамін росту); рибофлавін;

3) Вітамін В₆ (антидерматитний); піридоксин;

4) Вітамін В₁₂ (антианемічний); цианокобаламін;

5) Вітамін РР (антипелагрічний, ніацин); нікотинамід;

6) Вітамін В₃ (антианемічний); фолієва кислота;

7) вітамін В₃ (антидерматитний); пантотенова кислота;

8) Вітамін Н (антисеборейний); біотин;

9) Вітамін С (антискорбутний); аскорбінова кислота;

10) Вітамін Р (капіляроукріплюючий); рутин.

III. Вітаміноподібні речовини:

Холін, ліпоєва кислота, вітамін В₁₅ (пангамова кислота), оротова кислота, інозит, убіхінон, параамінобензойна кислота, карнітин, ліолева і леноленова кислоти, вітамін U (протівирозковий фактор).

Мікробіологічними способом можна отримати практично всі вітаміни, але економічно більш вигідно їх виділяти з природних джерел або синтезувати хімічним шляхом. Проте, отримувати складні за будовою вітаміни простіше за допомогою мікроорганізмів. Це вітаміни В₂, В₁₂, D₂, β -каротин, біотин.

У медичній практиці в якості самостійного лікарського

засобу застосовується вітамін B_{12} (ціанокобаламін), який у вільному стані і в складі коферментів забезпечує кровотворну функцію організму, а саме дозрівання еритроцитів. Вітамін B_{12} є ефективним протианемічним препаратом. Його застосовують для лікування злоякісного недокрів'я, залізодефіцитних анемій, також його призначають при лікуванні променевої хвороби, захворюваннях печінки, хвороби Дауна, дитячому церебральному паралічі.

Для медичних цілей субстанцію вітаміну B_{12} отримують у вигляді кристалічного темно-червоного порошку, що містить не менше 99% основної речовини.

Цю субстанцію використовують для отримання різних лікарських форм, з яких найбільш широке застосування знаходить ціанокобаламін у фізіологічному розчині хлориду натрію для ін'єкцій і таблетки, що містять ціанокобаламін та фолієву кислоту.

9.2. Технологія отримання, виділення і стандартизація вітаміну B_{12}

Вітамін B_{12} – перша органометалева сполука, виділена з біологічної системи. З органічних сполук він має найбільш складну будову. Його складна формула (структура) була розшифрована в 1955 році. Молекула вітаміну B_{12} складається з двох частин:

- *кобальтомісткої* (порфіріноподібної);
- *нуклеотидної*, містить 5,6-диметилбензімідазол.

Характерною особливістю *кобальтомісткої* (порфіріноподібної) частини є наявність атома кобальту і ціаногрупи ($R-CN$). Ця частина молекули вітаміну B_{12} складається також з чотирьох азотистих гетероциклів типу піролу, до яких приєднані однакові замісники: амідни оцтової і пропіонової кислот.

Особливості мікробіологічного синтезу вітамінів на прикладі вітаміну B₁₂

У природі вітамін B₁₂ синтезують багато мікроорганізмів: оцтовокислі та пропіоновокислі бактерії, метаногени, бактерії, гриби. Промислове значення мають представники роду *Propionibacterium*, природні штами якого утворюють 5 - 8,5 мг/л ціанокобаламіна, а отриманий штучний мутант *P. shermanii* здатний накопичувати до 58 мг/л вітаміну B₁₂. Також в промисловості використовують штами *Pseudomonas denitrificans*.

Атом кобальту в структурі ціанокобаламіна має два ліганди – верхній і нижній. Верхнім лігандом є ціаногрупи (рис. 9.2).

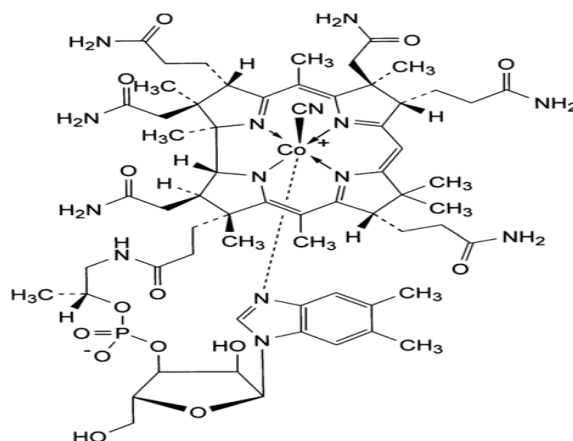


Рис. 9.2 Хімічна формула ціанокобаламіна

Нижній ліганд кобальта представлений клеотидним ядром, що складається з нуклеотидної основи 5,6-диметилбензimidазола (5,6-ДМБ), пов'язаного з рибозой глікозидним зв'язком. Нуклеотидне ядро з'єднується з кобальтом через азот основи, а з коріновим кільцем через амінопропанольний мостик. Поряд з вітаміном B₁₂ можуть утворюватися його похідні. Вони характеризуються тим, що в нуклеотидній частині молекули замість 5,6-ДМБ міститься аденін або метиладенін похідні. Вони не мають біологічної активності для людини і тварин, отже, є псевдовітамінами.

Виробництво вітаміну B_{12} засноване на культивуванні пропіоновокислих бактерій. Як продуцента вітаміну B_{12} використовують *Propionibacterium shermanii*. Перевага отримання вітаміну B_{12} пропіоновокислими бактеріями полягає в тому, що вони синтезують істинний вітамін B_{12} (до 58 мг/л).

Як джерело вуглецю в складі живильного середовища використовують глюкозу. Встановлено, що концентрація глюкози в процесі вирощування бактерій повинна підтримуватися на рівні 1,0 – 1,5%, що здійснюється шляхом постійної подачі стерильного 40% розчину глюкози протягом всього процесу ферментації.

Важливе значення має азотне живлення. Як джерело органічного азоту до складу середовища вводять кукурудзяний екстракт в концентрації 2%.

Також до складу середовища вводять неорганічне джерело азоту – $(NH_4)_2SO_4$. Встановлено, що катіон амонію бере участь в реакціях амідування оцтової і пропіонової кислот.

Суттєве значення для синтезу вітаміну B_{12} має певна концентрація в середовищі солей Co^{2+} . Тому додатково до складу середовища вводять хлористий кобальт – $CoCl_2$. При цьому необхідно враховувати, що солі кобальту належать до досить ефективних бактерицидних речовин. Тому концентрацію цієї солі підбирають таку, щоб вона не гальмувала зростання продуцента, проте стимулювала синтез вітаміну. Ця величина складає близько 0,0005%.

Для біосинтезу вітаміну B_{12} до складу живильного середовища додають попередник – 5,6-диметилбензімідазол (5,6-ДМБ), який входить до складу нуклеотидної частини молекули вітаміну. Наявність в середовищі цієї сполуки сприяє направленому синтезу істинного вітаміну, знижуючи до мінімуму або зовсім виключаючи наявність в мікробній масі псевдоформ.

Культура *P. shermanii* в процесі ферментації утворює аналоги вітаміну B_{12} – так званий кофактор В – вітамін без нуклеотидної частини або псевдовітамін, де нуклеотидна частина представлена аденіном. Ця форма біологічною активністю не володіє. Встановлено, що кращі результати накопичення істинного вітаміну B_{12} спостерігали в тому випадку, якщо 5,6-ДМБ додавали на 4 добу ферментації, тобто за добу до закінчення процесу. За цей час 5,6-ДМБ витісняє всі неактивні сполуки, перетворюючи псевдоформи в істинний вітамін B_{12} .

Однією з істотних позитивних сторін процесу ферментації вітаміну B_{12} є відсутність аерації.

Показано, що найбільшу кількість вітаміну B_{12} утворюють при культивуванні бактерій в анаеробних умовах. У зв'язку з цим перші 4 доби процес ферментації ведуть в строго анаеробних умовах, лише перемішуючи культуральну рідину через кожні 12 годин (мішалку включають на 2-3 хвилини). На останню добу процес ферментації вже ведуть в аеробних умовах, так як вміщення нуклеотидної частини в молекулу вітаміну відбувається вже в присутності кисню.

Оптимальна температура для росту пропіоновокислих бактерій і синтезу ними вітаміну B_{12} є 28-30°C.

Технологія виділення та очищення вітаміну B_{12}

Ще однією особливістю біосинтезу вітаміну B_{12} є те, що його накопичення відбувається всередині клітини, тому виділення і очищення цільового продукту ведуться за наступною схемою:

- 1) відділення клітинної біомаси від культуральної рідини шляхом центрифугування;
- 2) кислотний гідроліз біомаси (HCl, до pH=4,3-4,6, t=80-90°C);
- 3) сорбція вітаміну з гідролізату на карбоксильному катіоніті СГ-1 в динамічних умовах (розчин подається

зверху вниз) і десорбція аміачно-боратним буферним розчином;

4) адсорбція вітаміну на активованому вугіллі (очищення від домішок);

5) осадження білка додаванням алюмокалієвих квасців;

6) ціанування (обробка ціаністим натрієм при $\text{pH}=6$);

7) десорбція вітаміну з активованого вугілля ізопропіловим спиртом при температурі 80°C і $\text{pH}=5,0-6,0$;

8) упарювання ізопропілового елюата (під вакуумом при температурі $70-80^{\circ}\text{C}$);

9) отримання резорцинового комплексу;

10) розкладання резорцинового комплексу гарячою очищеною водою (при температурі 80°C);

11) кристалізація і перекристалізація вітаміну ацетоном;

12) сушіння кристалів вітаміну.

Вихід продукту при такому способі очищення становить 55% (з переробкою маткових розчинів) від вмісту в біомасі. Цей спосіб виділення та очищення має ряд *недоліків*: низький вихід кінцевого продукту, використання регенерується дорогою сировиною разового використання (активоване вугілля, резорцин), велика витрата органічних розчинників, використання ручної праці при багаторазовому завантаженні і вивантаженні активованого вугілля тощо.

Для їх усунення розроблено технологію виділення та очищення вітаміну B_{12} , що дозволяє збільшити вихід кінцевого продукту більш ніж на 20% і поліпшити якість лікарських засобів. Метод містить тонке хроматографічне очищення вітаміну на мінеральному молекулярному сорбенті типу «Силохром» або «Силікагель», з подальшим концентруванням на органічному молекулярному сорбенті – «Полісорб». Використовувані сорбенти можна

регенерувати.

Стандартизація вітаміну B12

Опис. Вітамін B12 це – голчасті кристали темно-червоного кольору, який обумовлений наявністю в них кобальту. Вітамін розчинний у воді і полярних розчинниках (наприклад, 96% спирті), не розчиняється в бензолі, хлороформі, діетиловому (наркозному) ефірі, безводному ацетоні.

Ідентифікація. Спектрофотометрія в УФ і видимій областях. Максимуми поглинання при 278; 361 і 547-559 нм. Розраховують також відносини оптичної щільності.

Супутні домішки визначають методом ВЕРХ.

Кількісне визначення проводять спектрофотометрично. Для цього субстанцію розчиняють у воді. Вимірюють поглинання при довжині хвилі 361 нм. Питомий показник поглинання дорівнює 207нм.

9.3. Технологія отримання і стандартизація вітаміну B₂

Назва вітаміну B₂ (рибофлавін) походить від цукру рибози, що входить до складу молекули вітаміну у вигляді багатоатомного спирту D-рибіта (рис. 9.3.). Він широко поширений в природі і в значних кількостях синтезується рослинами, дріжджами, грибами, бактеріями.

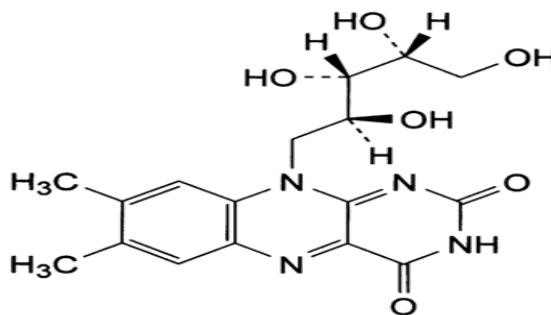


Рис. 9.3 Хімічна формула D-рибіта

Тварини, що не синтезують цей вітамін, повинні отримувати його в складі комбікормів, оскільки при його дефіциті в організмі порушуються процеси білкового обміну, сповільнюється зростання. Лікарські засоби, що містять рибофлавін (таблетки, розчин для ін'єкцій), використовують в медицині для лікування ряду захворювань (шкірні хвороби, загоєння ран, захворювання очей, порушення з боку шлунково-кишкового тракту, анемії, цироз печінки, діабет), а в тваринництві – в якості добавки в корми, а також в харчовій промисловості як барвник. Мікроорганізми синтезують рибофлавін і дві його коферментні форми – флавінаденінуклеотид (ФАД) і флавінмононуклеотид (ФМН).

Технологія отримання вітаміну B₂

Продуцентами вітаміну B₂ є:

- бактерії (*Brevibacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamaticus*);
- дріжджі (*Pichia pastoris*);
- мікроскопічні гриби (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*);
- цвілеві гриби (*Aspergillus niger*);
- дріжджі (*Candida guilliermondii*, *C. flaveri*);
- актиноміцети (*Nocardia eritropolis*).

Промислове отримання рибофлавіну здійснюють хімічним, мікробіологічним та комбінованим синтезом. Комбінованим синтезом утворена мікроорганізмами рибоза хімічно трансформується в B₂.

Для медичних цілей мікробіологічний рибофлавін отримують на основі гриба *Aspergillus*. Для високих виходів вітаміну (до 7 г/л) використовують вдосконалені штами і оптимізовані середовища, що містять: кукурудзяний екстракт – 2,25%; пептони – 3,5%; соєву олію – 4,5% і стимулятори (пептони, гліцин). Використовують активний інокулят, яким засівають стерильне середовище.

Ферментацію проводять протягом 7 діб при 28°C і хорошій аерації. Початкове значення рН становить близько 7,0, протягом ферментації у зв'язку з виділенням кислот середовище підкисляється до рН 4,0-4,5. Після використання вуглецевого субстрату продуцент починає утилізувати кислоти, рН підвищується, і потім починається утворення вітаміну В₂. При цьому кристали рибофлавіну накопичуються в гіфах і поза міцелієм. На постферментаційній стадії для виділення вітаміну міцелій нагрівають протягом 1 год при 120°C. Очищення проводять перекристалізацією.

У деяких країнах для отримання кормових препаратів вітаміну В₂ використовують досить простий спосіб, заснований на вирощуванні мікроскопічного гриба *Eremothecium ashbyii* в глибинній культурі протягом 80-84 год при 28-30°C у середовищі з глюкозою або мальтозою (2,5%), джерелом азоту у вигляді NH₄NO₃ і карбонатом кальцію (0,5%). Вихід рибофлавіну становить 1250 мкг/мл.

Культуральна рідина концентрується у вакуумному випарнику до змісту сухих речовин 30-40% і висушується в розпилювальній сушарці. Товарна форма продукту – порошок із вмістом рибофлавіну не менше 10 мг/г і 20% сирого протеїну. У препараті присутні також нікотинова кислота і вітаміни В₁, В₃, В₆ і В₁₂.

При використанні штаму *Bacillus subtilis*, отриманого генноінженерним методом, вихід рибофлавіну становить 4 г/л за 35 діб ферментації. Бактерії вирощують у поживних середовищах наступного складу: джерело вуглецю (цукориди, органічні кислоти), джерело азоту ((NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, (NH₄)₃PO₄, гідролізат соєвих бобів), вітамін В₁, нуклеїнові кислоти або дріжджовий екстракт, солі кальцію, магнію, заліза і марганцю. Ферментацію здійснюють при 30-45°C при рН=5-8 в умовах гарної аерації.

Стандартизація вітаміну B₂

Опис. Рибофлавін – це жовтий або оранжево-жовтий кристалічний порошок (володіє поліморфізмом), малорозчинний у воді, практично не розчинний в 96% спирті. Розчини нестійкі при зберіганні на світлі, особливо разом з лугом. У формі натрієвої солі розчинний у воді.

Для ідентифікації використовують питомн оптичне обертання (від 115 до – 135 для рибофлавіну; від +38 до +48 для його солі). Ідентифікацію також проводять методом спектрофотометрії. Максимуми поглинання знаходяться при довжинах хвиль 223, 267, 373 і 444 нм.

Супутні домішки визначають методом ВЕРХ.

Кількісне визначення проводять при 444 нм, питомий показник поглинання 328 нм. Для розчинення використовують слаболужне середовище і колби темного скла.

9.4. Технологія отримання і стандартизація ергостерину і вітамінів групи D

Ергостерин (ергоста-5,7,22-трієн-3β-ол) є вихідним продуктом при виробництві вітаміну D₂ і кормових препаратів дріжджів, збагачених цим вітаміном. Вітамін D₂ (ергокальциферол) утворюється при опроміненні ультрафіолетом ергостерину, який в значних кількостях синтезують бурі водорості, дріжджі, цвілеві гриби (рис. 9.4). Найбільш активні продуценти ергостерину – *Saccharomyces*, *Rhodotoryla*, *Candida*.

У промислових масштабах ергостерин утворюється при культивуванні дріжджів і міцеліальних грибів у середовищах, що містять надлишок цукрів і недостатньо азоту, при високій температурі і хорошій аерації. Більш інтенсивно ергостерин утворюють дріжджі роду *Candida* у середовищах з вуглеводнями. Кристалічну субстанцію

вітаміну D₂ отримують при культивуванні цвілевих грибів (*Penicillium*, *Aspergillus*).

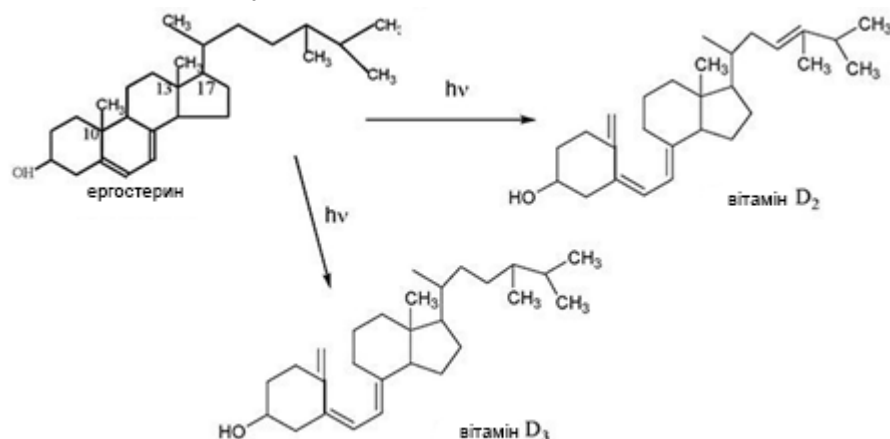


Рис. 9.4. Перетворення ергостерину під дією УФ-випромінювання

Технологія отримання ергокальциферолу

Отримання ергокальциферолу у виробничих умовах можна поділити на такі етапи: розмноження вихідної культури і накопичення інокулята, ферментація, сепарація клітин, опромінення ультрафіолетовими променями, висушування і упаковка цільового продукту.

Так, стосовно дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*), інокулят отримують у середовищах, що забезпечують повноцінний розвиток клітин, після чого основне середовище з ацетатом (активатором біосинтезу стеринів), яке збагачене джерелом вуглецю і містить знижену кількість азоту, засівають порівняно великою кількістю інокулята.

Ферментацію дріжджів проводять при максимальній для конкретного штаму температурі і вираженій аерації (2% O₂ в газовій фазі). Через три-чотири доби клітини відокремлюють і піддають вакуум-висушуванню. Потім сухі дріжджі опромінують ультрафіолетовими променями (довжина хвилі 280-300 нм). Опромінені сухі дріжджі застосовують у тваринництві; у промисловості їх випускають під назвою «кормові гідролізні дріжджі, збагачені вітаміном

D₂».

У разі отримання кристалічного вітаміну D₂ клітини продуцента гідролізують соляною кислотою при 110°C, потім температуру знижують до 75-78°C і додають етанол. Суміш фільтрують при 10-15°C. Масу, що залишилася після фільтрації, промивають водою, висушують, подрібнюють, нагрівають до 78°C і двічі обробляють потрійним об'ємом етанолу. Спиртові екстракти об'єднують і упарюють до 70% вмісту сухих речовин.

Отриманий «Ліпідний концентрат» обробляють розчином натрію гідроксиду. Ергокальциферол кристалізують з неомилених фракції концентрату при 0°C. Його можна очистити повторною кристалізацією. Кристали висушують, розчиняють в етиловому ефірі, опромінюють УФ-променями, ефір відганяють, розчин вітаміну D₂ концентрують і кристалізують.

У вигляді масляного розчину застосовують для профілактики і лікування рахіту і рахітоподібних захворювань у дітей. У комплексній терапії застосовують при остеопатії різного генезу, у хворих з ортопедичною патологією (остеопорозі) або при уповільненій консолідації переломів.

РОЗДІЛ 10.

ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ І СТАНДАРТИЗАЦІЯ АМІНОКИСЛОТ, ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ І СПИРТІВ

10.1. Загальна характеристика амінокислот. Замінні і незамінні амінокислоти

Амінокислоти – це органічні сполуки, що містять одночасно основну амінну групу (NH_2 -) і кислотну карбоксильну (COOH -). За обсягом виробництва серед сполук, вироблених біотехнологічними способами, амінокислоти стоять на першому місці, а за вартістю – на другому, поступаючись в цьому тільки антибіотикам.

За значенням для організму амінокислоти поділяють на замінні і незамінні. До незамінних належать ті амінокислоти, які не синтезуються в людському і/або тваринному організмі, вони повинні бути принесені з їжею або кормом (таблиця). Недостатня кількість кожної з них у раціоні призводить до порушення обміну, уповільнення росту і розвитку.

Амінокислоти знаходять широке застосування в наступних галузях:

1) у харчовій промисловості використовують близько 30% вироблених амінокислот (цистеїн запобігає пригоранню їжі, покращує якість хліба при випічці, підсилює запах їжі; гліцин, що володіє освіжаючим, солодкуватим смаком, використовується при виробництві напоїв; глутамінова кислота – для посилення смаку та консервування їжі);

2) у медичній і фармацевтичній практиці амінокислоти використовують для терапії післяопераційних хворих, виразкової хвороби, захворювань печінки, психічних захворювань (серотонін, аспарагін, валін,

гістидин, гліцин);

3) у *хімічній промисловості* амінокислоти використовують як попередники у виробництві детергентів, поліамінокислот, поліуретану;

4) у *сільському господарстві* – для отримання кормових добавок.

У медицині використовують *аргінін*. У поєднанні з аспартатом і глутаматом він допомагає при захворюваннях печінки. Під дією аргініну підвищується активність імунної системи у післяопераційних пацієнтів.

К-На-аспартат знімає втому і призначається для полегшення болю в серці, його рекомендують при захворюваннях печінки і діабеті.

Цистеїн захищає SH-ферменти в печінці та інших тканинах від окислення і надає детоксикуючу дію. Він проявляє також захисну дію від пошкоджень, викликаних опроміненням.

Триптофан – антидепресант, його використовують при лікуванні алкоголізму і безсонні.

Гліцин є регулятором обміну речовин, нормалізує процеси збудження і гальмування в центральній нервовій системі, має антистресовий ефект, підвищує розумову працездатність.

Фенілаланін ефективний при хворобі Паркінсона.

10.2. Способи промислового добування амінокислот

У багатьох мікроорганізмів виявляється здатність акумулювати амінокислоту у живильному середовищі.

Як продуцентів амінокислот, зазвичай використовують:

1) грампозитивні безпорові бактерії роду *Corynebacterium*, *Brevibacterium* і *Micrococcus*;

2) спороутворюючі грампозитивні палички роду

Bacillus, Microbacterium;

3) грамнегативні палички роду *Enterobacter, Escherichia*.

Для виробництва амінокислот бактерії почали використовувати на початку 50-х років, водночас штами постійно покращували генетичними методами, виділяючи мутанти зі зміненими регуляторними властивостям – ауксотрофні мікроорганізми.

Основною метою створення ауксотрофних організмів є можливість впливу на синтез первинних метаболітів (амінокислоти належать до первинних метаболічних мікроорганізмів), підвищуючи цим вихід цільового продукту.

Для цього можна або стимулювати споживання субстрату і виділення амінокислот у середовище, або «придушити» побічні реакції і процеси деградації амінокислот.

У промислових масштабах амінокислоти отримують декількома способами:

- 1) гідролізом природної білкововмісної сировини;
- 2) хімічним синтезом;
- 3) мікробіологічним синтезом;
- 4) біотрансформацією попередників амінокислот за допомогою мікроорганізмів або виділених з них ферментів (хімічно-мікробіологічний метод).

За обсягом виробництва хімічний синтез амінокислот знаходиться на другому місці. Основними *недоліками* є отримання рацемічної сполуки амінокислот, що складається з D- і L-ізомерів, тоді як біологічну активність в організмі людини і тварин мають лише L-ізомери, а D-ізомери амінокислот не переробляються ферментними системами. Крім того, деякі з них токсичні для людини і тварин.

Виробництво амінокислот *хімічним синтезом* пов'язано

з використанням дорогого устаткування і нерідко агресивних токсичних сполук в якості вихідної сировини. Процес зазвичай проходить при високій температурі, вимагає дорогих каталізаторів, і, як будь-яке хімічне виробництво, супроводжується утворенням інших продуктів, забруднює навколишнє середовище, небезпечне для обслуговуючого персоналу.

Отримання амінокислот внаслідок *гідролізу білків* менш вигідне економічно, тому й не набуло широкого поширення.

Найбільш перспективним і економічно вигідним є *мікробіологічний синтез* амінокислот. Більше 60% всіх вироблених високоочищених амінокислот отримують цим способом. Головна його *перевага* полягає в можливості отримання амінокислот на основі відновлюваної сировини, за такої умови утворюються тільки L-ізомери.

В основі культивування мікроорганізмів для отримання чистих субстанцій амінокислот застосовують промислові технології, що включають одно- і двоступеневий біологічний синтез.

При одноступеневому синтезі в промислових культиваторах вирощують ауксотрофні регуляторні мутанти, які є надпродуцентами амінокислот. Після завершення робочого циклу вирощування культуральну рідину відділяють від клітин мікроорганізмів, згущують і отримують з неї готовий продукт з високою концентрацією синтезованої амінокислоти.

У процесі *двоступеневого синтезу* амінокислот (рис. 10.1) спочатку отримують її попередник (часто дешевшим хімічним синтезом), а потім за допомогою ферментів, що виробляються мікроорганізмами, перетворюють попередник в амінокислоту, за такої умови утворюється тільки L-ізомери.

Як джерело ферменту використовують суспензію клітин мікроорганізмів або отриманий після руйнування цих

клітин ферментний розчин. Цим методом можна виробляти практично всі амінокислоти, але через подорожання і складність отримання кислот-попередників цей метод зазвичай не вигідний економічно, у більшості випадків гірший за метод прямого мікробіологічного синтезу.



Рис.10.1. Схема двоступеневого біосинтезу амінокислот

10.3 Мікробіологічний синтез лізину

Лізин – аліфатична незамінна амінокислота. Лізин належить до сполук, які самостійно не виробляються живими організмами, а отримуються в готовому вигляді для синтезу власних структурних і функціональних білків.

Джерелом лізину є мікроорганізми і рослини. Із мікроорганізмів лізин синтезують бактерії, актиноміцети, синьо-зелені водорості. На початку 50-х років японські вчені С. Кіносіта, К. Накаяма і С. Кітада отримали мутантні штами бактерій, здатні до надсинтезу лізину. Спочатку максимальна концентрація його досягала 20 г в 1 л культуральної рідини. Зараз отримані штами, здатні виробляти понад 60 г/л амінокислоти.

Встановлено, що лізин в організмі є не тільки структурним елементом білка. Ця амінокислота виконує і

інші важливі біохімічні функції – попереджує карнітин і оксилізін, сприяє секреції травних ферментів і транспорту кальцію і стронцію в клітини, покращує загальний азотний баланс в організмі.

Найбільш дешевим і освоєним способом отримання лізину є *мікробіологічний метод*. Вперше таке виробництво налагоджено в Японії в середині 50-х років; потім в Голландії і США. В СРСР лізінова промисловість започаткувалася в 70 – х роках ХХ ст. Основою виробництва є технологія з використання одноступеневого мікробіологічного синтезу, яка враховує промислове культивування ауксотрофних мутантів бактерій з роду *Corynebacterium*, здатних до синтезу лізину, а також хімічно-ензиматичний спосіб (рис. 10.2).

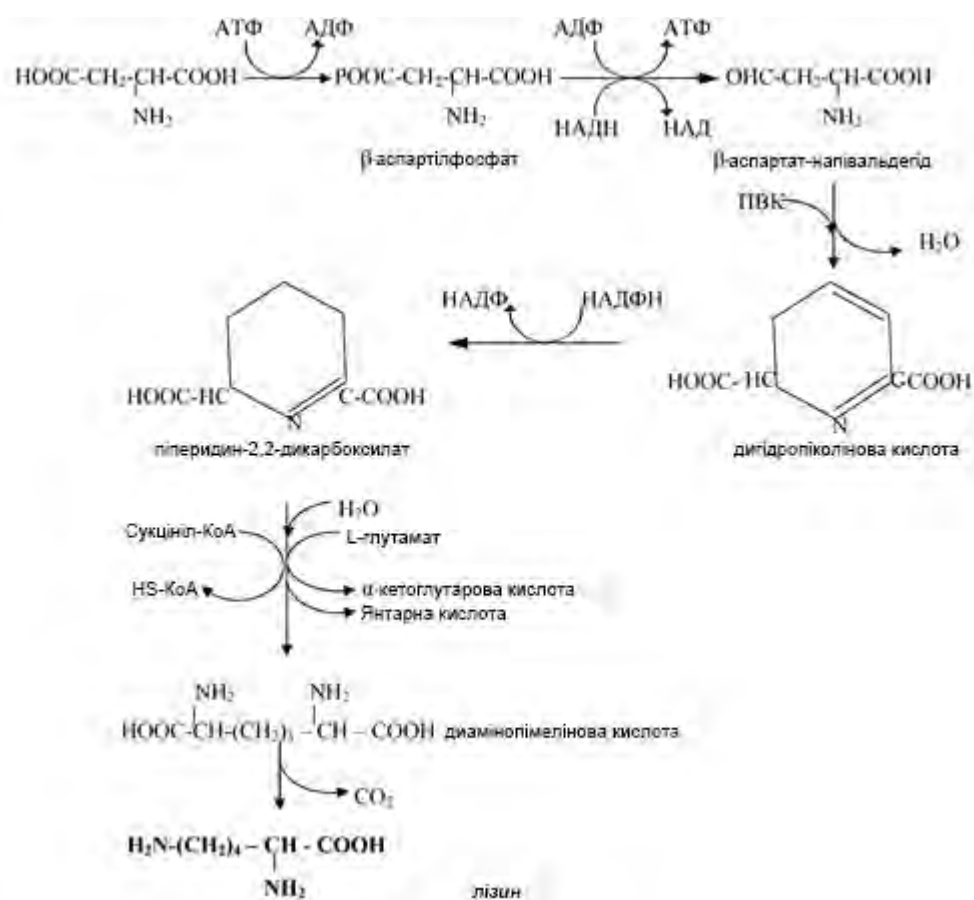


Рис. 10.2. Схема синтезу лізину

Одноступеневий синтез

У клітинах бактерій лізин синтезується з аспарагінової кислоти за допомогою проміжних етапів, пов'язаних з утворенням альдегіду аспарагінової кислоти. Альдегід аспарагінової кислоти є також одним з попередників у синтезі амінокислот – треоніну, метіоніну і ізолейцину.

Процес синтезу амінокислоти починається фосфорилюванням аспарагінової кислоти разом з алостеричним ферментом аспартаткінази, активність якого знижується під час дії двох амінокислот – лізину і треоніну (якщо вони накопичуються в клітинах бактерій в надлишковій концентрації). Якщо знизити концентрацію однієї з амінокислот, то синтез іншої здійснюватиметься навіть за умови, якщо вона накопичується досить концентровано.

У процесі приготування живильного середовища в якості джерела вуглецю використовують сполуки, що містять оцтову кислоту і бурякову мелясу. Невеликі добавки цукру в середовище (близько 1%) підвищують вихід лізину на 30 - 50%; в якості джерела азоту використовують солі амонію, сечовину; як джерело біологічно активних речовин використовують кукурудзяний екстракт (1,2-1,5% за вмістом сухих речовин), гідролізат дріжджів.

Крім дефіцитних амінокислот, які не синтезуються клітинами мутантів, у живильне середовище також додають необхідні для життєдіяльності мікроорганізмів мікро- і макроелементи, вітаміни (наприклад, біотин).

В одному літрі живильного середовища повинно міститися: 200 мг метіоніну, 800 мг треоніну, 15-20 мкг біотину. Оптимальне співвідношення вуглецю і азоту в середовищі 11:1.

У процесі культивування мікроорганізмів забезпечується подача стерильного повітря за допомогою

спеціальних турбінних мішалок, для запобігання спінювання субстрату і клітинної суспензії у середовище культивування додають піногасники.

Посівний матеріал спочатку вирощують у посівних апаратах при 28-32°C, рН=7,0-7,2 протягом 18-24 год, отримана суспензія клітин подається у виробничі ферментери, в яких підтримується постійний режим аерації, тиск 20-30 кПа, безперервне перемішування, контроль за всіма параметрами середовища.

Культивування здійснюється тільки в стерильній глибинній аеробній періодичній культурі. Час ферментації становить 55-72 год. Накопичення в культуральній рідині лізину починається через 25-30 год після початку вирощування промислової культури і до кінця ферментації досягає 40-50 г/л.

Культуральну рідину відділяють від культури клітин продуцента фільтруванням і використовують для отримання лізину.

Для отримання очищеної сполуки лізину культуральну рідину після фільтрування підкисляють соляною кислотою до рН 1,6-2. Розчин монохлоргідрату лізину, утворений в результаті взаємодії з соляною кислотою, направляють до колонки з катіонітом, де відбувається сорбція амінокислоти і відділення її від культуральної рідини.

Потім проводять десорбцію амінокислоти елюювання 0,5-5% розчином аміаку. Елюат випарюють під вакуумом при 60°C до концентрації 30-50%, після цього підкислений соляною кислотою розчин монохлоргідрату висушують.

Шляхом перекристалізації отриманої солі можна отримати речовину із вмістом монохлоргідрату лізину в кількості 97-98%.

Хіміко-ензиматичний спосіб отримання лізину

У деяких країнах, наприклад, Японії, США тощо, для отримання лізину застосовують хіміко-ензиматичний метод,

що дозволяє створити високоефективні технології, засновані на ферментативній конверсії α -аміно- ϵ -капролактаму в лізин, який одержують хімічним методом з циклогексану:

Циклогексан – D-, L-капролактаму – L-лізин

У результаті хімічного синтезу утворюється рацемічна сполука D- і L-капролактаму, яка направляється в реактор з гідролазою α -аміно- ϵ -капролактаму, який каталізує перетворення L-капролактаму в L-лізин. D-ізомер капролактаму потім перетворюється в L-ізомер за допомогою специфічної рацемази. За допомогою такої технології отримання лізину його вміст в реакційній сполуці досягає понад 150 г/л.

Продуценти гідролази α -аміно- ϵ -капролактаму - деякі штами дріжджів з роду *Cryptococcus*, *Candida*, *Trichosporon*, які вирощують в лужному оптимізованій для синтезу ферменту живильному середовищі, що містить активатори - іони магнію, марганцю і цинку. Для ферментативної реакції перетворення капролактаму в лізин може використовуватися клітинна суспензія дріжджових клітин з активним ферментом, клітинний екстракт (після руйнування і відділення клітин) або очищений фермент. Продуценти рацемази – бактерії *Achromobacter*, *Flavobacterium* і ін.

10.4 Мікробіологічний синтез триптофану

Триптофан, поряд з іншими ароматичними амінокислотами, фенілаланіном і тирозином, останнім часом застосовується і різних галузях. Відсутність або дефіцит триптофану в організмі призводить до багатьох важких захворювань (діабет, туберкульоз, пелагра).

Для промислового отримання триптофану розроблені

технології одноступеневого синтезу, використовуючи ауксотрофні мутанти бактерій *Bacillus subtilis* з порушеним метаболізмом природних амінокислот. Також двоступеневий синтез, що враховує спочатку отримання попередника триптофану, а потім його ферментативне перетворення в кінцевий продукт – триптофан.

У бактерій і у інших організмів триптофан утворюється з еритроза-4 фосфату і фосфоенолпіровиноградної кислоти внаслідок послідовних реакцій, попередником триптофану є антранілова кислота (рис.10.3). Синтез алостеричного триптофану супроводжується зниження кінцевими продуктами, які діють на ферменти, що каталізують початкові перетворення, пов'язані з утворенням хоризмової кислоти.

Для усунення метаболічних реакцій шляхом утворення триптофану необхідно блокувати перетворення хоризмової кислоти в префенову, це можна досягнути дією мутагенних чинників.

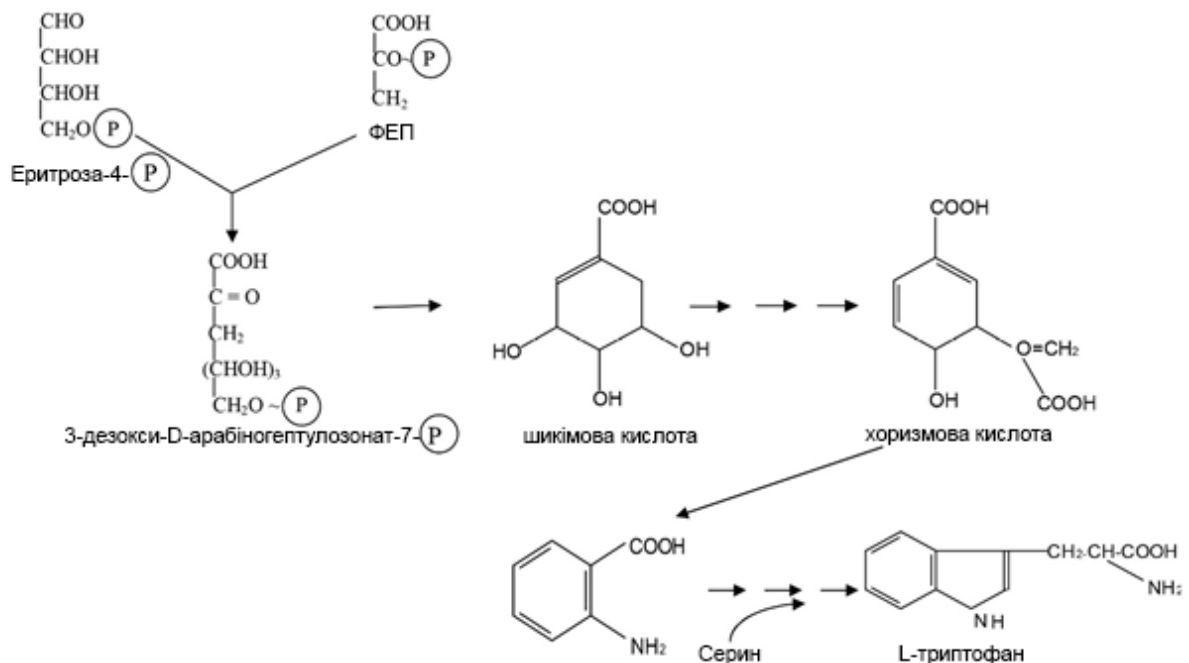


Рис. 10.3 Схема синтезу триптофану

Всі технологічні процеси організовані за тією ж схемою, що і отримання лізину. Ферментація триває 48 год при

37-38°C, pH=7,0-7,2, при інтенсивній аерації, концентрація триптофану в культуральній рідині досягає 10 г/л.

Після відділення культуральної рідини її піддають додатковому очищенню. Спочатку її підкисляють соляною кислотою до pH=1,0 і центрифугуванням відокремлюють від утвореного осаду. Далі центрифугат, що містить триптофан, пропускають через катіонообмінні колонки, внаслідок чого відбувається зв'язування амінокислоти і її відділення від культуральної рідини.

Після промивання колонок виробляють десорбцію триптофану 5% розчином аміаку в сполуці ізопропанола і води. Елюат направляють на вакуум-випарювальний апарат, після цього амінокислоту кристалізують при 4-8°C.

Виділену в кристалічному вигляді сіль триптофану промивають етанолом і висушують під вакуумом при 60°C.

Висушений кристалічний порошок містить не менше 99% триптофану у вигляді гідрохлориду. Осад після відділення культуральної рідини містить клітини культур бактерій, тому його висушують і використовують як високобілкову кормову добавку.

Хіміко-ензиматичний спосіб отримання триптофану

Розроблено метод біотрансформації антранілової кислоти в L-триптофан ферментними системами клітин дріжджів *Candida utilis*. Процес здійснюється при температурі 28-30°C; pH=7,5-8,0.

Спочатку методом хімічного синтезу отримують попередник триптофану – антранілову кислоту, яку потім зразом із ферментами мікробного походження перетворюють на триптофан.

Виробничий процес біохімічного перетворення антранілової кислоти в триптофан проводиться двоетапно.

На I етапі проводять нарощування біомаси дріжджів, що є продуцентами ферментів. Живильне середовище для

вирощування дріжджів готується з бурякової меляси, сечовини, мінеральних солей. Ферментація триває протягом 24 год при 30°C. Далі в ферментер починають вводити спиртовий 5% розчин антранілової кислоти і 50% розчин сечовини. Через 3-4 год після додавання антранілової кислоти в ферментер додатково додають вуглецевий субстрат – мелясу у вигляді 25% розчину.

На II етапі ферментації періодично роблять подачу антранілової кислоти і сечовини через кожні 6 год і розчину меляси – через кожні 12 год. Тривалість ферментації триває близько 120 год, а з урахуванням часу нарощування біомаси дріжджів – 144 год.

10.5. Препарати амінокислот

Тетракард (аргініногідрохлорид, лізіногідрохлорид, таурин, ацетилсаліцилова кислота) – у складі комплексної терапії стабільної стенокардії у пацієнтів без перенесеного інфаркту міокарда.

Аспаркам (калію і магнію аспартат) – застосовується при дефіциті калію і магнію в організмі, у складі комплексної терапії ішемічної хвороби серця, аритмії тощо.

Алкогро (треонін і піридоксин) – для поліпшення працездатності і уваги, для лікування абстинентного синдрому.

Лейаргунал (лейцин, аргініну гідрохлорид, інозин) – у складі комплексної терапії хронічного періодонтиту, у пацієнтів з клінікою затяжної пневмонії і хронічного бронхиту.

Аспаргіт (аргініну гідрохлорид і ацетилсаліцилова кислота) – антиагрегантна терапія і підвищення бажання до фізичного навантаження у пацієнтів зі стабільною стенокардією.

Триптофан – желатинові капсули, застосовують для лікування розладів сну, у комплексній терапії для лікування алкогольної та наркотичної залежності.

Громецин – таблетки, застосовують у складі комплексної терапії функціональних і органічних захворювань нервової системи.

Лейцин – таблетки, застосовують у якості коректора амінокислотного дисбалансу у пацієнтів з онкологічними захворюваннями при проведенні специфічного лікування.

Тавамін (валін, лейцин, ізолейцин, таурин) – капсули для лікування захворювань печінки.

10.6. Отримання органічних кислот на прикладі лимонної кислоти

Органічні кислоти широко використовують у харчовій і фармацевтичній промисловостях, у техніці і як хімічну сировину. Окремі органічні кислоти (лимонну, яблучну) можна отримувати за допомогою екстракції з природної рослинної сировини; інші (оцтову, молочну) – під час органічного синтезу.

Більше 50 органічних кислот можна отримати за допомогою мікробіологічного синтезу. Біотехнологічні методи їх отримання нині детально розроблені. Ба більше, вважають, що органічні кислоти, отримані в результаті мікробіологічного синтезу, кращі для використання людиною, ніж синтетичні кислоти.

Для технічних потреб органічні кислоти одержують хімічним шляхом; застосовувані в харчовій і фармацевтичній промисловості – різними біологічними шляхами. Це виробництво лимонної, молочної, оцтової, ітаконової, пропіонової і глюконової органічних кислот (молочна і оцтові кислоти виробляють і хімічним шляхом).

Продуценти органічних кислот

Здатність продукувати ту чи іншу кислоту – поширена серед мікроорганізмів властивість.

Для виробничих культур використовують спеціально підібрати штами. Вони продукують цільову кислоту у вигляді монопродукта з високими виходами і ефективним засвоєнням вуглецевого субстрату. При багатьох виробництвах органічних кислот економічний коефіцієнт з вуглецю досягає понад 90%. Як продуцентів використовують бактеріальні, дріжджові і грибові культури (*Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*).

Органічні кислоти в системі мікробного метаболізму є продуктами деградації джерела енергії та вуглецю. Так, лимонна, ізолимонна, кетоглутарова, бурштинова, фумарова і яблучна кислоти – це проміжні продукти циклу трикарбонових кислот у більшості аеробних мікроорганізмів.

Отже, можливості отримання органічних кислот на основі метаболізму мікроорганізмів – великі. Для надсинтезу окремих кислот потрібні селективні, виключні умови. Накопичення органічних кислот не відбувається при збалансованому зростанні мікроорганізмів на повноцінному середовищі.

Оскільки, органічні кислоти – вихідний матеріал для синтезу інших макромолекул, вони стають проміжним продуктом в системі мікробного метаболізму. Надсинтез органічних кислот спостерігають при гальмуванні росту продуцента і блокуванні процесів біосинтезу, які вимагають наявності кислот в субстраті.

Більшість органічних кислот отримують, обмежуючи зростання клітин продуцентів, за допомогою дефіциту азоту або фосфору при надлишку вуглецю у субстраті. Тому мікробіологічні процеси отримання органічних кислот двоетапні:

- *на першому етапі* забезпечується збалансоване зростання при максимальному накопиченні біомаси та споживанні вуглецевого і енергетичного субстрату, а також обмеження біогена;

- *на другому* – відбувається уповільнення росту клітин. У результаті цього приріст біомаси припиняється і починається інтенсивне кислотоутворення.

Тривалість фази інтенсивного кислотоутворення визначається наявністю вуглецю у субстраті середовища. Важливою умовою кислотоутворення більшості органічних кислот (окрім молочної) є хороша аерація, а також величина рН середовища.

Способи ферментації в мікробіологічних процесах виробництва органічних кислот різноманітні. Серед них – поверхневі рідко- і твердофазні процеси, а також глибинні.

Останнім часом розроблені нові й ефективні біотехнології з використанням іммобілізованих цілих клітин і ферментів. Також різноманітні субстрати, які використовують у виробництві органічних кислот. Глюкозу і сахарозу, застосовувані на початку ХХ століття, замінюють більш доступними комплексними середовищами (меласою, гідролізним крохмалем); у 60-тих роках були розроблені нові процеси отримання органічних кислот на рідких парафінах нафти.

Отримання лимонної кислоти

Лимонна кислота ($\text{CH}_2\text{COOH}-\text{CONHCOOH}-\text{CH}_2\text{COOH}$) – триосновна оксикислота, широко поширена в плодах і ягодах. Її використовують у харчовій промисловості (для виробництва кондитерських виробів і напоїв), у фармацевтичній, хімічній і текстильній промисловостях.

Лимонна кислота була ідентифікована як продукт метаболізму цвілевих грибів 1893 року Вемером. Нині ця кислота займає перше місце серед всіх органічних кислот за

обсягами виробництва (понад 350 тис. т/г).

У мікроорганізмів синтез лимонної кислоти реалізується в циклі дикарбонових кислот і здійснюється в результаті конденсації щавлево-оцтової кислоти і оцтової кислоти, тобто утворення лимонної кислоти враховує реакції гліколізу і декілька реакцій циклу Кребса. Під час кожного циклу молекула щавлево-оцтової кислоти взаємодіє з оцтовою, утворюючи лимонну кислоту.

У промисловому виробництві лимонної кислоти в якості продуцента в основному використовують *Aspergillus niger*, але також застосовують і *A. wentii*. Процес ферментації досить складний, тому що лимонна кислота – продукт первинного метаболізму грибів. Зростання продуцента і синтез кислоти зазвичай регулюють складом середовища (цукру, P, Mn, Fe, Zn).

Надсинтез лимонної кислоти реалізується при великих концентраціях цукрів у середовищі (14-24%) і є відповідною реакцією продуцента на дефіцит фосфору. Оптимальний рН на стадії кислотоутворення – 1,7-2,0. У більш лужному середовищі процес збільшує накопичення щавлевої і глюконової кислот. В якості основи середовища зазвичай використовують глюкозний сироп, гідролізат крохмалю або мелясу. Джерелом азоту служать солі амонію (0,2%), концентрат фосфатів (0,01-0,02%). В якості піногасників використовують природні масла з високим вмістом жирних кислот. Дуже важливе значення має рівень аерації культури.

У виробництві лимонної кислоти застосовують кілька способів процесу.

Поверхневий спосіб реалізується у твердому, сипучому середовищі і в рідкій фазі. При рідкофазній поверхневій ферментації живильне середовище розливають в кювети шаром від 8 до 18 см. Кювети розміщують на стелажах

(попередньо простерилізованих парами формаліну) бродильної камери. Через спеціальні повітроводи зі стерильним повітрям поверхню середовища засівають вихідною музейною культурою. В якості посівного матеріалу використовують попередньо отримані в умовах поверхневої культури і висушені пори (конідії) з розрахунку 50-75 мг конідій на 1 м² площі кювет.

Відомо кілька варіантів процесу: безперервний, напівперіодичний з доливанням і метод плівок.

При безперервному режимі процес здійснюється у одному середовищі від моменту засіву пор до завершення стадії кислотоутворення.

При використанні *методу плівок* через 7 діб після завершення кислотоутворення зброджений розчин меляси зливають з кювету, міцелій промивають стерильною водою і в кювети заливають нове середовище.

Під час напівперіодичного способу з доливом мелясу додають дробовими добавками під плівку гриба на стадії кислотоутворення (30-35% від початкового об'єму). Це дозволяє підвищити вихід лимонної кислоти на 15-20% з одиниці поверхні при скороченні витрат цукрів на 10-15% в порівнянні з іншими методами.

На першому етапі ферментації (перші 24-36 год) відбувається інтенсивний ріст міцелію. Температура середовища в цей період стабілізується на рівні 32-34°C, інтенсивність аерації складає 3-4 м³ повітря в год/м міцелію.

У період активного кислотоутворення подачу повітря збільшують в 5-6 разів. В результаті більш інтенсивного термогенезу температуру знижують до 30-32°C. При зниження процесу кислотоутворення режим аерації стає менш інтенсивним. Контроль процесу ведуть за показниками титруємої кислотності середовища. Процес вважають завершеним при залишковій концентрації цукрів близько 1-2% і рівні титруємої кислотності 12-20%. Вміст

лимонної кислоти досягає 94-98%. Зброджений розчин зливають в збірку і направляють на обробку; промитий міцелій використовують у кормовиробництві.

Твердофазна ферментація має багато спільного з поверхнево-рідкофазним процесом. Процес Коджі був розроблений в Японії та передбачає використання пористого матеріалу (багаса, картопля, пульпа цукрового буряку, пшеничні висівки) в якості середовища. Матеріал попередньо стерилізують, після охолодження інокулюють сполукою пор.

Ферментація відбувається в лотках при 25-30°C протягом 6-7 днів. Утворену лимонну кислоту екстрагують водою. В Японії 20% загального обсягу виробництва лимонної кислоти отримують методом Коджі. Стабільний процес можливий при організації в два етапи:

I етап – ріст міцелію у середовищі;

II етап (за відсутності фосфору в середовищі) – утворення лимонної кислоти.

Глибинна ферментація проводиться в апаратах ємністю 50 м³ із заповненням на 70-75%. В якості посівного матеріалу використовують міцелій, підрощений в умовах глибинної культури. У виробничому апараті, куди підрощений міцелій передається по стерильній посівній лінії, живильне середовище містить 12-15% цукрів.

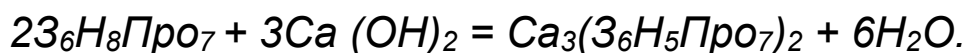
Ферментацію проводять при 31-32°C при безперервному перемішуванні. Під час кислотоутворення (5-7 діб) використовують інтенсивний режим аерації (до 800-1000 м³/год) з дробовим (2-3) додаванням цукру.

Вихід лимонної кислоти становить 5-12%, залишкова концентрація цукрів – 0,2-1,5%, частка цитрату - 80-98% від суми всіх органічних кислот.

Готовий продукт – високоочищена кристалічна лимонна кислота отримуюється під час постферментаційної стадії. У зброджених розчинах міститься глюкозова і

щавлева кислоти, залишки незброджених цукрів і мінеральні солі.

Для виділення лимонної кислоти з цього розчину її пов'язують гідроокисом кальцію з утворенням важкорозчинного цитрату кальцію:



Одночасно утворюються кальцієві солі глюконової і щавлевої кислот, глюконат кальцію $\text{Ca}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2$ і оксалат кальцію CaC_2O_4 .

Кальцієві солі лимонної та щавлевої кислот випадають в осад, а глюконат кальцію і більшість органічних і мінеральних компонентів меляси залишаються в розчині. Осад відділяють за допомогою вакуум фільтру, промивають і висушують.

Осад обробляють сірчаною кислотою з подальшою фільтрацією для переходу лимонної кислоти у вільний стан і звільнення від оксалату кальцію. Розчин лимонної кислоти фільтрують, концентрують вакуум-випарним сушінням і піддають кристалізації при повільному охолодженні до 8 - 10°C. Отримані кристали відокремлюють в центрифугі від маточника і висушують у пневматичних сушарках при 30 - 35°C. Готовий продукт містить не менше 99,5% лимонної кислоти (у перерахунку на моногідрат),

Лікарські засоби на основі лимонної кислоти

Блемарен (Німеччина, Esparna) – у складі лимонна кислота, калію дігідрокарбонат, натрію цитрат. Лікарський засіб для лікування нефроуролітіазу. Розчиняє і запобігає утворенню сечокислих каменів внаслідок злужнення сечі до значень $\text{pH}=6,6-6,8$. Знижує виведення кальцію, покращує розчинність кальцію оксалату в сечі, пригнічує утворення кристалів і перешкоджає утворенню кальцій оксалатних

каменів.

Лімонтар (РФ, «Біотики») – у складі бурштинова і лимонна кислоти. Стимулятор апетиту. Є регулятором тканинного обміну, підсилює окислювально-відновні процеси, утворення АТФ. Показаний для підвищення неспецифічної реактивності організму вагітних жінок, профілактики сп'яніння, зменшення токсичного впливу алкоголю, комплексної терапії запійних станів.

10.7. Отримання і контроль якості етилового спирту

Нині технологію виробництва спирту зараховують до біотехнологій. Процеси отримання спирту засновані на перетворенні крохмалю в цукор, потім цукру в етиловий спирт під дією біологічних каталізаторів (ферментів). Так як ферменти для гідролізу крохмалю в цукор виробляються пліснявими грибами і бактеріями, а для перетворення цукру на спирт – дріжджами, технологія виготовлення спирту нерозривно пов'язана з технічною мікробіологією.

Технологія виготовлення спирту складеться з наступних процесів:

- підготовка сировини до разварювання, разварювання зерна і картоплі з водою для руйнування клітинної структури і розчинення крохмалю;
 - охолодження розвареної маси і оцукрювання крохмалю ферментами солоду (пророщеного зерна) або культур цвілевих грибів;
 - зброджування цукрів дріжджами в спирт;
 - відгонка спирту з бражки і його ректифікація;
 - приготування солоду шляхом пророщування зерна або культивування цвілевих грибів і бактерій для отримання амілолітичних і протеолітичних ферментних препаратів;
 - виведення і розмноження засівних дріжджів.
- Оцукрювання розвареної маси зазвичай здійснюють

безперервним способом і лише на деяких заводах малої потужності – періодичним.

Незалежно від способу (безперервний чи періодичний) процес оцукрювання складається з наступних етапів:

- охолодження розвареної маси до певної температури, яка після змішування маси з солодовим молоком (мікробною культурою) знизиться до заданої для оцукрювання;
- змішування розвареної маси з солодовим молоком (мікробною культурою);
- оцукрювання крохмалю;
- охолодження сусла до температури «складки» – початкової температури бродіння сусла;
- перекачування сусла в бродильне і дріжджове відділення заводу.

Всі ці операції, крім перекачування сусла, при періодичному процесі виконуються в одному апараті – заторний бак; при безперервному процесі – або в окремих апаратах, встановлених послідовно, або в одному апараті (поєднується кілька операцій).

При отриманні спирту з меляси переробляється сахароза, яка міститься в ній, тому процеси розварювання і оцукрювання не виконуються.

Ферментативна дисиміляція вуглеводів в анаеробних умовах, що виділяють енергію і приводять до утворення продуктів неповного окислення, називається **бродінням**. У цьому процесі акцептором водню слугують органічні сполуки, що утворені в реакціях окислення (наприклад, оцтовий альдегід при спиртовому бродінні); кисень в цих реакціях участі не бере.

Брага, отримана при спиртовому бродінні – складна багатокомпонентна система, що складається з води (82-90% м/м), сухих речовин (4-10% м/м) і етилового спирту з домішками (5-9% м/м, або 6-11 об.%).

У бражці завжди є певна кількість діоксиду вуглецю: в 1 л, взятому безпосередньо з бродильного апарату міститься 1-1,5 г. При перекачуванні бражки в ректифікаційне відділення 35-45% його втрачається. Склад бражки в значній мірі змінюється в залежності від виду вихідної сировини і технологічних режимів її приготування.

Сухі речовини бражки представлені і зваженими частинками (дріжджі, дробина), і розчиненими у водно-спиртовій суміші органічними і неорганічними речовинами (декстрини, незброджені цукри, білки, кислоти, мінеральні речовини тощо).

У зерно-картопляній бражці знаходиться значна кількість зважених часток, вона більш в'язка, ніж меласна, однак загальний вміст сухих речовин у меласній бражці зазвичай більший (8-10%), ніж в зерновій (5-7%) і особливо в картопляній (3-4%).

Доміжки, які містяться у спирті, характеризуються великою різноманітністю, нині їх ідентифіковано більше 70, але загальний вміст невеликий – зазвичай не перевищує 0,5% від кількості етилового спирту.

Всі домішки можна розділити на чотири групи: спирти, альдегіди, кислоти і ефіри. Крім того, виділяють групу азотистих речовин (аміак, аміни, амінокислоти), що містять сірку (сірководень, сірчастий ангідрид, сульфокислоти, меркаптани) тощо.

Склад і зміст летючих домішок залежать від виду і якості сировини, прийнятих технологічних режимів його переробки. Домішки частково переходять із сировини, води, допоміжних матеріалів, частково утворюються в процесі приготування сусла, однак основна частина їх з'являється в процесі бродіння.

Найбільше домішок (0,35-0,45% до кількості етилового спирту) міститься у таких спиртах: метиловому, пропиловому, ізобутиловому, ізоаміловому.

Спирт із бражки виділяють за допомогою ректифікації на серцевих ректифікаційних установках. Водночас разом із ним відганяється і значна частина домішок, одержаний при цьому продукт називають *спиртом-сирцем*.

Ректифікований спирт отримують шляхом очищення спирту-сирцю від домішок ректифікацією. Розрізняють чотири види ректифікованого спирту: люкс, екстра, вищого очищення, I сорту.

Крім спирту-сирцю і ректифікованого спирту, спиртова промисловість виробляє невелику кількість абсолютного спирту. Не слід змішувати поняття: безводний (100%) і абсолютний спирт, в якому допускається вміст води до 0,2 об. %. Безводний спирт промисловістю не виробляється.

Контроль якості етилового спирту

Опис. Безбарвна, прозора, летка, легкозаймиста рідина. Гігроскопічна. Змішується з водою. Горить блакитним, бездимним полум'ям.

Ідентифікація. Порівнюють ІЧ-спектр зі спектром стандарту. Визначають відносну щільність. При проведенні якісних реакцій додають перманганат калію і сірчану кислоту в пробірку, накривають фільтрувальним папером, змоченим натріє нітропрусидом і піперазином гідратом. Папір забарвлюється в інтенсивно синій колір, який швидко зникає. У лужному середовищі спирт з розчином йоду утворює жовтий осад.

Сторонні домішки. Визначають прозорість, кольоровість, кислотність/лужність, оптичну щільність, домішки, важкі метали, залишок після випарювання.

РОЗДІЛ 11.

ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ І СТАНДАРТИЗАЦІЯ ФЕРМЕНТІВ

11.1. Загальна характеристика, номенклатура лікарських засобів на основі ферментів

Ферменти, або ензими – це біологічні каталізатори, що володіють здатністю специфічно впливати на більшість хімічних перетворень як в живій клітині, так і поза організмом.

Ферменти практично нетоксичні, працюють за нормальних умов (значення рН близько до нейтральної реакції середовища, температура від 20 до 40°C) з високою швидкістю, мають стереоспецифічність, вибірковість (утворюється невелика кількість побічних продуктів, один фермент зазвичай каталізує одну реакцію або групу реакцій) і високою ефективністю дії, зберігають свої властивості поза клітиною. Ферменти – це високомолекулярні речовини з молекулярною масою від 10 000 до 1 000 000.

Ферменти, як і інші білки, чутливі до змін рН і температури, тобто реакції, що каталізуються ферментами, протікають при визначених оптимальних діапазонах рН і температури (при яких швидкість ферментативної реакції максимальна). При змінах рН і температури, що виходять за оптимальні межі, швидкість реакції знижується.

Номенклатура і застосування в медицині лікарських засобів на основі ферментів

Нині близько 100 з 3000 відомих ферментів застосовуються у виробництві. Фармацевтична промисловість випускає приблизно 50 ферментних лікарських засобів, що є або індивідуальними ферментами, або сумішшю.

Ферменти широко використовують для замісної терапії при лікуванні великої кількості захворювань.

Амілази, ліпази, пепсин, трипсин і хімотрипсин (у вигляді ферментних лікарських засобів та їх комбінацій – фестал,

панзинорм, мезим тощо) застосовують для лікування захворювань шлунково-кишкового тракту і печінки.

Протеази – для лікування злоякісних новоутворень; плазмин (фібринолізин), стрептокиназу, стрептодеказу, урокиназу, целіазу – для розчинення тромбів в кровоносних судинах;

Бета-галактозидазу – для відновлення засвоєння молочних продуктів у людей, які страждають недостатністю цього ферменту в шлунково-кишковому тракті.

Еластаза затримує розвиток атеросклерозу. *Рибонуклеазу* використовують як антифлогістик при захворюваннях дихальних шляхів.

Аспераза, терілітин, терідеказа, профезим, ораза – як протеолітичні засоби, *пеніциліназа* – антиалергічний засіб.

Зміна рівня активності певного ферменту або співвідношення його множинних форм і ізоферментів дозволяють проводити діагностику захворювання органів (ензимодіагностика). Наприклад, підвищення в сироватці крові фруктозо-1,6-дифосфатаальдолази свідчить про інфекційний гепатит, рак печінки, інфаркт міокарда; підвищення в плазмі крові креатинкінази – про м'язову дистрофію; зростання аланінамінотрансферази – про хвороби печінки тощо.

11.2 Біотехнологічні способи отримання ферментів

Джерелами виділення ферментів слугують організми, в яких вміст необхідного ферменту становить не менше 1%. До них належать: бактерії, деякі рослини (проростки злаків, бобових), окремі тканини і органи тварин (слизова оболонка шлунково-кишкового тракту).

Однак, враховуючи технологію отримання і економічні затрати, вигідніше отримувати ферменти з допомогою мікроорганізмів, які продукують понад дві тисячі ферментів у великих кількостях за короткий час з використанням дешевих вихідних речовин.

Культивування продуцентів ферментів

Амілаза продукується різними мікроорганізмами (*Bacillus*, *Aspergillus*); декстраназа синтезується *Penicillium purpurogenium*; інвертаза синтезується багатьма представниками роду *Aspergillus*.

Серед продуцентів протеїнази зустрічаються *Aspergillus*, *Actinomyces*, *Clostridium* і *E. coli*. Продуценти ліпази – мікроорганізми (*Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Candida*).

При культивуванні мікроорганізмів, які продукують ферменти, важливе значення має катаболічна репресія (глюкозний ефект) – пригнічення синтезу багатьох ферментів (α -амілази, целюлази, глюкоамілази, інвертази) легкозасвоюваними вуглеводами (глюкозою, фруктозою, манозою тощо).

Синтез ферментів, які каталізують перетворення азотовмісних субстратів, репресує іонами амонію і амінокислотами, які швидко засвоюються. В анаеробних умовах амінокислоти індують синтез декарбоксилазів. Велика концентрація сечовини індує синтез уреази, введення у живильне середовище аргініну – аргінази. Джерелами органічного азоту для культуральних середовищ при отриманні ферментів слугують пептони, триптон, дріжджовий екстракт, гідролізат казеїну і їх сполуки.

Біополімери сприяють одночасному накопиченню комплексу протеази, амілази, нуклеази і ліпази.

Іони заліза і магнію активують і стабілізують протеазу. Іони заліза і міді впливають на біосинтез ферментів, які беруть участь в окисно-відновних реакціях. Недостатність цих іонів негативно впливає на метаболізм і біосинтез ферментів, які каталізують такі перетворення.

Біотехнологічне виробництво ферментів реалізується двома способами: поверхневим і глибинним.

Твердофазна поверхнева ферментація полягає у вирощуванні продуцента на поверхні тонкого шару сипучого середовища.

Глибинна ферментація в рідкому середовищі реалізована як в умовах періодичного процесу, так і з застосуванням проточних систем.

При поверхневій ферментації для отримання інокулята споровий матеріал розмножують поверхневим способом або вирощують музейну культуру в умовах глибинної рідкої культури. Далі посівний матеріал переносять на етап ферментації, який відбувається на поверхні сипучого середовища в металевих лотках або вертикальних перфорованих кюветах.

Культура розвивається на поверхні пухкого середовища, основу якого складають пшеничні висівки, зернове лушпиння, що є джерелом ростових речовин. Для розпушення середовища у висівки додають деревну тирсу (5 - 10%), вівсяне лушпиння. Суміш перед автоклавуванням зволожують до 20-40% вмісту вологи і підкисляють для поліпшення умов стерилізації. Прогрівання сипучого середовища здійснюють парою в спеціальних стерилізаторах при безперервному перемішуванні середовища; тривалість процесу – 60-90 хв. При 105-140°C.

В охолоджене до 30°C середовище вносять стерильні термолабільні компоненти, інокулят (0,02-0,1% від маси середовища), швидко перемішують ручним способом і розкладають шаром 2-3 см в лотки, які встановлюють в герметичні аеровані камери, які попередньо простерилізовані. Вихідна вологість середовища – 58-60%, температура культивування 28-32°C, тривалість ферментації 36-48 год.

Протягом перших 10-12 год відбувається проростання конідій при 28°C. Протягом наступних 14-18 год відбувається швидкий ріст міцелію, у цей період споживається основна кількість поживних речовин із середовища при максимальному термогенезі. Аерація стає максимальною (до 60 об'ємів стерильного повітря на обсяг камери в годину).

Для запобігання висихання конідій в результаті збільшення температури, вологість повітря підвищують практично до 100%. Внаслідок великих витрат повітря виконують його рециркуляцію. У цей період швидкість утворення ферменту досягає максимальних значень.

Протягом наступних 12-18 год процеси метаболізму слабшають, але синтез ферментів ще триває. Міцелій обволікає і міцно скріплює тверді частинки середовища, тому для нормального руху і окислення речовин середовище повинне бути досить пухким і вологим.

Ефективний рух кисню з газової фази і розчинення в середовищі відбувається за умови гарної аерації досить тонкого шару твердого сипучого середовища. Це призводить до необхідності використання великих обсягів виробничих площ.

Поверхневий метод ферментації є екстенсивним методом з великою часткою ручної праці. Однак, він не енергоємний і забезпечує більш високий вихід продукту на одиницю маси середовища в порівнянні з глибинною ферментацією.

Більш досконалою є поверхнева ферментація з використанням кювет замість лотків. Конструкція забезпечує ефективнішу аерацію і дозволяє частково механізувати процес. Колонні апарати об'ємної аерації, які застосовують в промисловості, ще більше покращують процес твердофазної ферментації. Такий апарат розділений на секції перфорованими пластинами, закріпленими на поворотних осях. Середовище протягом ферментації розпушується за допомогою обертових перемішуючих пристроїв. Це дозволяє збільшити висоту шару до 30 см. Режим перезавантаження середовища на тарілках задається автоматично. Продуктивність апарату досягає 1 т культури в добу.

Після завершення стадії ферментації вирощена культура стає коржем (пек) з набряклих часток середовища, щільно пов'язаних міцелієм, який розрісся. Цю масу подрібнюють за допомогою дробарок різного типу (барабанно-зубчастих,

шнекових, молоткових) до частинок розміром 5-6 мм.

Глибинний спосіб мікробіологічного отримання ферментів має переваги в порівнянні з поверхневим, так як проходить в контрольованих умовах ферментації, виключає не потребує ручної праці, дозволяє автоматизувати процес.

Живильне середовище для ферментації готується згідно потреб використовуваної мікробної культури, а також згідно типу цільового ферменту.

Основною вуглецевою сировиною слугують різні сорти крохмалю (кукурудзяний, пшеничний, картопляний), кукурудзяний екстракт, буряковий жом, а також зрідка глюкоза, мальтоза, декстрини. Як джерело азоту застосовують органічні сполуки (гідролізат казеїну або мікробних біомас), а також мінеральні солі (NaNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

На передферментаційному етапі технологічне обладнання і живильне середовище піддаються стерилізації. Після охолодження середовища до 30°C в нього вносять вирощений інокулят (2-5% від обсягу виробничої культури). Процес ферментації проводять в циліндричних апаратах об'ємом до 100 м^3 . Синтез ферменту в глибинній культурі протікає протягом 3-4 діб при безперервному подаванні стерильного повітря, стабілізації рН і температури середовища на певних рівнях. Невеликі зміни цих параметрів можуть викликати багаторазове зниження ферментативної активності.

Протягом першого етапу (24-30 год) міцелій бурхливо розвивається і йде швидке споживання легкозасвоюваного субстрату. Далі в середовище вносять індуктор. Після цього починається інтенсивний синтез цільового ферменту. Періодично в середовище додають стерильний піногасник, вуглецевий субстрат, розчин для корекції і стабілізації рН.

Процес утворення біомаси продуцента не співпадає в часі з максимумом продукції ферменту, при цьому умови для утворення ферменту можуть істотно відрізнятися від умов для оптимального режиму синтезу біомаси. Тому умови середовища під час процесу ферментації контролюються і

змінюються. Відомі стадійні процеси в двох послідовних апаратах. У першому створюють умови для розвитку міцелію; у другому – для синтезу і накопичення ферменту.

Після завершення ферментації, для запобігання інактивації ферментів, культуральну рідину охолоджують до 3-5°C і направляють на обробку. Після відділення міцелію культуральне середовище звільняють від грубих зважених часток і концентрують під вакуумом або піддають ультрафільтрації. У зв'язку з термолабільністю багатьох ферментів процеси обробки ведуть при контрольованих, часто знижених температурах.

11.3. Способи виділення та очищення ферментів

Більшість ферментів є позаклітинними (тобто накопичуються в культуральній рідині). Але деякі містяться всередині клітин.

Процес виділення і очищення ферментів складається з наступних етапів: відділення культуральної рідини від біомаси (сепарація), концентрування і фракціонування, хроматографічне очищення.

Фільтрація. При пропусканні через фільтри в'язкої в схильної до гелеутворення культуральної рідини (містить біополімери (ферменти)), осад стискається та закупорює пори фільтра. Щоб уникнути цього застосовують великопористі матеріали: діатоміт, кізельгур, бентоніт тощо. При фільтрації може відбуватися денатурація і сорбція деяких ферментів, проте, щоб запобігти цьому додають етилендіантетраоцтову кислоту (ЕДТА).

Сепарацію здійснюють за допомогою центрифугування.

Ферменти в клітині знаходяться у вигляді комплексів з іншими біополімерами.

Дезінтеграція здійснюється за допомогою механічного впливу (балістичних, ультразвукових, екструзійних і ферментативних методів). Для видалення зважених

нерозчинних частинок після дезінтеграції (ферменти знаходяться в розчиненому стані) застосовують високошвидкісне центрифугування. При цьому утворюється прозорий розчин, що містить ферменти і низькомолекулярні сполуки.

Власні протеази після видалення супутніх білків в розчині інактивують ферменти, які залишаються єдиними білковими субстратами, це призводить до втрати каталітичної активності.

Видалення клітинних протеаз, які здатні зруйнувати цільові ферменти. Цей процес здійснюють за допомогою обробки інгібіторами-комплексонами (ЕДТА, профенантроліном, оксихіноліном), солями ртуті або срібла. Також протеази видаляють за допомогою афінної хроматографії. Якщо фермент термостабільний, а протеази термолабільні, то їх видаляють нагріванням.

Видалення нуклеїнових кислот. Для осадження нуклеїнових кислот у вигляді комплексів використовують бромистий цетилтриметиламоній, стрептоміцинсульфат, протаміносульфат, поліетиленімін. Повнота осадження залежить від рН, іонної сили, концентрації осаджувача і білка. Також нуклеїнові кислоти видаляють шляхом гідролізу нуклеазами (панкреатичні ДНК-аза і РНК-аза).

Широко використовують *метод фракціонування білків нейтральними солями або органічними розчинниками*. Сіль (амонію сульфат), розчиняючись, пов'язує воду, в результаті змінюється ступінь гідратації молекул білка, що призводить до їх агрегації і утворення осаду. Амонію сульфат стабілізує багато ферментів.

При змішуванні з водою органічного розчинника (етанолу, ацетону) змінюється її діелектрична константа і відбувається заміна молекул води на молекули розчинника, внаслідок прискорюється утворення нерозчинних білкових агрегатів. Ці операції проводять при температурі не вище -10°C , використовуючи, охолоджені сухим льодом, розчинники. Розчинники видаляють діалізом або ультрафільтрацією через

гель.

Для хроматографічного фракціонування використовують іонообмінну, афінну хроматографію і гель-фільтрації. Водночас до сорбентів, що утворюють гелі, зараховують кальцію фосфат, алюмінію гідроксид, цинку гідроксид, деревне вугілля. Значення рН слабокислі (5,0-6,0).

Іонообмінна хроматографія. Сорбенти – це сополімери метакрилової кислоти і різних гідрофобних мономерів, натуральні і синтетичні полісахаридні іоніти (гранульовані іонообмінні целюлози, які є не тільки аніонами, але і катіонами).

Для видалення неактивних білків, пігментів тощо колонку промивають лугами, водою, кислотами і потім знову водою, іноді для видалення ліпофільних речовин промивання проводять органічними розчинниками або детергентами. Останній етап – промивання буферним розчином. У такий спосіб сорбент регенерують.

Афінна хроматографія – метод, при якому сорбентом слугує полімерний гель, за допомогою якого фермент або група ферментів взаємодіють вибірково, із утворенням стабільного зв'язку.

Унаслідок чого з багатокомпонентної суміші білків лише один фермент (група ферментів) затримується на колонці (переходить з розчину в нерозчинний сорбент), а всі супутні речовини виходять зі струмом розчинника. Чим більше білків пов'язує сорбент, тим менше його селективність (ідеальний варіант – зв'язування одного фермента).

Центром зв'язування слугують ліганди, які приєднані до матриць (субстрати, їх аналоги, оборотні інгібітори, коферменти, антитіла тощо).

Ліганд специфічно взаємодіє з активним центром ферменту. Замість матриці використовують полімери з крупнопористою (для проникнення молекул ферменту всередину) гідрофільною (для забезпечення відсутності взаємодії білків зі специфічними гідрофобними центрами)

гелевою структурою, відсутністю заряджених груп (для запобігання утворенню неспецифічних електростатичних зв'язків) і достатньою хімічною, механічною, мікробіологічною стійкістю. Замість таких сорбентів широко застосовують модифіковані агарози (недолік: низька механічна і мікробіологічна стійкість, подорожання).

Гель-фільтрація проводять на сефадексі – модифікованих похідних лінійного полісахариду декстрану. Для поділу великомолекулярних сумішей застосовують поперечно зшиті акриламідні гелі (ультрагелі) і поперечно зшити агарозу.

Сефакріли – декстриани, поперечно зшиті акриламідом – використовують для розділення білків з молекулярною масою 105 і 107. Використовують як натуральні і напівсинтетичні гелі, так і синтетичні (оксиакрилметалкрилатні гелі-сферони).

Метод має такі *переваги*: не вимагає знесолення проби, коригування рН і наявності коригуючих буферів. Просуваючись по гелю, суміш звільняється від солей і розподіляється у порядку зменшення молекулярної маси: спочатку виходять найбільші молекули, потім менші і в кінці – солі.

11.4. Імобілізація ферментів, способи імобілізації

Лікарські засоби чистих ферментів мають ряд недоліків: вони досить дорогі, нестабільні (чутливі до дії температури і рН), інактивуються в організмі і при виділенні, швидко руйнуються при зберіганні або вимагають спеціальних умов зберігання (низька температура до – 80°C, додавання коферментів і субстратів), їх неможливо використовувати багаторазово, важко відокремити від вихідних субстратів і продуктів реакції. Ферменти як і інші білки можуть бути для організму чужорідними антигенними структурами.

Імобілізованими називають такі ферменти, які виділені із клітки, штучно закріплені на носії і зберігають властиву їм каталітичну активність.

Імобілізація – це технологія, згідно з якою молекулу ферменту поміщують в будь-яку фазу або з'єднують з нерозчинним носієм. Комплекс «фермент–носій» відділений від розчину, але при цьому може обмінюватися з ним молекулами субстрату, ефектора або інгібітора. Імобілізацію проводять в строго асептичних умовах.

У порівнянні з вільними ферментативними лікарськими засобами, іммобілізовані ферменти мають значні *переваги*:

- вони мають високу стабільність, яка в кілька тисяч разів перевищує стабільність вільних ферментів;
- вони легко віддільні від реакційного середовища, що дозволяє отримувати більш чисті продукти реакції;
- іммобілізація дає можливість багаторазово використовувати ферментативний лікарський засіб;
- іммобілізовані ферменти технологічні, що дозволяє або вести процес безперервно, регулювати його швидкість і, відповідно, вихід продукту, або в будь-який момент зупинити реакцію;
- за допомогою підбору носіїв і методів іммобілізації можна цілеспрямовано змінювати властивості ферментів (специфічність, рН і температурозалежність, стабільність) для оптимізації процесу.

Носії для іммобілізації ферментів повинні мати *певні властивості*:

- високу біологічну і хімічну стійкість;
- розчинятися;
- високу механічну міцність;
- значну гідрофільність, яка забезпечує зв'язування ферменту з носієм у водному середовищі;
- достатню проникність для ферментів, коферментів, субстратів і продуктів реакції, пористість, велику питому поверхню;
- легкість активації комплексу «фермент–носій»;
- можливість створення різних структур (мембран, пластин, трубочок, гранул);

– низька вартістю.

Залежно від структури, носії поділяють на природні і синтетичні, органічні і неорганічні, полімерні і низькомолекулярні.

Природні полімерні носії за своєю хімічною природою поділяють на білкові (кератин, фіброїн, колаген, желатин); полісахаридні (целюлоза, декстран, агароза, карагенін, альгінової кислоти і їх солі); амінополісахаридні (хітин, хітозан) і ліпідні (фосфоліпіди).

Синтетичні полімерні носії поділяють на три групи: поліметиленові, поліамідні і поліефірні. Під час виробництва синтетичних полімерів можна значно урізноманітнити їх форму (гранули, трубочки тощо), варіювати величину пор, вводити різні функціональні групи.

Носії неорганічної природи представлені матеріалами з глини, скла, кераміки, силікагелю, графітової сажі, а також оксидами металів тощо. Переваги цієї групи носіїв складаються в легкості регенерації, можливості отримання будь-якої їх форми при виробництві та варіабельності розміру пор.

Методи іммобілізації ферментів

Іммобілізацію ферментів можна здійснювати фізичними і хімічними методами.

Фізичні методи засновані на адсорбції ферменту на нерозчинному носії, на включенні ферменту в пори поперечнозшитого гелю, у напівпроникні структури.

Адсорбція ферментів на нерозчинному носії. Молекула ферменту утримується на поверхні носія завдяки електростатичним, гідрофобним, дисперсійним взаємодіям або виникненню водневих зв'язків. Міцність зв'язування ферменту з носієм невелика. Тому при незначних змінах умов (рН, іонної сили, температури, розчинника) може відбуватися десорбція ферменту.

Фермент і носій змішують, інкубують і відокремлюють нерозчинний компонент суміші від розчинної центрифугуванням або фільтруванням. Це м'який спосіб іммобілізації, який слабо

впливає на каталітичну активність ферменту.

Матеріали для отримання носіїв: сефадексе, алюмінію оксид, бентоніт, кальцію карбонат, кальцію фосфат (гель), активоване вугілля, целюлоза, глина біла, іонообмінні смоли, силікагель.

Імобілізація ферментів шляхом включення в гель (зазвичай –полімерний гель). Метод забезпечує рівномірний розподіл ферменту в об'ємі носія. Досить простий і застосовується для іммобілізації окремих молекул певного ензиму, мультиферментних комплексів і інтактних клітин. Однак він непридатний для роботи з ферментами, які впливають на водонерозчинні субстрати.

Гель повинен мати хорошу систему пор для газообміну. Найчастіше використовують поліакриламідні гелі, тому що вони не мають іонних властивостей і не змінюють рН. При цьому важливим показником залишається повна полімеризація гелю (повне зшивання) і видалення з нього кисню.

Також використовують гель кальцію альгілату, карагеніна і агару. При роботі з карагеніном і агаром фермент повинен бути стійкий до нагрівання до 40°C. Агар, нагрітий до температури, коли він залишається рідким, змішують з ферментом в реакторі з безперервним режимом роботи або в режимі псевдозрідження. При такому способі фермент стає закритим усередині осередків гелю. При цьому повинен забезпечуватися доступ до ферменту субстрату.

Імобілізація в напівпроникні структури. Під час цього розчин фермента і розчин субстрату розділяють за допомогою напівпроникної мембрани (мікрокапсулювання, включення в ліпосоми). Використання хімічних методів призводить до виникнення ковалентних зв'язків між ферментом і носієм. Цей спосіб отримання промислових біокаталізаторів найбільш поширений. Хімічне приєднання ензиму до носія відрізняється високою ефективністю і міцністю зв'язку. Однак хімічні методи іммобілізації складні і дорогі. Важливим залишається захист активного центру фермента від взаємодії з носієм, що запобігає

втраті активності.

Імобілізація на носіях, що несуть гідроксигрупи. У цій групі найбільш поширений бромціановий метод, який дозволяє пов'язувати фермент з полісахаридним або синтетичним носієм.

Імобілізація на носіях, що несуть аміногрупи. Аміногрупи носія перетворюють в солі діазонію, до яких згодом приєднують молекули ферментів внаслідок взаємодії з фенольними, амінними, імідазольними, тіольними, гуанідиновими групами цих ферментів.

Імобілізація на носіях, що несуть сульфгідрильні групи. Якщо і носій, і фермент несуть сульфгідрильні групи, то під впливом кисню ці групи легко окислюються з утворенням дисульфідних зв'язків.

Імобілізація металохелатним методом. Перехідні метали (титан, цирконій, хром, залізо, ванадій, олово) утворюють з похідними целюлози і силікагелями гелевидні гідратовані комплекси, в які включається фермент. При цьому не відбувається втрати його ферментативної активності.

11.5. Методи оцінки активності ферментів

Активність ферменту виражається в стандартних одиницях активності. Стандартна одиниця активності – ця величина для будь-якого ферменту позначає ту кількість його, яке каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хв при заданих регламентованих умовах. Ця одиниця позначається буквою Е або U.

Умови при встановленні активності ферменту: температура 30°C; визначення активності з початкової швидкості реакції, коли концентрація субстрату достаточна для насичення фермента і відповідає кінетикореакції лівого порядку. Концентрації субстрату, ферменту і рН вибирають оптимальними для кожного ферменту. Якщо кількість прореагованого субстрату незначна або занадто велика,

допускається вираження результатів в міліодинаціях (мЕ або Му) і кілоодинаціях (кЕ і Ку).

Зміст ферменту в лікарському засобі умовно виражається в стандартних одиницях активності ферменту на 1 мл ферментного розчину або 1 г засобу. Активність ферментного засобу виражається в мікромолі субстрату, який прореагував разом з 1 мл ферментного розчину або 1 г засобу в заданих умовах за 1 хв. Число мікромолей і буде дорівнює числу стандартних одиниць. Якщо фермент гомогенен, то його питома активність може бути виражена в стандартних одиницях на 1 мг ферменту. Якщо ж засіб містить баласт у вигляді неактивного білка, його питома активність виражається в стандартних одиницях на 1 мг білка в ферментному засобі.

Молекулярна активність – це число мілімолей субстрату або еквівалентів груп, які порушені реакцією, що прореагували протягом 1 хв з 1 ммоль ферменту при оптимальних концентраціях субстрату, або число стандартних одиниць, що містяться в 1 ммоль ферменту.

Способи оцінки активності

Спектрофотометричні методи. Ці методи відрізняються високою чутливістю, швидкістю визначення, малим витрачанням ферменту, реактивів і дозволяють стежити за перебігом реакції у часі. Для цього реакційну суміш поміщають в термостатований кювет. Через невеликий проміжок часу після додавання ферменту (або субстрату) і швидкого перемішування вимірюють оптичну щільність при довжині хвилі, характерній для використовуваного субстрату або кінцевого продукту, що утворюється в цій реакції.

Необхідно мати довільно вибрану одиницю ферменту, за допомогою якої можна було б кількісно висловити чистоту і активність різних фракцій. У більшості випадків вибір одиниці залежить від обраного методу визначення. У разі спектрофотометричного методу такою одиницею може

слугувати кількість ферменту, що викликає певну зміну в оптичній щільності за певний час за даних умов досліду; якщо визначається продукт реакції, то одиницею буде кількість ферменту, що викликає утворення певної кількості речовини за 1 хвилину тощо. Тоді питому активність ферменту, яка є мірою чистоти ферментного засобу, висловлюють числом одиниць в 1 мг речовини (білка).

До різновидів таких методів зараховують метод Горнера (вимірюють поглинання продукту біуретової реакції в діапазоні довжини хвиль: від 550 до 650 нм), біуретовий мікрометод, метод Фоліна-Чокальтеу (заснований на взаємодії ферменту з фосфорномолібденово-вольфрамовим реактивом в слаболужному середовищі з утворенням продуктів, забарвлених в синій колір).

Для цілей визначення ферментів можуть бути використані не тільки вимірювання поглинання світла, але також вимірювання флуоресценції – спектрофлуориметричні методи. Таке визначення активності ферменту в ряді випадків по чутливості перевершує спектрофотометричні методи на цілий порядок. Деякі коферменти і субстрати мають сильну флуоресценцію. НАД і НАДФ у відновленому стані мають сильну флуоресценцію і не флуоресцують в окисненому стані.

Манометричні методи. Ці методи використовують при визначенні активності ферменту в тих випадках, коли в досліджуваних реакціях один з компонентів знаходиться в газоподібному стані. До таких реакцій зараховують ті, які пов'язані з процесами окислення і декарбоксилювання, що супроводжуються поглинанням або виділенням кисню, або вуглекислого газу, а також реакції, в яких виділення або зв'язування газу відбувається в результаті взаємодії продуктів ферментативного перетворення з доданим до системи реактивом. Спостереження за ходом реакції проводиться в спеціальних приладах – манометричних апаратах Варбурга.

Також використовуються і інші методи: титриметрія, поляриметрія, віскозиметрія, потенціо- і кондуктометричні

вимірювання тощо. Визначення активності можна виконувати, використовуючи методи хроматографії та електрофорезу. Ці методи високочутливі і специфічні, що робить їх у багатьох випадках незамінними; вони дозволяють значно скоротити витрату ферменту на вимірювання активності, але не завжди їх можна застосувати, адже мають велику тривалість розділення речовин в процесі хроматографування або електрофорезу.

Визначення амілолітичної активності панкреазиму (не менше 5600 амілолітичних ОД)

Подрібнені таблетки без оболонки розчиняють в фосфатному буферному розчині з рН 6,8. Змішують з розчином крохмалю і витримують при 25°C протягом 10 хв. Аналогічно надходять з розчином стандартного зразка амілази. Після закінчення часу додають розчин соляної кислоти. Потім додають розчин йоду і порціями розчин лугу. Залишають на 15 хв в темному місці, потім додають розчин сірчаної кислоти і титрують натрію тіосульфатом до знебарвлення.

Визначення ліполітичної активності панкреазиму (не менше 8000 ліполітичних ОД)

Подрібнені таблетки без оболонки змішують з буферним розчином з рН 9,0, охолодженим до 5°C. При перемішуванні отримують суспензію, яку потім розчиняють в більшому обсязі цього ж розчину. Випробуваний розчин змішують з оливковою олією і витримують при 37°C протягом 5 хв. Потім додають спирт і охолоджують. Титрують розчином лугу в присутності фенолфталеїну до появи рожевого забарвлення. Аналогічно надходять зі стандартним зразком ліпази.

Визначення протеолітичної активності панкреазиму (Не менше 370 протеолітичних ОД)

Подрібнені таблетки без оболонки змішують з розчином кальцію хлориду, охолодженим до 1°C. Додають розчин ентерокинази і витримують при 35°C протягом 15 хв. Потім додають боратний буфер з рН 7,5. Додають розчин казеїну і витримують при 35°C протягом 30 хв. Після закінчення часу додають розчин трихлортової кислоти. Проводять також

досліди зі стандартним зразком протеази і холостим дослідом. Проводять вимірювання оптичної щільності при довжині хвилі 275 нм.

РОЗДІЛ 12.

ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ І СТАНДАРТИЗАЦІЯ СТЕРОЇДНИХ ГОРМОНІВ І ІНСУЛІНУ

12.1. Загальна характеристика, класифікація гормонів

Гормони – біологічно активні речовини органічної природи, що виробляються в невеликих кількостях залозами внутрішньої секреції, постачають кров до тканини-мішені, де вони зв'язуються зі специфічними рецепторами і надають регулюючу дію на метаболізм або фізіологічні функції.

Нині найбільш поширеними класифікаціями гормонів є анатомічна (по залозі внутрішньої секреції, в якій гормон виробляється) і хімічна (за загальними ознаками будови молекул гормонів). У біотехнології найбільш прийнятною вважається хімічна класифікація гормонів:

- **білкові і пептидні гормони** (інсулін, глюкагон, соматотропін, кортикотропін тощо);
- **стероїдні гормони** (гестагени, кортикостероїди, андрогени, естрогени);
- **похідні поліненасичених (полієнових) жирних кислот** (простагландини, тромбосани і лейкотрієни);
- **амінні гормони** (адреналін, норадреналін, тироксин).

12.2 Інсулін: будова, отримання, стандартизація

Будова і механізм дії

Інсулін – гормон пептидної природи, утворюється в бета-клітинах острівців Лангерганса підшлункової залози.

Молекулярна маса: 5807 Да. Інсулін складається з двох поліпептидних ланцюгів: А-ланцюг складається з 21 амінокислотного залишку і В-ланцюг складається з 30 амінокислотних залишків.

Ці два ланцюги пов'язані двома дисульфідними SS

зв'язками, які забезпечують просторову структуру інсуліну, також містить 1 дисульфідний зв'язок в ланцюзі. При синтезі інсуліну в підшлунковій залозі спочатку утворюється попередник інсуліну, так званий проінсулін. Проінсулін складається з А-ланцюга, В-ланцюга і С-пептиду, що складається з 35 амінокислотних залишків. С-пептид відщеплюється під дією карбоксипептидази і трипсину, внаслідок чого проінсулін переходить в активний інсулін.

Основна дія інсуліну полягає в зниженні концентрації глюкози в крові. Інсулін збільшує проникність плазматичних мембран для глюкози, активує ключові ферменти гліколізу, стимулює утворення в печінці і м'язах з глюкози глікогену, підсилює синтез жирів і білків. Крім того, інсулін пригнічує активність ферментів, що розщеплюють глікоген і жири.

Порушення секреції інсуліну внаслідок деструкції бета-клітин – абсолютна недостатність інсуліну – є ключовою ланкою патогенезу цукрового діабету 1-го типу. Порушення дії інсуліну на тканини – відносна інсулінова недостатність – має важливе місце в розвитку цукрового діабету 2-го типу.

23 січня 1922 року Ф. Бантінг і Ч. Бест зробили ін'єкцію очищеного екстракту підшлункової залози, отриманого за методом Дж. Коліпу, підлітку Леонарду Томпсону, який страждав на цукровий діабет. Друга ін'єкція (перша відбулася 11 січня, однак через погане очищення екстракту спричинила за собою побічні ефекти) увінчалася успіхом: отримано позитивний результат без значних токсичних ефектів. За відкриття інсуліну Ф. Бантінг і Дж. Маклеод в 1923 р були удостоєні Нобелівської премії з фізіології і медицини.

Класифікації лікарських засобів інсуліну

Розрізняють:

- ***моновидові*** (одновидові) – містять екстракт підшлункової залози або інсулін тварин тільки одного виду, наприклад, свині;
- ***комбіновані*** – складаються з екстрактів підшлункової залози або інсулінів тварин різних видів, наприклад, свині та

бика.

За видовою ознакою:

- **людський**;
- **свинячий** – відрізняється від людського однією амінокислотою: в 30-му положенні В-ланцюга замість амінокислоти треонін – аланін;
- **великої рогатої худоби** – відрізняється трьома амінокислотами;
- **кутовий** – відрізняється більш, ніж на три амінокислоти.

За ступенем очищення:

- **традиційні** – екстрагуються кислим етанолом, а в процесі очищення фільтруються, висалюються і багаторазово кристалізуються (метод не дозволяє очистити лікарський засіб від домішок інших гормонів, що містяться в підшлунковій залозі);
- **монопікові (MP)** – після традиційного очищення фільтруються на гелі (при проведенні гель-хроматографії утворюють всього один «пік»: вміст домішок не більше 1×10^{-3} ; 99,9%);
- **монокомпонентні (MC)** – піддаються ще більш глибокому очищенню за допомогою молекулярного сита і методу іонообмінної хроматографії на DEAE-целюлозі, що дозволяє отримати високий ступень їх чистоти (1×10^{-6} ; 99,9999%).

За початком дії, «піком» і тривалістю:

- ультракороткої дії;
- короткої дії;
- пролонгованої дії;
- середньої дії;
- тривалої дії;
- наддовгої дії.

Класифікація, заснована на тому, чим інсулін виробляється:

Прандіально (у відповідь на надходження глюкози в кров) і базально (в невеликих кількостях інсулін присутній постійно в крові з метою нейтралізації дії контрінсулярних гормонів (глюкагон, кортикостероїди тощо).

Пролонгування дії інсуліну досягається збільшенням вмісту в ньому кристалічної форми, тобто чим більше кристалічного інсуліну, тим вище тривалість його дії. Комбінуючи аморфний і кристалічний інсулін, можна отримувати лікарські засоби різної за тривалістю дії. Зазвичай, розчини інсуліну – це лікарські засоби короткої дії, а суспензії – продовженого. Для пролонгування дії інсуліну до нього додають протамін (білок риб'ячих молочка) і цинк (для утворення кристалічних форм).

Біотехнологічне виробництво рекомбінантного інсуліну людини

До впровадження в промисловість методу отримання інсуліну з використанням рекомбінантних мікроорганізмів існував тільки один спосіб отримання інсуліну – з підшлункової залози великої рогатої худоби і свиней.

Інсулін, отриманий з підшлункової залозик великої рогатої худоби, відрізняється від людського інсуліну на 3 амінокислотних залишки, а інсулін, одержаний із залози свині, тільки на 1 амінокислотний залишок, тобто він ближче до людського інсуліну.

Проте, при введенні білків, що відрізняються за структурою від білків людини, навіть в не значній кількості, можливе виникнення алергічних реакцій. Такий інсулін, як чужорідний білок, також може інактивуватися в крові та утворити антитіла. Крім того, для отримання 1 кілограма інсуліну потрібно 35 тисяч голів свиней (якщо відомо, що річна потреба в інсуліні – 1 тонна лікарського засобу).

З іншого погляду, біосинтетичним шляхом можна отримати таку ж кількість інсуліну, провівши біосинтез в 25 - кубовому

ферментері, використовуючи рекомбінантні мікроорганізм *Escherichia coli*.

**Схема отримання рекомбінантного інсуліну
(фірма «Eli Lilly», США):**

1 етап. Шляхом хімічного синтезу були створені послідовності нуклеотидів, які кодують утворення А- і В-ланцюгів, тобто створені синтетичні гени. *Це етап отримання потрібних генів.*

2 етап. Кожен з синтетичних генів вводять в плазмід (в одну плазмід вводять ген, що синтезує ланцюг А, в іншу плазмід вводять ген, що синтезує ланцюг В). *Це етап конструювання рек-ДНК.*

3 етап. Вводять ген, що кодує утворення ферменту бетагалактозидази. Цей ген поміщають в кожен плазмід для того, щоб домогтися сильної реплікації плазмід (інтенсифікація процесу реплікації). *Цей етап також зараховують до конструювання рек-ДНК.*

4 етап. Вводять плазмід в клітину *Escherichia coli* – кишкової палички і отримують дві культури продуцента, одна культура синтезує А-ланцюг, друга В-ланцюг. Цей етап зараховують до генетичної трансформації. Потім проводять молекулярну селекцію, пов'язану з ідентифікацією рекомбінатних бактерій.

5 етап. Поміщають дві культури в ферментер. У середовище додають галактозу, яка індукує утворення ферменту бетагалактозидази. При цьому плазмід активно реплікуються, утворюючи гострі пори плазмід і, отже, багато генів, які синтезують А- і В-ланцюги. Середовище для вирощування трансгенного штаму – L-бульйон (містить натрію хлорид, кальцію хлорид, магнію сульфат, фосфати, глюкозу). Умови культивування: 30°C; рН близько 7,0; перемішування і аерація необхідні.

6 етап. Проводять сепарацію шляхом центрифугування. Клітини лізують ультразвуком, виділяють А- і В-ланцюги, які пов'язані з бетагалактозидазою. Обробляють бромціаном для

відщеплення А- і В-ланцюга від бетагалактозидази. Потім проводять подальше очищення і виділення А- і В-ланцюгів.

Очищення проводять висолюванням і багаторазовою перекристалізацією, для отримання монопікових і багатокомпонентних інсулінів додатково можуть очищати гель-хроматографією, іонообмінною хроматографією і методом молекулярних сит відповідно.

7 етап. Окислюють залишки цистеїну для утворення дисульфідних зв'язків, внаслідок чого ланцюги зв'язуються і виходить людський рекомбінантний інсулін.

РОЗДІЛ 13.

ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ ТА СТАНДАРТИЗАЦІЯ АНТИБІОТИКІВ

13.1 Загальна характеристика, класифікація антибіотиків

Термін «антибіотик» запропонував А. Вюімен 1889 року для позначення чинного агента антибіоза.

Антибіотики – специфічні продукти життєдіяльності організмів, їх модифікації, що володіють високою фізіологічною активністю по відношенню до певних груп мікроорганізмів (бактерій, грибів, водоростей, найпростіших), вірусів і злоякісних пухлин, вибірково затримують їх зростання або повністю пригнічують розвиток.

Протимікробна дія антибіотиків має вибірковий характер: на одні організми вони діють сильніше, на інші – слабкіше або взагалі не діють.

Утворення антибіотиків – спадково закріплена особливість метаболізму мікроорганізмів, що виявляється в тому, що кожен вид здатний продукувати один або кілька певних, специфічних для нього антибіотичних речовин, що обумовлено певним характером обміну, виникаючими закріпленим в процесі еволюції мікроорганізму.

Класифікація антибіотиків за способом отримання:

- антибіотики, отримані біосинтезом;
- антибіотики, отримані шляхом хімічної або біотехнологічної модифікації природних антибіотиків;
- засоби, отримані хімічним синтезом.

Класифікація антибіотиків за хімічною структурою:

- беталактами (пеніциліни, цефалоспорини);
- макроліди та азаліди;

- аміноглікозиди;
- тетрациклін;
- амфеніколи;
- антибіотики іншої структури (лінкозаміди, полієнові речовини, глікопептиди).

Антибіотики зараховують до другорядних метаболітів і синтезуються з первинних.

Біосинтез антибіотиків має специфічні етапи: процес розвитку мікроорганізмів продуцентів має двоетапний характер.

Перший етап розвитку (тропофаза або фаза збалансованого зростання) характеризується тим, що в культурі продуцента антибіотика відбувається швидке накопичення біомаси, супроводжуване інтенсивним споживанням основних компонентів субстрату (джерел вуглецю, азоту, фосфору та ін.); зниженням значення рН середовища внаслідок утворення кислих продуктів. Біосинтез антибіотика під час цього періоду не відбувається або здійснюється в незначній кількості. Цей етап повинний бути швидким, а живильне середовище – дешевим.

Другий етап розвитку (ідіофаза або фаза незбалансованого зростання) характеризується зниженням загальної кількості біомаси. У цей період відбувається розвиток мікроорганізму і утворення нових клітин, але в культурі починають переважати автолітичні процеси, що призводять до зниження загальної кількості біомаси. Середовище збагачується продуктами обміну і продуктами автолізу клітин, зростає значення рН, відбувається інтенсивний процес біосинтезу антибіотика.

Більшість мікроорганізмів в процесі тропофази чутливі до власних антибіотиків, але під час ідіофази стають до них стійкими. Щоб уберегти від самознищення мікроорганізми, які продукують антибіотики, важливо швидко досягти ідіофази і культивувати мікроорганізми в цій фазі.

**Біологічна роль антибіотиків
як вторинних метаболітів**

Фізіологічне значення антибіотиків для продукування їх мікроорганізмів чітко не визначене. Одні дослідники вважають, що синтез антибіотика дає переваги мікроорганізмам-продуцентам в боротьбі за існування в природних популяціях, і багато хто з них слугує засобами нападу і захисту; антибіотики можуть брати участь в процесах детоксикації шкідливих метаболітів, контролювати деякі аспекти обміну речовин і цілі процеси розвитку, слугувати запасними поживними речовинами.

Деякі дослідники розглядають антибіотики як випадкові речовини, що володіють корисними властивостями; згідно іншого погляду, антибіотики представляють «викиди» обміну речовин мікроорганізмів і не мають пристосувального призначення.

Крім того, деякі вчені вважають антибіотики реліктовими молекулами, витісненими під час еволюції продуктами рибосомального синтезу, які дотепер зберегли здатність втручатися в біохімічні процеси.

13.2 Загальні принципи отримання антибіотиків

Продуценти антибіотиків, скринінг продуцентів

Всі антибіотики виділені в ході систематичного скринінгу мікроорганізмів; їх число було збільшено шляхом хімічної модифікації, *мета* якої полягає в:

- розширенні спектра дії і підвищення ефективності;
- зниженні токсичності і усуненні небажаних побічних ефектів;
- створенні аналогів, стійких до руйнування мікробами, які можуть довго бути в стані «напівжиття»;
- удосконаленні способів їх введення.

Здатність виробляти антибіотики мають не всі мікроорганізми, а лише деякі штами. Існують відмінності між штамми продуцентів антибіотиків, причому ці відмінності можуть бути кількісними або якісними (один штам дає

максимальний вихід антибіотика, коли культура росте на поверхні середовища і знаходиться в стаціонарних умовах, а інший – лише коли його культура занурена в середовище і постійно струшується).

Деякі мікроорганізми виділяють не один, а кілька антибіотиків (*Pseudomonas aeruginosa* утворює піоціаназу, піоціанін, піоліпоеву кислоту тощо). Один антибіотик може продукуватися мікроорганізмами різного роду (гліотоксини утворюють види *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Aspergillus fumigatus* тощо). Різні мікроорганізми можуть виробляти різні хімічні форми одного і того ж антибіотика (різні пеніциліни тощо).

Основні групи продуцентів антибіотиків:

Неспороутворюючі бактерії: *Pseudomonas aeruginosa* – піоціанін і піоціаназу.

Спороутворюючі бактерії: Штами *Bacillus subtilis* виробляють бацитрацин, субтілін; *B. brevis* – тиротрицин тощо.

Актиноміцети: крім пеніциліну, найбільш важливі антибіотики отримані з актиноміцетів. Дотепер виділено або описано понад 200 таких сполук (стрептоміцин, тетрациклін, еритроміцин, новобіоцин, неоміцин тощо).

Мікроскопічні грибки: Цефалоспорин, гризеофульвін, мікофенолова і пеніцилінова кислота, гліотоксін, клавацин, аспергілова кислота тощо.

Водорості здатні виробляти речовини, що володіють антибіотичними властивостями, але поки жоден не знайшов клінічного застосування.

Лишайники: Ліхенін і уснінова кислота.

Вищі рослини утворюють антибактеріальні речовини, подібні за своїми властивостями зі справжніми антибіотиками: фітонциди – алліцин, томатина тощо.

Тварини: серед продуктів тваринного походження, що володіють антибактеріальними властивостями, важливе місце займає лізоцим.

Скринінг продуцентів антибіотиків

Для виділення мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків,

беруть проби ґрунту, висушують його до повітряно-сухого стану і роблять посіви на спеціальні живильні середовища. Виділені культури мікроорганізмів-антагоністів вивчають за змістом в них антибіотичних речовин. Водночас хроматографічно визначають наявність відомих антибіотиків. Якщо виявляють новий антибіотик, то спочатку здійснюють його первинне виділення і хімічне очищення, визначають токсичність і хіміко-терапевтичні властивості на тварин, заражених збудниками різних захворювань.

Виділені штамми-продуценти антибіотиків часто варіабельні і нестабільні, тому шляхом селекції відбирають найбільш перспективні штами, потім проводять відбір індукованих мутантів. Мутанти культивують на багатому за складом живильному середовищі. Процес контролюють або за концентрацією біомаси, або за концентрацією поживних речовин в середовищі. Після закінчення отримання антибіотиків їх перевіряють на активність по відношенню до тест-штамів. Цей метод нині мало поширений.

Методи створення високоактивних продуцентів антибіотиків

1. *Випробування нових продуцентів.* Наприклад, активно досліджуються міксобактерії, які продукують велику кількість антимікробних агентів.

2. *Мутасинтез.* Застосовують мутантні штами, у яких блокований синтез окремих фрагментів молекули антибіотика. У середовище культивування вносять аналоги цих фрагментів. Мікроорганізм використовує ці аналоги для біосинтезу, в результаті отримують модифікований антибіотик.

3. *Клітинна інженерія.* Отримують гібридні антибіотики з новими комбінаціями аглікона і цукрів.

4. *Генетична інженерія* – введення в геном мікроорганізму інформації про фермент, необхідний для модифікації антибіотика, який виділяється. Таким методом отримують антибіотики з унікальною структурою.

5. *Пряма ферментація продуцента з відповідним попередником.* Індукують синтез ферментів вторинного метаболізму в ідіофазі. Введений попередник повинен лімітувати швидкість біосинтезу антибіотика. Аналогічний ефект викликає застосування інгібіторів.

Технологія отримання антибіотиків

Процес промислового виробництва антибіотиків містить наступні стадії:

1. ***Підготовка живильного середовища.*** У технології отримання антибіотиків застосовують щільні або сипучі субстрати (пшоно, ячмінь, пшеничні висівки тощо) і рідкі поживні середовища.

Умови синтезу антибіотиків полягають в тому, що в живильному середовищі повинні бути присутні джерела азоту, вуглецю, фосфору, попередники антибіотиків і вітаміни.

До джерел азоту зараховують: амінокислоти, амонійні солі та нітрати; до джерел вуглецю – глюкозу і лактозу; також в живильному середовищі повинні бути наявні сірка, магній, марганець, залізо, цинк, кобальт. Крім того, при виробництві антибіотиків до складу живильного середовища повинні входити соєве борошно, кукурудзяний екстракт і макуха олійних культур.

Залежно від природи використовуваного мікроорганізму в якості джерела вуглецю можливе застосування різних субстратів (для отримання пеніциліну кращим джерелом вуглецю є глюкоза і лактоза). При розробці складу живильного середовища для кожного окремого продуцента індивідуально підбирають не тільки тип вуглецевого субстрату, але і його концентрацію.

Як джерело азоту багато продуцентів антибіотиків використовують відновлені форми азоту (амоній і амінокислоти). Велике значення має також концентрація в середовищі фосфору і інших мінеральних елементів (сірки, марганцю, заліза, кобальту тощо). Збільшення виходу антибіотиків досягають в результаті внесення в середовище

попередників синтезу антибіотика.

Значення рН для бактерій рН живильного середовища становить 7,0, для грибів – 4,5-5,0, для актиноміцетів – 6,7-7,5. Для більшості відомих антибіотиків оптимальна величина рН близька до нейтральної. При значному закисленні або залуженні середовища процес біосинтезу гальмується. Для регулювання рН в поживне середовище для отримання антибіотиків часто додають деяку кількість крейди, яка вступає в реакцію з виникаючими під час процесу метаболізму кислотами, утворюючи при цьому нейтральні солі і вуглекислий газ, згодом видаляється із середовища.

Температура. Для біосинтезу антибіотика потрібна певна температура: для біосинтезу пеніциліну грибом роду пеніциліум оптимальною температурою є 25-26°C, в той час як при утворенні антибіотиків актиноміцетами зазвичай підтримують більш високу температуру 27-29°C.

Перемішування і аерація. Оскільки продуценти антибіотиків є аеробами, отже, потрібно створити для їх синтезу хорошу аерацію. Кисень необхідний для біосинтезу ряду антибіотиків, тому він витрачається при замиканні β-лактамних і тіазолідинових кілець під час біосинтезу β-лактамної структури. Загалом потреба в кисні залежить від концентрації біомаси і її метаболічної активності. Призначення аерації і перемішування – постачання культури киснем, але одночасно вони сприяють підтримці міцелію в підвищеному стані і вирівнюванню концентрації поживних речовин і продуктів обміну в культуральній рідині.

Взпінювання. Живильні середовища, що застосовують для отримання антибіотиків, містять речовини, здатні утворювати досить стійкі піни. Аерація і перемішування середовища викликають утворення шару піни на поверхні рідини, що погіршує умови розвитку продуцента. У зв'язку з інтенсивним піноутворенням, який супроводжує процес синтезу антибіотиків, до середовища вводять піногасники (рослинні і тваринні жири, мінеральні масла, поверхнево активні речовини).

2. **Підготовка посівного матеріалу** (Продуценти-мутанти колба на качалці перший інокулятор (10 л); другий інокулятор (100-500 л) ;ферментер).

3. **Ферментація.** Для отримання антибіотиків використовують методи поверхневого і глибинного культивування. У промисловому виробництві антибіотиків використовують апарати різної ємності. Протягом процесу ферментації культура безперервно аерується стерильним підігрітим повітрям. Температура середовища, рН і ряд інших параметрів автоматично регулюються відповідно до регламенту виробництва антибіотика. Процес ферментації аеробної періодичної культури здійснюється стерильно, глибинним культивуванням, має виражений двофазний характер.

4. **Виділення антибіотиків.** Локалізація антибіотика, сфера його застосування визначають специфіку прийомів постферментаційної стадії. Якщо антибіотик знаходиться в клітинах, на першому етапі обробки біомасу виділяють з культуральної рідини (фільтрацією або центрифугуванням); після руйнування клітин антибіотик екстрагують і переводять в розчинну фазу. Потім цей розчин і культуральні середовища (якщо антибіотик виділяється з клітин в середовище) піддають різним методам екстракції, розділення, очищення та концентрування для отримання готового продукту. Мета всіх процедур постферментаційної стадії – отримання стерильних засобів високого ступеня чистоти.

5. **Очищення антибіотиків.** Ця стадія технологічного процесу складається з: осадження, сорбції, сушіння. Крім традиційних екстракційних і сорбційних методів при виділенні і очищенні антибіотиків все більшого значення набуває комплекс прийомів, що об'єднуються назвою *мембранні технології*. При зневодненні антибіотиків в залежності від властивостей використовують ліофільні або розпилююче сушіння. Потім фасують у стерильні флакони з дотриманням умов, що гарантують стерильність.

6. **Отримання готового продукту.** Оскільки біосинтез

антибіотиків проводять в асептичних умовах, то при виділенні, очищенні та отриманні лікарської засобу також дотримуються максимально можливих заходів проти контамінації.

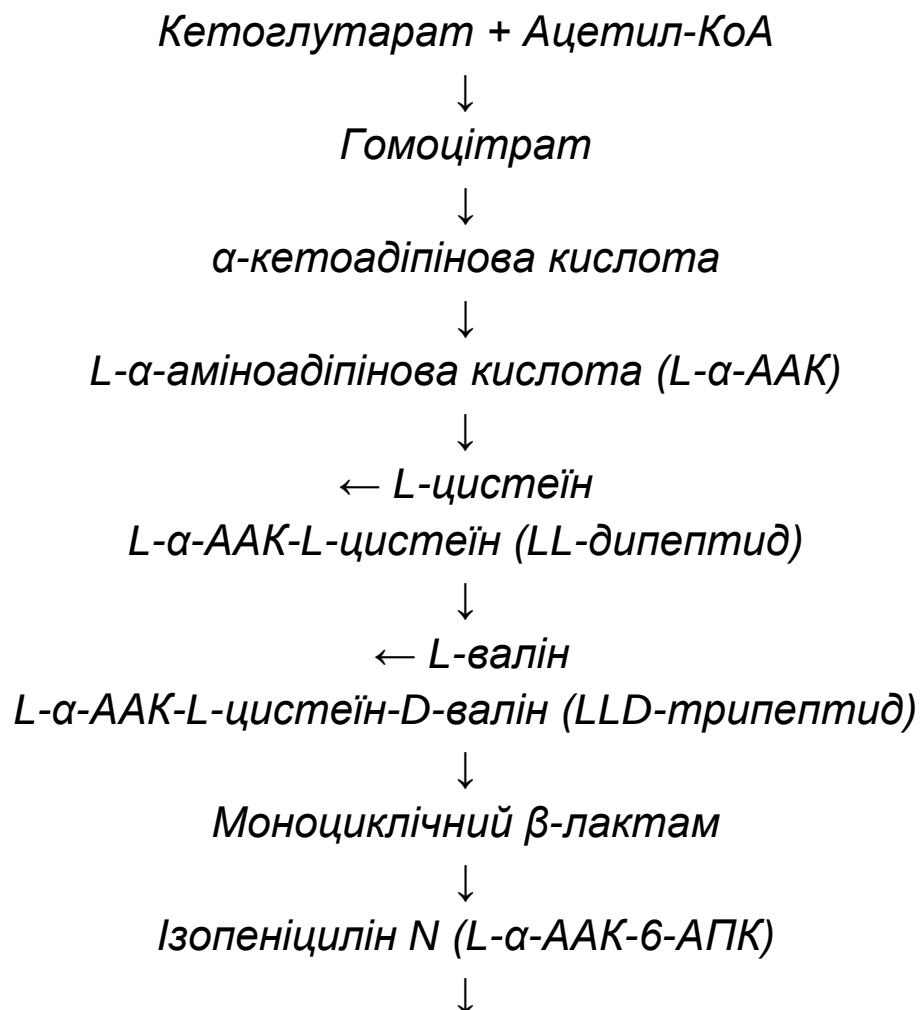
13.3 Приватні технології отримання антибіотиків

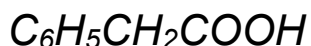
Біотехнологічне виробництво пеніциліну

Пеніциліни зараховують до β -лактамних антибіотиків, що обумовлено наявністю в їх структурі загального для всієї групи чотиричленного лактамного кільця. Все пеніциліни мають однакову будову основної групи, представленої тiazолідиновим кільцем, сполученим з β -лактамним кільцем, і мають аміногрупи – 6 амінопеніциланнова кислота (6-АПК).

Для виробництва пеніциліну застосовують спеціально відібрані сорти цвілевих грибів-суперпродуцентів роду *Penicillium chrysogenum*.

Схема біосинтезу пеніциліну представлена на Мал_____





Бензилпеніцилін ($C_6H_5CH_2CO-6-APK$)

Мал__ – Схема біосинтезу молекули пеніциліну

Для промислового виробництва пеніциліну застосовують біореактори з механічним перемішуванням. Живильне середовище для виробництва пеніциліну містить: кукурудзяний екстракт (2-3%), глюкозу (2%) лактозу (1%), сульфат амонію, фосфати (0,5-1%), похідні фенілоцтової кислоти (0,3-0,6%), гідрол.

Як вуглеводи часто використовують сахарозу або суміш лактози з глюкозою (1:1). Глюкоза може знижувати біосинтез антибіотика; у середовищах, що містять лактозу або сахарозу, біосинтез антибіотика протікає активніше. Важливу роль в процесі біосинтезу пеніциліну відіграє сірка, що міститься в структурі антибіотика. Як джерела сірки використовуються натрію сульфат і натрію тіосульфат. Надлишок іонів міді не впливає на зростання грибів, але пригнічує біосинтез пеніциліну. Ефект гальмування біосинтезу знімається додаванням в середовище іонів заліза і фітати (антипоживних речовин, утворених міоїнозитгексафосфорною кислотою). Для стабілізації рН додають крейду.

Після стерилізації і охолодження живильне середовище засівають пророслими спорами грибів, аерують шляхом пропускання через нього повітря і перемішують за допомогою мішалки.

Температура в період першої фази – 30°C, другої фази – 20°C, рН зростання грибів – нижче 7,0, споживання вуглеводів має бути повільним, що досягають використанням лактози або дробовим внесенням глюкози.

Підготовка посівного матеріалу: спочатку розмножують пори на пшоні у флаконах при -25°C протягом 4-5 діб. Отриманим споровим матеріалом засівають інокулятори, потім посівні апарати (12-18 год). У процесі ферментації необхідно дотримуватися суворої асептики.

Після закінчення процесу ферментації міцелій гриба відокремлюють вакуум-фільтруванням або центрифугуванням. Осад на фільтрі (міцелій гриба) промивають водою для максимального виходу пеніциліну. З культуральної рідини, де антибіотик знаходиться у вигляді кислоти, його виділяють екстракцією неполярними органічними розчинниками (аміноацетатом, хлороформом, бутилацетатом тощо). Очищення антибіотика проводять шляхом заміни розчинників. Екстрагований пеніцилін у вигляді кислоти переводять в водний розчин у вигляді солі, додаючи луг. Повторюючи ці операції, пеніцилін концентрують і очищають. Більшість пеніцилінів виробляють у вигляді натрієвих і калієвих солей.

У сухій кристалічній формі пеніцилінові солі стабільні протягом тривалого часу при температурі 4°C. Розчини швидко втрачають активність (протягом 24 год при температурі 20°C), їх готують безпосередньо перед введенням.

Біотехнологічне виробництво цефалоспорина

З гриба *Cephalosporium acremonium* виділено ряд антибіотиків, зокрема цефалоспорин С. Його напівсинтетичні похідні отримали назву цефалоспорини. До них відносять цефалотин, цефалексин, цефаклор, цефотаксим, цефуроксим, цефоперазон, цефепім, цефтріаксон тощо. За хімічною будовою цефалоспорин зараховують до β -лактамних сполук, але β -лактамне кільце конденсоване не з п'яти, а з шестичленним гетероциклом.

Під час розвитку *Cephalosporium acremonium* поряд з цефалоспорином З синтезується і пеніцилін N. Його утворюють так, як ізопеніцилін N в процесі біосинтезу пеніциліну через ряд стадій з ізопеніциліна N утворюється цефалоспорин С.

Продуцент целоспоринів може рости на середовищах, що містять соєве борошно, сухі дріжджі, макуху. Крім того, в живильне середовище додають амонійні солі і фосфор, які сприяють засвоєнню вуглеводів, цинк, марганець, магній, залізо, крейду.

Посівний матеріал спочатку готують в качалочних колбах,

потім переносять в інокулятор, в посівний апарат більшого об'єму, а після в ферментер (70 год).

Процес ферментації здійснюється глибинним способом, в умовах постійної аерації і безперервного перемішування, при температурі 26-28°C, протягом 7-8 діб. Процес культивування здійснюють в асептичних умовах.

Постферментаційна стадія, пов'язана з виділенням і очищенням цефалоспоринів, здійснюється за тією ж схемою, що і пеніцилінів.

Біотехнологічне отримання стрептоміцину

Стрептоміцин належить до групи аміноглікозидних антибіотиків. Стрептоміцин – антибіотик, що утворюється в процесі життєдіяльності променистих грибів *Streptomyces globisporus*. Культури актиноміцетів варіабельні і кожному штаму повинне відповідати певне середовище і свій режим розвитку. На їх мінливість впливають умови культивування, особливо склад середовищ.

Антибіотик випускають у вигляді сульфату. Стрептоміцину сульфат має широкий спектр антимікробної дії. Антибіотик активний відносно мікобактерій туберкульозу і більшості грамнегативних і деяких грампозитивних мікроорганізмів; менш активний відносно стрептококів, пневмококів; не діє на анаероби, рикетсії і віруси. Діє стрептоміцин бактерицидно.

Для виробництва стрептоміцину застосовують штам актиноміцета *Streptomyces griseus*, що утворює повітряний міцелій і спори.

В якості основи поживних середовищ застосовують гідролізати рослинних і тваринних білків. Основними компонентами поживних середовищ, що застосовуються при промисловому отриманні стрептоміцину, є: соєве борошно, гідрол і амонійні солі.

Для стабілізації ознак, пов'язаних з утворенням антибіотиків, при зберіганні і підтримці штаму в середовища додають антимутагени (пуринові нуклеотиди, іони марганцю, L-метіонін, гістидин, поліаміни, кофеїн тощо).

Середовище стерилізують при 120°C, охолоджують і засівають посівним матеріалом. Під час розвитку продуцента розрізняють 2 стадії. На першій стадії відбувається швидке зростання і розвиток мікроорганізму з енергійним використанням основних компонентів субстрату, максимальне споживання кисню. У цитоплазмі спочатку високий вміст РНК, ДНК не спостерігається і виявляється лише через 12 год розвитку.

У середовищі відбувається збільшення вмісту амонійного азоту, обумовлене розкладанням білків соєвого борошна. рН спочатку дещо знижується, потім підвищується з 6,8 до 7,9. На цій стадії стрептоміцин синтезується в незначній кількості.

Через 28 год маса міцелію припиняє збільшуватися, починається друга стадія, пов'язана з утворенням стрептоміцину. На 3 добу рН з 7,9 зменшується до 6,7, на 4 - 5 добу – знову зростає до 7,7.

Друга стадія характеризується повільним споживанням залишків поживних речовин у середовищі, уповільненням зростання актиноміцета, зниженням споживання кисню, автолізом міцелію, максимальним утворенням стрептоміцину. Максимальне накопичення стрептоміцину спостерігається, коли автолітичні процеси починають переважати над процесами зростання. Кількість амонійного азоту продовжує зростати, що ймовірно пов'язано з розкладанням білків соєвого борошна і автолізом міцелію.

Культивування проводиться при 27-29°C і супроводжується аерацією і перемішуванням, рН 7,5-8,0.

У культуральній рідині знаходяться мінеральні речовини, білки, нуклеїнові кислоти, амінокислоти, полісахариди, жири, стрептоміцин тощо. Основна частина стрептоміцину виділяється в культуральне середовище, але частина його залишається в міцелії і на його поверхні. З метою вилучення стрептоміцину з культури продуцента культуральну рідину разом з біомасою обробляють мінеральною кислотою. Водночас весь антибіотик переходить в розчин. Міцелій відділяють

фільтруванням або центрифугуванням. Вільну від міцелію культуральну рідину обробляють щавлевою кислотою. При цьому досягається видалення білків і органічних підстав, іонів металів (кальцію, магнію, заліза). Далі ведеться виділення стрептоміцину в чистому вигляді. Для виділення культуральної рідини в чистому вигляді використовуються методи адсорбції на активованому вугіллі і метод іонообмінної хроматографії. Стрептоміцин десорбують з вугіллям, розведеним спиртовим розчином соляної кислоти, після цього нейтралізують і концентрують шляхом випарювання. Отриманий концентрат обробляють ацетоном, облягають солянокислим стрептоміцином. Суміш фільтрується через фільтр-прес, причому фільтрат надходить на регенерацію розчинника. До безводного спиртового розчину солі стрептоміцина додають спиртовий розчин кальція хлориду, щоб отримати кристалічну сіль стрептоміцину.

В асептичних умовах сіль стрептоміцину розчиняють у воді, пропускають через бактеріальний фільтр для видалення мікроорганізмів, ліофільно висушують, подрібнюють в порошок і фасують.

Біотехнологічне отримання тетрацикліну

У 1948 році з ґрунту було виділено новий вид актиноміцета – *Streptomyces aureofaciens*, який утворює антибіотики – хлортетрациклін, тетрациклін та інші речовини. Ці антибіотики мають широку антибіотичну дію відносно грампозитивних і грамнегативних бактерій, рикетсій, спірохет, хламідій тощо. Хлортетрациклін був першим з виділених тетрациклінів. Залежно від властивостей штаму, як джерело енергії можуть бути використані різні вуглеводи, проте для промислового виробництва використовують лише сахарозу, крохмаль і глюкозу. Максимальні виходи антибіотика досягаються в результаті обмеження вмісту неорганічного азоту в середовищі і заміною його складними речовинами біологічного походження (борошном олійного насіння, арахісом, копрою – ядром кокосового горіха). У середовище в багатьох випадках додають

кров'яне борошно, рибну муку і гідролізований казеїн. В обмежених концентраціях використовують кукурудзяний екстракт і барду при певному вмісті фосфатів. Вміст фосфатів є важливим фактором, оскільки поки весь неорганічний фосфат повністю не буде перетворений в нуклеїнові кислоти і інші продукти обміну, утворення тетрацикліну не відбувається. Також в середовищі необхідна наявність катіонів мікроелементів (Co, Cu, Zn, Mn, Fe).

Зразковий склад поживних середовищ: крохмаль (зерно в перемеленому і набряклому стані) 2-5%, сахароза (у вигляді цукру або цукрової меліси) 1-3%, борошно з оливкового насіння (відходи з низьким вмістом жирів, арахіс або соя) 1-3%, м'ясні відходи (кров'яне або м'ясне борошно) 0,2-0,5%, кукурудзяний екстракт 0,2-1,0%, амонієві солі 0,1-0,5%, вапно 0,5%, кухонна сіль 0,1-0,5%, солі мікроелементів.

Для ферментації бажано застосовувати ферментатори, виготовлені з нержавіючої сталі або іншого стійкого матеріалу. Протягом чотирьох днів, поки триває процес, середовище має аерувати. Остаточне значення виходу продукту наближається до 1%. Антибіотик може бути обложений додаванням вапна до рН 8,8. Потім він фільтрується на фільтр-пресі, екстрагується розведеною кислотою і очищається за допомогою фракційного осадження: після перекристалізації можна отримати продукт, що досягає 98% чистоти.

Окситетрациклін був вперше виготовлений в 1950 році при культивуванні актиноміцета *Streptomyces rimosus*. Середовище і умови ферментації подібні використуваним при виробництві хлортетрацикліна (виняток – в якості джерела азоту можуть бути використані нітрати і кукурудзяний екстракт).

Окситетрациклін утворює нерозчинний комплекс з солями четвертинної амонійної основи, і цей комплекс може бути легко відділений від субстрату, після чого його розм'якшують соляною кислотою і потім кристалізують у вигляді солі оцтової кислоти. Як і інші тетрацикліни, він випускається у вигляді таблеток або суспензії.

Тетрациклін був отриманий після хлортетрацикліну і окситетрацикліну, причому майже одночасно як шляхом спрямованої ферментації за допомогою відібраних штамів *Streptomyces aureofaciens* в умовах низького вмісту хлоридів в живильному середовищі, так і шляхом каталітичного відновлення хлортетрацикліна. У методі спрямованої ферментації використовується ряд організмів, зокрема і *Streptomyces vicidifaciens*, при цьому отриманий штам в адекватному середовищі може забезпечити великі виходи тетрацикліну або рівну кількість хлортетрацикліну і тетрацикліну пропорційно кількості присутніх іонів хлору.

У випадках, коли необхідно уникнути утворення хлортетрацикліну, вміст хлориду в середовищі не повинен перевищувати 17 год/млн. Якщо необхідно використовувати в якості основних компонентів субстрату складні біологічні речовини, то в умовах промислового виробництва для контролю рівня хлоридів є *два способи*:

1) видаляти більшу частину хлоридів, пропускаючи компоненти, такі, як цукор-сирець і кукурудзяний екстракт, через іонообмінні смоли. Цей метод цілком ефективний, якщо застосовується до розведених розчинів;

2) вводити в середовище речовини, що уповільнюють утилізацію хлоридів, наприклад, броміди. Виявилося, що при концентраціях від 10 до 350 год/млн, іони броду практично пригнічують утворення хлортетрацикліна, навіть за наявності іонів хлору в концентрації 1500 год/млн.

На практиці застосовують натрію бромід (5%). пропускаючи компоненти, такі, як цукор-сирець і кукурудзяний екстракт, через іонообмінні смоли. Цей метод цілком ефективний, якщо застосовується до розведених розчинів.

Біотехнологічне отримання макролідів

Велику групу антибіотиків (еритроміцин, олеандоміцин і ін.), Що містять у своїй структурі макроциклічний лактоном фрагмент і продукуються різними штамми *Streptomyces*, складають так звані макроліди. Найбільш відомим

представником цієї групи є еритроміцин, який за спектром антибактеріальної дії близький до пеніциліну і застосовується для лікування хворих з підвищеною чутливістю до пеніциліну і тетрацикліну.

Культивування продуцента еритроміцину (*Streptomyces erythraea*) триває 150 годин при $\text{pH} \sim 7$ у середовищі, приготовленому на основі крохмалю, соєвого борошна, масла, кукурудзяного екстракту, сухих дріжджів і вапна. Культуральну рідину фільтрують на кизельгур, і антибіотик екстрагують за допомогою амілацетата. Зазвичай фільтрат культури і розчинник пропускають через встановлений в системі змішувач, а потім через звичайну центрифугу. Антибіотик можна розбавити буферним розчином, осадити ацетоном і натрію хлоридом, і кристалізувати його з ацетоновим розчином.

13.4 Біологічні інструментальні методи стандартизації антибіотиків

Стандартизація антибіотиків біологічними методами і визначення їх антимікробної активності

Активність антибіотика визначають шляхом порівняння ступеня пригнічення росту чутливих мікроорганізмів під дією випробовуваного антибіотика і стандартного зразка у відомих концентраціях.

Метод дифузії

Живильне середовище певного складу розплавляють і заливають тонким шаром у чашку Петрі для формування однородного шару завтовшки від 2 до 5 мм. Середовище може також складатися з двох шарів, з яких тільки верхній піддавався інокуляції. Мікроорганізми, чутливі до випробовуваного антибіотику, вирощують на скошеному агарі (добова культура) і готують суспензію, яку стандартизують по одиницях каламутності (МакФарланд) в пробірці.

Відбирають певний обсяг суспензії з пробірки і засівають мікроорганізми у чашку Петрі при певній температурі,

наприклад, при 48-50°C для вегетативних форм і при 65-70°C при використанні суспензії пор. Кількість суспензії мікроорганізмів вибирають таким чином, щоб утворювалися чітко визначені зони інгібування необхідного діаметра при концентраціях антибіотика, використовуваних у визначенні.

Чашки зберігають таким чином, щоб не відбувалося помітного зростання або загибелі мікроорганізмів до їх використання, а поверхня середовища була сухою до моменту використання.

Використовуючи розчинник і буферний розчин, готують розчини стандартного зразка антибіотика і випробуваного антибіотика, що мають відомі концентрації і ймовірно рівні активності. Для оцінки достовірності кількісного визначення використовують не менше трьох доз стандартного зразка і трьох доз випробуваного антибіотика, що мають рівні передбачувані активності. Розчини наносять на поверхню середовища, наприклад, в стерильних циліндрах з порцеляни, нержавіючої сталі або іншого відповідного матеріалу, або в лунки, зроблені в агарі. У кожен циліндр або лунку повинні бути поміщені рівні об'єми розчину.

Рекомендована послідовність внесення стандартного і випробуваного зразків в циліндри або лунки кожної чашки: першими вносять розчини малої концентрації, потім із середньою концентрацією, а останній – розчин із великою концентрацією.

Всі розчини стандартного випробуваного зразку вносять в циліндри або лунки однієї чашки Петрі таким чином, щоб розчини з великими концентраціями не стикалися між собою.

Чашки інкубують при відповідній температурі близько 16 - 20 год. Чашки можуть витримуватися до інкубації при кімнатній температурі або, якщо необхідно, при температурі 4°C протягом певного проміжку часу, зазвичай від 1 до 4 год для протікання дифузії, що зменшує ефекти варіацій тимчасових інтервалів між нанесенням розчинів.

Вимірюють діаметри (з точністю не нижче 0,1 мм) або

площі кільцевих зон пригнічення (з відповідною точністю).

Метод турбодиметрії

Відповідне живильне середовище зі суспензією обраних мікроорганізмів, що володіють чутливістю до тестованого антибіотика, інокують таким чином, щоб в умовах визначення відбувалося досить значне інгібування мікробного зростання.

Кількість суспензії обирають таким чином, щоб отримане після 4 год інкубації помутніння, легко піддавалося кількісній оцінці.

Інокульоване середовище використовують негайно після його приготування, використовуючи розчинник і буферний розчин, готують розчини стандартного зразка і випробуваного антибіотика, що мають відомі концентрації і імовірно рівні активності.

Для оцінки достовірності кількісного визначення використовують не менше трьох доз стандартного зразка і трьох доз випробуваного антибіотика.

Поміщають рівні об'єми кожного з розчинів ідентичні пробірки і додають в кожну пробірку рівні об'єми інокульованого середовища.

Одночасно готують дві контрольні пробірки без антибіотика, що містять інокульоване середовище. В одну з них негайно додають формальдегід. Ці пробірки використовують для налаштування оптичного приладу, який використовують для вимірювання росту.

Всі пробірки поміщають у водяну баню або в інший відповідний апарат, що дозволяє швидко довести температуру всіх пробірок до відповідної температури інкубації і підтримувати температуру цих пробірок протягом 3-4 год, забезпечуючи однорідність температурного режиму і рівний час інкубації.

Після закінчення інкубації, зростання мікроорганізмів зупиняють додаванням в кожну пробірку формальдегіду або тепловою обробкою і вимірюють ступінь каламутності, використовуючи оптичний прилад, що підходить.

Розділ 14

СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Не зважаючи на велику кількість агентів, що використовуються в біотехнології, основними її об'єктами є мікроорганізми. Саме їх використовують для біосинтезу амінокислот, стимуляторів росту рослин, препаратів на основі біомаси тощо. Тому, сільськогосподарська біотехнологія, більше ніж інша галузь, нерозривно поєднана з класичною сільськогосподарською мікробіологією. В її межах створюються умови для розвитку біотехнології покращення ґрунтів та виробництва біодобрих. Біотехнологія ґрунтів завдяки використанню рослин, які містять необхідні бактерії, може суттєво підвищити якість та родючість ґрунтів без додавання хімічних добрив або із значним зменшенням їх внесеної кількості. Використання мікроорганізмів для переробки органічних залишків може суттєво прискорити та зробити більш економічно вигідним процес створення органічних добрив. Все це буде стимулювати розвиток більш органічного землеробства, що позитивно вплине на загальний екологічний стан сільського господарства без втрат його економічної складової.

Сільськогосподарська мікробіологія – це розділ мікробіології, який вивчає роль мікроорганізмів у формуванні родючості ґрунту, перетворенні поживних речовин у ньому, захисту рослин і тварин; створення біопрепаратів для сільськогосподарського виробництва.

Важливу роль у підтримці на оптимальному рівні запасів елементів живлення в ґрунті і умов нормальної доступності їх рослинам грають мікроорганізми. Сільськогосподарське виробництво залежить від активності різноманітних симбіотичних та асоціативних мікроорганізмів, що забезпечують живлення та розвиток рослин, захист їх від біотичних й

абіотичних стресів, а також переробку рослинної сировини та відходів.

Використання інтенсивних агротехнологій призвело до глобального забруднення сільськогосподарських угідь, несприятливих змін клімату, втрати біорізноманіття в більшості природних екосистем, що в кінцевому підсумку негативно вплинуло на все навколишнє середовище Землі. Тому, швидко набрала актуальності сільськогосподарська мікробіологія, яка здатна підштовхнути до такої необхідної екологізації сільського господарства. Все більше уваги відводиться розвитку екологічно стійких сільськогосподарських систем, де продуктивність рослин і тварин забезпечується використанням їх біологічних можливостей, при мінімальному застосуванні агрохімікатів, таких як мінеральні добрива, пестициди тощо. Основний спосіб досягнення екологізації сільського господарства, це часткове або повне заміщення агрохімікатів препаратами симбіотичних мікроорганізмів, які в природі успішно забезпечують своїх господарів поживними речовинами та захищають їх від біотичних та абіотичних стресів. Такий перехід від інтенсивного до екологічно стійкого землеробства, в якому продуктивність рослин забезпечується використанням біопрепаратів при мінімальному застосуванні екологічно небезпечних агрохімікатів, отримує все більшу популярність в світі

14.1 Ґрунтові мікроорганізми

14.1.1 Склад, структура та функції мікробних спільнот ґрунтів

Складні взаємозв'язки існують не лише між рослинами та ґрунтовими мікроорганізмами, а й між ґрунтовими мікробними популяціями всередині мікробних спільнот. За своїм складом екsudати коренів різних видів рослин відрізняються, що дозволяє їм залучати до своєї ризосфери різні ґрунтові мікробні

спільноти. Склад ексудатів коренів рослини залежить від її фізіології, генетики та факторів навколишнього середовища. Мікробні спільноти, які можуть найбільш ефективно використовувати конкретні джерела вуглецю, будуть найбільш поширеними у певній ризосфері. Так, мікроорганізми ґрунту відіграють вирішальну роль у кругообігу поживних речовин в екосистемі. Завдяки цьому процесу вони змінюють навколишнє середовище, але, як наслідок, навколишнє ґрунтове середовище також змінює функції та різноманітність ґрунтових мікробних спільнот. Ґрунт – це не лише матриця для підтримки рослинництва, а ще й необмежений ресурс, який ми можемо використовувати лише короткостроково, якщо не поповнювати те, що ми взяли. Оскільки органічна речовина ґрунту є основою енергопостачання в екосистемі, сільське господарство виграє лише тоді коли намагається збагатити ґрунт, утримуючи залишки врожаю, використовуючи правильну сівозміну та мінімально порушуючи природу ґрунту. Лише так, мікробна активність та різноманітність в ґрунті збільшується, тим самим відновлюючи рівновагу в екосистемі, що призводить до збільшення продуктивності та стабільності сільськогосподарського виробництва.

Ґрунтова мікробіологія почала свій розвиток в другій половині XIX століття. Встановлення головної ролі, яку мікроорганізми відіграють у біологічно важливих кругообігах речовини на землі (кругообіг азоту, сірки та вуглецю) в значній мірі була роботою визначних людей – С. Виноградського (1856-1953) та М.В. Бейєрінка (1851–1931). С. Виноградський, що вважається засновником мікробіології ґрунтів, відкрив нітрифікуючі бактерії (1890-1891); описав мікробне окислення H_2S та сірки (1887); зробив внесок у дослідження зменшення нітратної та симбіотичної фіксації азоту. М.В. Бейєрінк – виділив агенти симбіотичної (1888) та несимбіотичної аеробної (1901) фіксації азоту, однак найбільшим його внеском стала нова та важлива техніка виділення та вивчення різних фізіологічних

типів мікроорганізмів із природних зразків за допомогою специфічних поживних середовищ та умов інкубації.

Мікроорганізми ґрунту неймовірно численні та різноманітні. Залежно від типу ґрунту вміст та їх видовий склад дуже відрізняється.

Бактерії – найбільш домінуюча група мікроорганізмів у ґрунті та дорівнює половині загальної мікробної біомаси в ньому. Більшість із них гетеротрофи. Найчастіше зустрічаються в ґрунті бактерії родів – *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*.

Актиноміцети – проміжна група між бактеріями та грибами. Вони численні та широко поширені в ґрунті, практично на рівні із бактеріями: 10^4 – 10^8 на г ґрунту. 70% ґрунтових актиноміцетів – це *Streptomyces*, багато з них здатні до синтезу антибіотиків, через що вони вважаються перспективними як продуценти даних речовин. Їх кількість збільшується зі збільшенням глибини ґрунту.

Мікроскопічні гриби – найбільш поширені в поверхневих добре провітрюваних шарах ґрунтів, та домінують переважно у кислих ґрунтах. Поширеними родами в ґрунті є *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Rhizopus*.

Мікроскопічні водорості – присутні у більшості ґрунтів, але їх кількість коливається від 100 до 10 000 на г ґрунту (10^3 – 10^4). Вони знаходяться як на поверхні так і в товщі ґрунту, але основна їх частина населяє поверхневий шар ґрунту. Найбільша глибина, на якій в ґрунті були виявлені водорості – 2,8 м. Основні групи ґрунтових водоростей: синьо-зелені (*Cyanophyta*) – *Gleocapsa*, *Nostoc*; зелені (*Chlorophyta*) – *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Hormidium*; діатомові (*Diatomeae*) – *Navicula*, *Pinnularia*; жовто-зелені (*Xanthophyta*) – *Botrydium*.

Найпростіші (Protozoa) або одноклітинні – їх популяція коливається від 10 000 до 100 000 на г ґрунту (10^4 – 10^5). Більшість ґрунтових форм – це джгутикові, амеби або інфузорії. Вони харчуються пожираючи ґрунтові бактерії, чим і регулюють

біологічну рівновагу в ґрунті. Найбільша їх кількість у верхньому шарі ґрунту.

Вважається, що в 1 г ґрунту міститься близько 4000 видів мікроорганізмів, але більшість із них не здатна рости на існуючих поживних середовищах. Орієнтовно від 0,1 до 1,0% органічної речовини в ґрунті представлено мікроорганізмами різних видів. Чисельність мікроорганізмів у ґрунті є показником біогенності ґрунту. Цей показник коливається не тільки протягом року, але й упродовж коротких проміжків часу та залежить від температури ґрунту, його вологості, стану рослинного покриву тощо. Тому, в різних регіонах цей показник змінюється по своєму – у південних – у літній посушливий період домінантами є актиноміцети, а весною і в осінній період – бактерії, чисельність яких влітку значно знижується. Волога в ґрунті є найбільш помітним фактором впливу на стан мікробного ценозу в вищезгаданих зонах. Зазвичай, мікробіота ґрунту активізується у весняний період року. Функціонування ґрунтової мікрофлори є важливим фактором, який сприяє структуруванню ґрунту. Так, наприклад, розвиваючись на поверхні часточок ґрунту, гриби та актиноміцети оточують ці часточки міцелієм і формують водостійкі агрегати, які на наступному етапі можуть скріплюватися гумусом.

Найважливіші функції ґрунтових мікроорганізмів!

- За участю різних груп мікроорганізмів у ґрунті відбувається кругообіг багатьох елементів і утворення доступних форм мінерального живлення;
 - Участь у процесі трансформації поживних речовин;
 - Участь у формуванні гумусу, структури ґрунту, склеювання ґрунтових частинок в агрегати;
 - Розкладання стійких компонентів рослинних та тваринних решток;
 - Накопичення біологічно активних речовин, таких як, ауксини, гібереліни, амінокислоти, вітаміни, що стимулюють ріст і розвиток рослин;

- Роль у антагонізмі мікроорганізмів;
- Хижаки для нематод;
- Зменшення ерозійних втрат;
- Поліпшення водно-повітряного режиму ґрунту;
- Підтримка біологічної рівноваги.

Основною діяльністю ґрунтових мікроорганізмів є розкладання органічної речовини. Ґрунтові мікроорганізми, як правило, гетеротрофні і покладаються на надходження вуглецевої енергії поза мікробною спільнотою. Органічні речовини в ґрунті значною мірою отримують із вищих рослин, що складаються з целюлози (15-60%), геміцелюлози (10-30%) та лігніну (5-30%). Показники кругообігу вуглецю представляють вимірювання на рівні екосистеми.

Діючі фактори, що впливають на діяльність ґрунтових мікроорганізмів: На ґрунтові мікроорганізми впливають різні фактори головними з них є вологість ґрунту, температура повітря, тип ґрунту, рН ґрунту, біологічні фактори тощо (рис. 14.1).



Рис. 14.1 Фактори зовнішнього середовища, що впливають на мікроорганізми

14.1.2 Структура мікробних угруповань у ґрунтах різного типу

Тривалий час вважалося, що мікроорганізми розподілені по поверхні земної кулі більш-менш однорідно. Також, переважала думка, що різні ґрунти відрізняються лише за чисельністю

мікроорганізмів але не за своїм складом. Але, детальне вивчення специфіки мікрофлори ґрунтів різних типів, яке почалося в сорокових роках минулого століття, показало що це не зовсім так. Виявилось, що чисельний склад мікроскопічних істот ґрунтів відрізняється значною динамічністю. Навіть за відносно короткі проміжки часу число мікроорганізмів у ґрунті може значно змінюватися. Все це відбувається внаслідок змін умов навколишнього середовища – температури і вологості ґрунту, стану рослинного покриву, тощо. Майже у всіх ґрунтах спостерігається активізація діяльності мікроорганізмів навесні. Більш за все, це пов'язано із збагаченням ґрунтів рослинними залишками та достатнім зволоженням.

Крім сезонних змін, на чисельність ґрунтової мікробіоти впливають і короточасні флуктуації. Про причини останніх існують різні припущення. Деякі дослідники припускають, що число бактерій може різко знижуватися внаслідок знищення їх фагами чи найпростішими або на них впливають якісь токсичні ґрунтові речовин (етилен, окис етилену та ін.), які тимчасово пригнічують розвиток певних груп мікроорганізмів. Проте, найбільш ймовірним вважають, що флуктуації впливають через нерівномірний розподіл мікроорганізмів у ґрунті. У зв'язку з цим кожна взята проба відрізняється за складом мікроорганізмів від іншої, що створює враження суттєвої динаміки чисельності. Коливання чисельності мікробів не знімають питання про неоднакову щільності заселення мікроорганізмами ґрунтів різних типів. Не зважаючи на коливання, легко помітити, що в одних ґрунтах бактерій більше, а в інших менше.

Мікробіологічні аналізи дають умовні показники, але при використанні однієї і тієї ж методики для вивчення мікробіоти різних ґрунтів отримують цілком порівнянні результати. Та, наприклад, про більшу насиченість мікроорганізмами південних ґрунтів у порівнянні з північними свідчать методи як прямого мікроскопіювання так і висіву на різні поживні середовища. В більшості південних ґрунтів мікробіологічні процеси протікають

більш енергійно та кількість мікроорганізмів (у порівнянні з північними ґрунтами) зростає.

Сапротрофне угруповання мікроорганізмів. Найбільш вивчене угруповання мікроорганізмів у різних ґрунтах – сапротрофне або зимогенне, це мікроорганізми, які розкладають переважно легко доступні органічні сполуки. У складі цього угруповання часто представлені бактерії, особливо неспороутворюючі їх форми. Однак, кількість їх в різних ґрунтах неоднакова. Так, вважається, що гнилісні бактерії *Pseudomonas fluorescens*, які є «піонерами» освоєння органічних рослинних залишків, багатше представлені в ґрунтах півночі, де повільно йде мінералізація. У ґрунтах півдня вони виявляються в значній кількості лише протягом короткого часу після внесення рослинних залишків. Представники роду *Arthrobacter*, які є актиноміцетами, в більшій кількості зустрічаються південних ґрунтах. Вони характерні для більш пізніх стадій розпаду органічної речовини і краще ростуть в умовах нейтральних значень рН. У ґрунтах півночі дуже часто присутня значна кількість корінебактерій. Серед неспороутворюючих азотфіксуючих бактерій види роду *Beijerinckia* поширені тільки в кислих субтропічних ґрунтах. Представники роду *Enterobacter* у великій кількості зустрічаються в лісових ґрунтах середньої смуги, а роду *Spirillum* – у південній зоні.

Найбільш дослідженими є угруповання спороутворюючих бактерій, розвиток яких пов'язаний з присутністю в ґрунті більш перетвореної органічної речовини. Кожному типу із ґрунтів властивий характерний набір переважаючих видів бацил. Інші види тут можуть бути, але в дуже малій кількості.

Вважається, що ґрунти в яких енергійно протікають певні мобілізаційні процеси переважають бацили, що використовують не тільки органічний, але й мінеральний азот (*B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. subtilis*). Та навпаки, в ґрунтах із слабо протікаючими процесами мінералізації органічних речовин домінують спороутворюючі бактерії, для яких необхідний

органічний азот (*B. cereus*, *B. mycoides* та ін.). Все це пов'язано із фізіологією цих мікроорганізмів та властивостями їх проживання. Так, В.Т. Ємцева, що вивчала екологію спороутворюючих азотфіксуючих бактерій роду *Clostridium*, показала, що деякі з них, наприклад *C. pasteurianum*, у великих кількостях зустрічаються тільки в північних ґрунтах; у ґрунтах південної зони домінують *C. acetobutylicum* але при окультурення ґрунту склад його мікробіоти, в тому числі бацил і клостридій, істотно змінюється та з'являються спороутворюючі види, властиві більш південній зоні.

Гриби є великою частиною сапротрофного мікробного угруповання. Північні ґрунти, які мають кислу реакцію, містять велику кількість мікроскопічних грибів. Взагалі при розкладанні рослинної маси та у поверхневих шарах ґрунту їх біомаса значно більше бактеріальна. У ґрунтах південної зони родовий та видовий склад мікроскопічних грибів різноманітніший, ніж в північних. У перших домінують представники роду *Aspergillus*, а в других – *Penicillium*. Також в ґрунтах північних широт бідніше, ніж у південних, зустрічаються гриби роду *Fusarium*, які особливо рясно розмножуються в каштанових ґрунтах та сіроземах. Деякі види, наприклад *Fusarium sambicinum*, властиві тільки лужним ґрунтам. Види роду *Alternaria* частіше зустрічаються в окультурених ґрунтах, які постійно обробляються. В біогеоценозах напівпустель і пустель на рослинності домінують дріжджі родів *Sporodiobolus*, *Tilletiopsis* і *Sporobolomyces*, що утворюють балістоспори, розсіюються струменями повітря та мають в життєвому циклі стадії, стійкі до посухи – хламідоспори. Чисельність їх видів невелика. Дріжджі в зазначених регіонах живуть в ґрунті на певній глибині – нижче 20 см.

Дуже важливою частиною сапротрофного угруповання, що завжди обов'язково аналізується є актиноміцети. Ця група бактерій надзвичайно велика й її типові форми, які відносяться до аеробів і утворюють міцелій, дуже широко поширені в ґрунті. Як і бацили, стрептоміцети рідко зустрічаються в північних

ґрунтах, але у південних їх чисельність різко зростає, що підтверджується різними методами мікробіологічних досліджень. Слабкий ріст актиноміцетів у ґрунтах північної зони пояснюють уповільненим темпом розкладання органічної речовини і слабкою толерантністю організмів до низьких значень рН. Але такі дані нерідко суперечливі та безсумнівно, що ґрунт південної зони не тільки багатший актиноміцетами, але й має більш різноманітний їх видовий склад. Зміна складу актиноміцетів у різних ґрунтах добре виявляється на прикладі пігментованих культур. Вони набагато більше поширені в ґрунтах, які формуються в умовах теплого клімату. Так, наприклад, види роду *Actinomadura* широко поширені повсюдно, але їх видове різноманіття значно багатше в південних ґрунтах.

Целюлозоруйнівні мікроорганізми. Процес розпаду целюлози, що викликається як бактеріями, так і грибами, представляє істотний інтерес для ґрунтоутворення. Велика частина рослинних залишків складається із целюлози. Вивчення мікроорганізмів, що руйнують її, показало, що їх склад істотно змінюється в різних ґрунтах. У північних ґрунтах (наприклад, тундра) цей процес пов'язаний з діяльністю деяких повільно зростаючих грибів, що відносяться головним чином до родів *Dematium* і *Penicillum*. У південних ґрунтах гриби в значній мірі витісняються раніше зазначеними видами бактерій, й представниками деяких інших родів, наприклад *Cytophaga* і *Chaetomium* ін. Біоценоз такого складу на відміну від північного руйнує целюлозу досить швидко. Даний тип мікроорганізмів (целюлозоруйнівні) вирізняється вимогливістю до джерел азотного харчування. Мікроорганізми північних ґрунтів (в основному гриби), хоча й повільно, ростуть і на бідних азотними сполуками середовищах, а от мікроорганізми південних ґрунтів, що руйнують целюлозу, потребують високого рівня азотного живлення. На півдні процес мінералізації азоту протікає значно енергійніше і, скоріше за все, саме це сприяє розвитку мікроорганізмів, більш вимогливих до умов середовища.

Автохтонна мікрофлора. Автохтонні (від лат. *Autochthonous* – корінна, місцева) мікроорганізми ґрунту розкладають гумусові сполуки. Гумус є комплексом різних за складністю з'єднань, досить стійких до впливу мікроорганізмів. Окремі складові гумусу існують в ґрунті багато сотень років. Інші фракції гумусу, наприклад фульвокислоти, розкладаються відносно легко. Тому при недостатньому надходженні в ґрунт рослинних залишків вміст гумусу в ній істотно знижується, в основному за рахунок фульвокислот.

Серед мікроорганізмів, здатних досить енергійно мінералізувати гумусові сполуки ґрунту, характерні представники роду *Nocardia*, так звані проактиноміцети. Цей рід включає досить багато видів, що розрізняються за морфологічними і фізіологічними ознаками. Гумусові сполуки руйнуються за допомогою проактиноміцетів, які здатні до утворення пігменту червоного кольору – *N. rubra*, *N. coralline* та ін., безбарвні або ті, що утворюють жовтий пігмент форми проактиноміцетів такою здатністю не володіють. Проактиноміцети, які розкладають гумус здатні засвоювати і прості органічні сполуки (амінокислоти, цукру, органічні кислоти тощо). Виходячи з цього, автохтонне угруповання мікроорганізмів слід сприймати як підгрупу сапротрофів, що володіє більш потужним ферментативним апаратом і здатна розкласти складні циклічні сполуки.

Спостереження показують, що чим енергійніше в ґрунтах йдуть процеси мобілізації процесів, тим вище чисельність таких актиноміцетів, як наприклад *Nocardia*. До процесу розкладання гумусу причетні також бактерії родів *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Micromonospora*, *Clostridium* і т. д., а також гриби (види *Penicillium*, *Aspergillus* та інші). Доведено, що чисті культури мікроорганізмів менш активно розкладають гумус, ніж змішані.

Мікроорганізми, що трансформують гумусові сполуки, відіграють значну роль у формуванні всього ґрунтового профілю. Так, накопичення сполук заліза і алюмінію в певних

горизонтах підзолистих ґрунтів пов'язано з руйнуванням мікроорганізмами перегною. Так, наприклад, Т.В. Арістовска показала, накопичення заліза культурами бактерій *Pedomicrobium*, *Seliberia* і інших на середовищах з залізогумусовими комплексами. Це свідчить про використання даними бактеріями гумусової частини як джерела органічних речовин. Вивільнені гідроксиди заліза і алюмінію вступають в реакції з фульвокислотами і сприяють їх випаданню з розчину і закріпленню в алювійному горизонті ґрунту. При надмірному зволоженні в глибоких шарах ґрунту створюються анаеробні умови, де анаеробні бактерії відновлюють окисне залізо.

Зазвичай сапротрофів враховують методом посіву на твердому, а іноді і в рідкі поживному середовищі, що містить ті чи інші органічні речовини. Найбільш часто використовують м'ясо-пептонний (МПА) агар або крохмало-аміачний агар (КАА) на яких добре виявляються бактерії та актиноміцети. Для обліку мікроскопічних грибів частіше використовують підкислений сусло-агар або середовище Чапека. Саме методом висіву на дані поживні середовища було чітко показано, що в ґрунтах північної зони спороутворюючих бактерій та актиноміцетів значно менше, ніж в південних. Це пояснюється тим, що бацили та актиноміцети розмножуються на більш пізніх етапах розкладання рослинних залишків. Крім того, північні ґрунти мають низьке значення рН (кисле), а саме такі умови погано витримують актиноміцети. У південних ґрунтах у порівнянні з північними відносно число грибів зменшується при одночасному зростанні їх видового різноманіття. ґрунти, що обробляються у всіх зонах зазвичай багатші мікроорганізмами, ніж цілинні.

Деякі ґрунти істотно розрізняються по глибинному поширенню мікроорганізмів. Із поглибленням в ґрунт кількість мікроорганізмів поступово зменшується і змінюється їх склад. Зниження чисельності клітин з глибиною до певної міри пов'язано зі зменшенням кількості гумусу в нижчих шарах ґрунту, але пряма кореляція вважається відсутньою. Зазвичай зі збільшенням глибини чисельність мікроорганізмів знижується

більш різко, ніж зменшується вміст гумусу. По мірі заглиблення в ґрунт значно змінюється і склад мікробіоти, – у більш глибоких шарах відносно більше бацил і часто актиноміцетів. Особливо це найчастіше помітно в чорноземах і сіроземах.

Оліготрофні мікроорганізми. Оліготрофи складають велику частину ґрунтової мікробіоти. Більшість із представників цієї групи не ростуть на звичайних поживних середовищах, через їх фізіологічну нездатність витримувати високу концентрацію органічних речовин. Тому вони пристосувались до асимілювання поживних речовини із розчинів з низькою концентрацією як азотовмісних (олігонітрофіли), так і органічних вуглецевмісних (олігокарбофіли) сполук.

Оліготрофні мікроорганізми виконують останні етапи мінералізації органічних сполук. Угрупування цих мікроорганізмів дуже різноманітне, сюди входять багато типових сапротрофів здатних розвиватися на бідних субстратах, а також ряд вельми специфічних видів. Для виявлення цієї групи мікроорганізмів необхідно висівати ґрунтову суспензію на бідні поживні середовища (голодний агар, Ешбі тощо).

Ґрунти, що тривалий час (40 років або більше) перебували під паром містять малу кількість оліготрофів. Ґрунти на яких беззмінно вирощується жито (тобто такі, які щорічно збагачуються поживними залишками) вирізняються достатньо високим рівнем оліготрофів. Ґрунти збагачені органікою, завдяки оліготрофам що руйнують поживні залишки утворюють хороший запас поживних речовин. Відомо також, що часто, чисельність оліготрофів в північних ґрунтах набагато нижча, ніж у південних. Це пояснюють тим, що в холодному кліматі мінералізація органічних сполук відбувається досить повільно. В умовах півдня при достатньому зволоженні життєдіяльність мікроорганізмів більш інтенсивна і органічні залишки швидше руйнуються та оліготрофи розмножуються більш активно.

Значна частина оліготрофів відрізняється незвичайною морфологією і циклом розвитку. Це досить великий комплекс мікроорганізмів, які умовно поділяють на чотири групи.

Перша група – бактерії, що брунькуються. Це дрібні паличкоподібні мікроорганізми, зазвичай вони утворюють протоплазмові гіфи, на кінцях яких формуються бруньки. Після дозрівання останні відокремлюються і дають початок новому організму. Молоді бруньки рухливі. До даної групи відносять види родів: *Hyphomicrobium* із не розгалуженими гіфами; *Pedomicrobium* з розгалуженими гіфами; *Blastobacter*, у яких гіфи не утворюються, але формуються бруньки.

Друга група – простекобактерії. Мають на клітинах вирости (простекії) діаметром 0,3 мкм і менше. Ці вирости представляють собою частину клітини, включаючи клітинну стінку, цитоплазматичну мембрану і цитоплазму. До простекобактерії відносять ряд родів: *Prosthecomicrobium* – паличкоподібні бактерії, що розмножуються поділом, що мають численні загострені вирости до 2 мкм у довжину; *Ancalomicrobium* – близькі по морфології до попереднього, але з більш довгими (понад 2 мкм) пальцевидними виростами і розмножуються брунькуванням; *Labrys* – бактерії з радіально-променевою будовою клітин і розмножуються брунькуванням; *Stella* – мають форму морської зірки з радіально-променевої симетрією, розмножуються поділом. А також до простекобактерій відносять і ряд інших мікроорганізмів.

Третя група – стеблові бактерії. Для них характерні вібріодні або паличкоподібні клітини, що утворюють стеблинки, які оточені загальною із клітиною оболонкою. До формування стеблинки молоді клітини мають джгутики. Стеблинка допомагає їх прикріплюватися до субстрату. У чистих культурах, де щільність популяцій висока, багато клітини прикріплюються один до одного, утворюючи розетки. Розмножуються вони розподілом за допомогою перетяжки. До групи стеблових бактерій входять такі ґрунтові мікроорганізми, як роди *Caulobacter* і *Asticcacaulis*.

Четверта група – тороїдальні, або кільчасті, бактерії. Клітини їх відрізняються вигнутою формою, вони нерухомі, розмножуються поділом. До даної групи відносять види родів: *Microcycclus*, мають вигнуті клітини; *Renobacter* - з папочковидними клітинами і *Spirosoma* – зі спіралеvidними клітинами.

Окремі види оліготрофів беруть участь в розкладанні органічних сполук на різних етапах, проте їх екологія та роль в ґрунтових процесах ще недостатньо вивчені.

Хемолітоавтотрофні та фототрофні мікроорганізми. Ця група в ґрунтах представлена досить різноманітно. Саме (хемолітоавторофи) ці мікрорганізми здатні викликати окислення неорганічних сполук, що утворюються при мікробної трансформації органічних речовин. Найбільш вивчені з них це нітрифікуючі бактерії, діяльність яких характеризує енергію мобілізаційних процесів в ґрунті. Процес розпаду органічних залишків, при яких виділяється NH_3 , який є енергетичним і поживним субстратом для нітрифікаторів, за умов теплішого клімату посилюється. В умовах вертикальної зональності спостерігається аналогічне явище – у міру підйому в гори, де клімат більш суворий, нітрифікаційні процеси знижуються.

Фотолітоавтотрофи, це мікроскопічні істоти, серед яких найбільш типовими є ціанобактерії та еукаріотичні водорості. На підзолистих ґрунтах зустрічаються переважно одноклітинні їх види, такі як – *Chlamydomonas*, *Chlorococcum*, *Chlorella*, а також деякі нитчасті зелені або жовто-зелені водорості, іноді діатомові. В хвойних лісах часто знаходять ціанобактерії. В умовах арктичних пустель і тундри, на поверхні і в глибині ґрунту розвиваються переважно зелені і жовто-зелені водорості, а також багато азотфіксуючих ціанобактерій. Під час утворення гумусу в ґрунті відзначається явне розростання водоростей, серед яких значна кількість видів ціанобактерій, в тому числі й азотфіксаторів – *Nostoc*, *Calothrix*, *Anabaena*, *Tolypothrix* та інші. На поверхні каштанових ґрунтів утворюються

плівки водоростей, серед яких переважають ціанобактерії, в тому числі й азотфіксатори.

Таким чином стає зрозуміло, при окультуренні ґрунту в мікробному ценозі виникають суттєві зміни. Збільшується чисельність мікробного населення, в ценозі з'являються організми, властиві певній ґрунтовій зоні. Як, про це, наприклад, свідчить зміна целюлозоруйнівних мікроорганізмів, склад яких різко змінюється при внесенні добрив. Отже, мікроорганізми необхідно використовувати для аналізу типу і стану ґрунту перед та після внесення будь яких добрив або зміни типу її обробки.

14.2 Методи вивчення біорізноманіття мікробних спільнот. Визначення чисельності, складу і активності ґрунтових мікроорганізмів

Більшість мікроорганізмів мають дуже динамічну ферментативну систему, і тому, часто характеризуються високою здатністю пристосування до різних умов навколишнього середовища та швидкою реакцією на зміни в ньому. Саме через це, визначення їх біорізноманіття та активності використовують для контролю екологічного стану ґрунту. У багатьох національних та міжнародних програмах моніторингу якості ґрунту вимірювання мікробної активності є одним із важливих заходів біоіндикації.

Прямі методи визначення чисельності мікроорганізмів.

Перш за все, при визначенні складу та активності ґрунтових мікроорганізмів постає питання про загальний кількісний аналіз мікроорганізмів ґрунту. Найбільш об'єктивним та простим вважається метод прямого мікроскопіювання ґрунту по Виноградському. Відповідно до цього методу готують ґрунтову суспензію і під мікроскопом у певному її обсязі підраховують загальну кількість мікроорганізмів. При підготовці ґрунтової суспензії доцільно використовувати один з рекомендованих способів диспергування ґрунту із десорбцією мікроорганізмів з

ґрунтових частинок та без десорбції. За необхідності проводити десорбцію використовують такі методи як розтирання ґрунту, обробка поверхнево-активними речовинами, ультразвуком тощо. Далі перерахунком встановлюють, скільки мікроорганізмів припадає на 1 г досліджуваної ґрунту. Для чого готують препарати на предметному склі за Виноградським і переглядають за допомогою оптичного мікроскопу. У полі зору можна бачити паличкоподібні бактерії, дрібні та великі коки, обривки міцелію грибів та актиноміцетів та інші мікроорганізми. Визначення числа бактеріальних клітин прямим мікроскопіюванням полегшується при використанні люмінесцентного мікроскопа та барвників. При цьому мікроорганізми краще видно серед дрібних частинок ґрунту. Барвниками можуть служити акридиновий помаранчевий, ізотіоціанат та ін.

При фарбуванні акридиновим помаранчевим червоного кольору набувають мертві клітини, а зеленого – живі. Для забарвлення міцелію і встановлення його довжини при прямому мікроскопіюванні використовують діацетат флуоресцеїну. Іноді для підрахування кількості мікроорганізмів у ґрунті використовують капіляри Перфільєва і Габе. Такі капіляри являють собою мікрокапілярну камеру, глибина якої не перевищує 30-40 мкм, а ширина – не більше діаметра поля зору мікроскопа – 60-70 мкм. Зазвичай, це тонкі скляні трубки, що розділенні плоскопаралельними стінками які розділяють її на окремі прямокутні секції. Такий капіляр занурюють у суспензію мікроорганізмів, які втягуються в нього та розташовуються через малий просвіток поодинокі. При необхідності краї капіляра закривають зі допомогою парафіну. Такий капіляр розташовують строго по центру поля зору мікроскопу та підраховують кількість мікроорганізмів. Іноді для полегшення додають барвник, переважно акридиновий помаранчевий. Підрахувавши число мікроорганізмів в капілярі, можна також зробити перерахунок на 1 г ґрунту.

Для проведення обліку ґрунтових водоростей необхідно, в першу чергу, неозброєним оком проглянути поверхню ґрунту. При наявності розростань водоростей на поверхні ґрунту застосовують пряме мікроскопіювання ґрунту в краплі води «роздавлена крапля». Таким чином виявляють ті водорості, що утворюють мікроскопічно помітні таломі (*Nostoc commune*, *Nostoc flageliforme*) чи масові розростання на поверхні ґрунту – *Microcoleus vaginatus*. Облік водоростей на поверхні ґрунту ведуть на площу. Наприклад, збирають колонії з 1 м² або 1 дм² і визначають їх масу.

Для прямого підрахунку мікроорганізмів ґрунту використовують також електронну мікроскопію, за допомогою якої поряд зі звичайними видами можна виявити безліч дрібних форм мікроскопічних істот. Для прямого аналізу мікрофлори ґрунту застосовують також скануючий електронний мікроскоп, який дає об'ємне зображення аналізованих об'єктів.

Прямі методи дають уявлення про загальну чисельність мікроорганізмів у ґрунті. Однак зовнішній вигляд мікроорганізмів, як правило, не дозволяє судити про їх видову приналежність та функції. Визначити приналежність мікроскопічних істот, виявлених в ґрунті, до різних систематичних і фізіологічних груп можна за допомогою різноманітних прийомів та тестів – мікробіологічних, біохімічних, молекулярно-генетичних тощо.

Непрямі методи визначення чисельності мікроорганізмів. Основним непрямим методом визначення чисельності мікроорганізмів є стандартний метод підрахунку колоній, суть якого полягає у підрахунку життєздатних мікроорганізмів за допомогою посіву на поживні середовища, на яких мікробні клітини в процесі ділення утворюють колонії, видимі неозброєним оком. Цей метод передбачає подрібнення і гомогенізацію зразка, його розчинення в розчиннику (вода, фізіологічний розчин). Потім певна кількість гомогенату, розведеного в розчиннику, висівають на тверде (агаризоване) середовище (поверхневим або глибинним методом) та

інкубують при відповідній температурі протягом певного часу. Після чого підраховують всі видимі колонії вручну або із використанням лічильника колоній. Такий метод найбільш широко використовується для визначення числа життєздатних клітин або колонієутворюючих одиниць (КУО) в ґрунті, біопрепаратах, харчових продуктах тощо. Кількість виявлених мікроорганізмів розглядається як функція наступних факторів: систематичної групи мікробіоти продукту; обраного методу дослідження; складу щільних поживних середовищ; температури і часу інкубації; рН, вологості і окислювально-відновного потенціалу щільних поживних середовищ; відносної кількості мікроорганізмів в зразку; наявності інших конкурентних або антагоністичних організмів.

Найчастіше в цьому методі використовують глибинний посів, однак не можна виключати використання поверхневого посіву, тому що результати обох методів цілком порівнянні та повинні бути орієнтовані на потреби самих мікроорганізмів які будуть вирощуватися (в першу чергу їх відношення до кисню). Розчинений методом серійних розведень зразок в кількості 0,1, 0,5 або 1,0 мл наноситься на поверхню живильного середовища. Потім за допомогою вигнутого скляного або пластикового шпателя зразок круговими рухами рівномірно розподіляється по всій поверхні чашки Петрі. При використанні цього методу посіву зберігаються чутливі до високої температури псіхрофіли, тому що мікроорганізми не контактують з гарячим розплавленим агаром. Для строгих аеробів кращий поверхневий посів, але мікроаерофільні організми при такому посіві мають тенденцію до повільного зростання. При посіві на поверхню агару необхідно рівномірне розтирання зразка, чого важко досягти на вологій поверхні. Уникнути цього незручності можна короткочасним підсушуванням агаризованого середовища в боксі.

Також існує прибор для автоматичного посіву мікроорганізмів, що називається - спіральний плоттер в якому використовується метод спірального посіву. Спіральний

плоттер - механічний пристрій, що розподіляє рідкий гомогенат по поверхні обертової чашки Петрі, що містить відповідне щільне агаризоване середовище (рис. 14.2). Спіральний посів відбувається від центру пластини до її країв, розподіляючи зразок по Архимедовій спіралі, спеціальним прикріпленим шприцом, який вносить зразок та безперервно зменшує його обсяг так, що концентрація в центрі і на краю досягає співвідношення 10 000:1. Інкубація посіву в термостаті дозволяє виявити, що кількість внесених мікроорганізмів більше в центрі пластини на відміну від краю. Після посіву зразка за допомогою спірального плоттера колонії підраховують, використовуючи так звану сітку для підрахунку



Рис. 14.2. Загальний вигляд спірального плоттера.

Використання спірального плоттера дозволяє суттєво зменшити кількість агару, що використовується; менше чашок, розчинника і піпеток; протягом 1 год може бути проаналізовано в три-чотири рази більше зразків і загалом знижують витрати на мікробіологічний посів на 75 %. Сучасні моделі плоттерів дозволяють посіяти одну чашку за 25 секунд. Все це завдяки тому, що цей метод дозволяє не виконувати серійні розведення зразка, які необхідні при традиційному способі посіву, які забирають багато часу. Один спіральний посів дозволяє заощадити мінімум три чашки живильного середовища, що істотно скорочує час операції і витрата матеріалів (рис. 14.4).

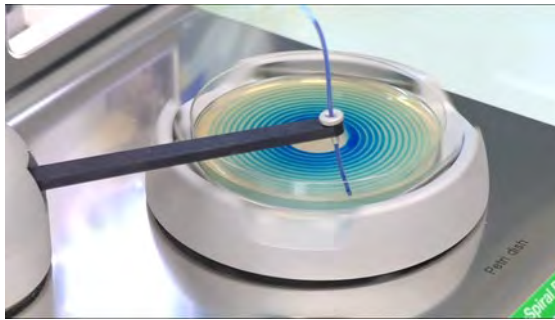


Рис. 14.3. Загальний вигляд процесу посіву спіральним методом на плоттері



Рис.14.4. Чашка Петрі засіяна спіральним методом

Склад окремих груп мікроорганізмів (бактерії, актиноміцети, гриби та ін.) може бути більш конкретно охарактеризований висівом ґрунтової суспензії на різні тверді поживні середовища, на яких розвиваються колонії тих чи інших груп мікроорганізмів. На практиці зазвичай використовують агаризовані або желатинізовані, а іноді й силікагелеві поживні середовища (тверді поживні середовища).

Після інкубації чашок Петрі, які засівалися ґрунтовими суспензіями рахують колонії мікроорганізмів, що вирости. Припускаючи, що кожна колонія утворилась із однієї клітини того чи іншого мікроорганізму, встановлюють кількість клітин у вихідному зразку ґрунту. Тобто, підраховують кількість колонієутворюючих одиниць – КУО. Подібний перерахунок має ряд умовностей. Наприклад, бактеріальні колонії можуть

вирости на поживному середовищі не з однієї клітини, а з групи клітин, що залишилися не розділені в ґрунтовій суспензії. Колонії грибів та актиноміцетів виростають як із уривків міцелію різної величини, так і з їх спор. Диференціювати колонії, утворені зі спор або міцелію зазначених мікроорганізмів, неможливо. Тому правильніше насиченість ґрунтів міцеліальними мікроорганізмами враховувати, вимірюючи довжину їх міцелію при прямому мікроскопіюванні.

Також, значний інтерес становить приблизне співвідношення числа мікроорганізмів, підраховуваних в одній і тій же пробі ґрунту різними методами. Данні отримані прямим та не прямим методом для однієї й тої ж самої проби будуть відрізнятися. Перед усім ця різниця пов'язана із тим, що при прямому підрахунку за допомогою мікроскопу ми враховуємо і мертві і живі клітини. Число мертвих клітин може сягати 25 % від загального їх числа.

Облік чисельності окремих фізіологічних груп мікроорганізмів. Для аналізу ґрунтів обов'язково враховують число окремих фізіологічних груп мікроорганізмів. Це проводиться класичним мікробіологічним методом визначення титру, при якому тверді або рідкі диференційно-діагностичні поживні середовища засівають різними розведеннями ґрунтової суспензії. Після вирощування в термостаті відзначають той ступінь розведення, в якій є група мікроорганізмів що досліджується, і простим перерахуванням визначають чисельність представників даної групи в ґрунті. Таким чином дізнаються, наскільки багатий ґрунт нітрифікаторами, актиноміцетами, целюлозоруйнівними, сульфат-відновлювальними або іншими мікроорганізмами.

Цей же метод використовують для обліку ґрунтових водоростей і найпростіших. Для водоростей беруть мінеральні середовища, які після засіву серії розведень ґрунтової суспензії витримують при штучному освітленні. При обліку найпростіших таким методом беруть середовища, що містять мікроорганізми, якими найпростіші можуть харчуватися.

Для більш повної характеристики типу ґрунту та його стану важливі не лише показники чисельності різних груп мікроорганізмів, але й аналіз стану в ґрунті представників окремих родів і видів. За рідкісним винятком, фізіологічні групи мікроорганізмів дуже різноманітні. Навколишнє середовище може різко змінювати їх видовий склад, але майже не відбивається на числі фізіологічних груп. Тому при аналізі ґрунту важливо встановити стан окремих видів мікроорганізмів.

В останні роки дослідники прагнуть виявити мікроорганізми, характерні для певних ґрунтів, але список подібних індикаторних мікроорганізмів поки невеликий. Уже зараз визначення індикаторних мікроорганізмів допомагає встановити тип ґрунту, ступінь його виснаження та передбачити характер впливу на ґрунт агротехнічних і агрохімічних прийомів. Наприклад, важлива роль в ґрунті належить нітрифікувальним бактеріям, діяльність яких приводить до накопичення нітратів і цей процес є одним із показників окультурення ґрунтів. Відомо, що представники роду *Azotobacter*, які характеризуються високою чутливістю до стресових факторів і слугують своєрідним показником екологічного стану довкілля, віддають перевагу існуванню в гумусових ґрунтах із нейтральним рН, достатньою кількістю органічної речовини та вологи. Тому, представники азотобактера часто зустрічаються в зоні чорноземів та майже не зустрічаються в неокультурених ґрунтах через що, іноді їх вважають, так званим, індикатором «урбаногенезу».

Також інтегральним показником, що характеризує біологічну активність ґрунту і одним із критеріїв її родючості вважається стан ферментів циклу азоту порушення їх нормального балансу дозволяє судити про процеси, що протікають в ґрунті. Відомо що, оліготрофи (азотфіксувальні або діазотрофи) відіграють важливу роль у формуванні азотного балансу ґрунту та здатні до асиміляції молекулярного азоту атмосфери і трансформації його в доступну рослинам аміачну форму. Всі представники цієї еколого-трофічної групи

здатні фіксувати атмосферний азот, збагачуючи при цьому ґрунт біологічним азотом.

Також, окремі етапи циклу азоту є індикаторами забруднення, інші свідчать про процеси ремінералізації ґрунту та його здатності до самоочищення від забруднювачів. Процес нітрифікації в антропогенно забруднених ґрунтах є показником їх санітарного стану і ступеня самоочищення. У забруднених ґрунтах швидкість утворення нітратів може служити важливим показником біологічної активності і родючості ґрунту: придушення нітрифікації може свідчити про розвиток сапрофітних бактерій, які здійснюють розпад продуктів гниття.

Так, ми розуміємо, що для інтерпретації результатів важливо розуміти роль кожної із еколого-трофічних груп мікроорганізмів у ґрунті та їх місце в кругообігу елементів живлення. Та все це демонструє нам повну картину біохімічних процесів які відбуваються на певній ділянці, що дає нам змогу із впевненістю розуміти які біологічні чи хімічні препарати потрібні для успішної сільськогосподарської діяльності на тому чи іншому ґрунті.

Також, незважаючи на те, що для кількісної оцінки ґрунтових бактерій використовується ряд різноманітних методів, визначення оптимальних методів для чисельності бактерій у ґрунті все ще залишається під питанням. Не існує жодного методу для визначення абсолютної кількості мікробів за допомогою мікробіологічних методів через неможливість культивування на певних мікроорганізмів на існуючих середовищах. Про існування некультивованих форм стало відомо завдяки багатьом новітнім генетичним методам (виділення ДНК з ґрунту для дослідження ризосферних мікробіоценозів тощо), а також, наприклад, вважається високоефективним метод епіфлюорисцентної мікроскопії оскільки він надає інформацію про мінеральні частинки ґрунту, живі бактерії та мертві бактерії.

14.3. Стерильність

Асептика (а – заперечення, грецьк. septicos – гнійний) – це комплекс заходів, спрямованих на попередження проникнення мікроорганізмів у певний об'єкт (операційне поле, бокс, приміщення, стерильний розчин, лікарський препарат тощо).

Стерилізація – це процес знищення або фізичного видалення всіх форм життєдіяльності мікробів, включаючи вегетативні клітини, спори та віруси з поверхні, середовища або виробу. Основними причинами контролю мікроорганізмів є:

1. Запобігати передачі хвороб та інфекцій;
2. Запобігати забрудненню небажаними мікроорганізмами;
3. Запобігати псуванню та псуванню матеріалів мікроорганізмами.

Використовувані методи стерилізації залежать від мети, для якої проводиться стерилізація, матеріалу, який необхідно стерилізувати, та природи мікроорганізмів, які необхідно знищити. Різні засоби, що використовуються при стерилізації, можна об'єднати у фізичні та хімічні агенти.

Фактори навколишнього середовища, що впливають на мікроорганізми:

1. Фізичні (температура, тиск, різні види випромінювання, ультразвук)
2. Хімічні (речовини, що діють бактеріостатично або бактерицидно)
3. Біологічні (живі організми: різні види мікро- і макроорганізмів)

Дія температури на мікроорганізми

Температурний діапазон, у якому можуть існувати мікроорганізми, досить широкий від -253°C до 100°C і більше (для спорових форм бактерій).

Дія високих температур

На ефекті дії високих температур засновані методи стерилізації, що використовують у фармацевтиці, медицині, мікробіології.

Стерилізація (від лат. sterilis – безплідний) - повне звільнення об'єкту від живих мікроорганізмів всіх видів і форм розвитку.

У мікробіологічних дослідженнях при визначенні еколого-трофічних груп мікроорганізмів стерильними повинні бути живильні середовища та посуд для культивування мікроорганізмів.

Методи стерилізації:

- Механічні;
- Фізичні;
- Хімічні.

Механічні методи стерилізації (фільтрування):

Діаметр пор фільтру не більше 0,3 мкм

Фізичні (термічні) методи стерилізації:

1. Автоклавування (насиченою парою під тиском)
2. Текучою парою
3. Тиндалізація
4. Сухим жаром
5. У полум'ї пальника

Фізичні агенти (фізичні методи):

• Сонячне світло

Пряме сонячне світло має активну бактерицидну дію завдяки поєднаній дії ультрафіолетового випромінювання та тепла. Це природний метод стерилізації.

• Сушка

Волога необхідна для росту бактерій. Таким чином, сушка на повітрі має згубний вплив на багато бактерій. Але сушіння не впливає на спори. Таким чином, це не дуже надійний метод.

• Тепло

Тепло чинить згубну дію на мікроорганізми і є одним з найпопулярніших надійних методів знищення. Мікроорганізми мають мінімальну, оптимальну та максимальну температуру росту. Температура нижче мінімальної зазвичай спричиняє статички (гальмування метаболізму).

Температура вище максимальної, як правило, вбиває мікроорганізми. Це відбувається тому, що біохімічні зміни в клітинах органічних молекул призводять до їх загибелі. Ці зміни виникають внаслідок змін у молекулах ферментів або хімічного руйнування структурних молекул, особливо в клітинних мембранах. Тепло також відганяє воду, і ця втрата води може бути смертельною для організмів.

Згубний вплив тепла може бути виражений як функція часу та температури. Кожен вид мікробів має час термічної(теплової) смерті (ЧТС). Це мінімальний час, необхідний для знищення популяції мікроорганізмів у мікробній суспензії при заданій температурі та за певних умов. Кожен вид також має Термічну точку смерті (ТТС), температуру, при якій він гине протягом певного часу. При визначенні часу та температури руйнування мікробів за допомогою тепла враховуються наступні фактори.

1. Тип організму, що знищується;
2. Тип матеріалу, що обробляється;
3. Наявність органічних речовин;
4. Кислотна або основна природа матеріалу.

Різновиди тепла:

А) Сухе тепло

Багато предметів найкраще стерилізувати за відсутності води методом сухої теплової стерилізації; знищення сухим теплом відбувається внаслідок денатурації білка, окисного пошкодження та токсичної дії підвищеного рівня електролітів.

Методи стерилізації сухим теплом

- **Спалювання**

Інокулювальні петлі та щипці можуть прогріватися у полум'ї пальника Бунзена, поки вони не розпечуться (зі склом, папером та ватою необхідно бути дуже обережними). Це чудовий метод швидкого знищення патологічного або надлишкового матеріалу.

- **Сухожарова шафа (Сухожар)**

Це найпоширеніший метод стерилізації сухим теплом. Піч із гарячим повітрям використовує сухе тепло для стерилізації. Цей тип енергії не проникає легко в матеріали, і тому необхідні тривалі періоди впливу високої температури. Наприклад, при температурі 160°C для знищення спор бактерій потрібно 2 год. Сухожар використовується для стерилізації скляного посуду, щипців, ножиць, скальпелів, скляних шприців, рідкого парафіну, порошку та ін. Використовується період витримки 160°C протягом години. Матеріали в сухожарі слід розташовувати таким чином, щоб забезпечити вільну циркуляцію гарячого повітря між предметами. Не слід перевантажувати його. Скляні вироби повинні бути ідеально сухими перед тим, як їх помістити всередину сухожару. Пробірки, колби тощо повинні бути загорнуті у папір. Перед відкриттям дверцят слід дати охолонути сухожару близько 2 год, оскільки скло може тріснути внаслідок раптового або нерівномірного охолодження.

Методи термічної стерилізації:

– **Пастеризація** – це спосіб температурної обробки, при якому інактивується більшість вегетативних форм бактерій, окрім спор.

Низька пастеризація – 60-70°C протягом 20-30 хв;

Висока пастеризація – 72°C протягом 15-60 с;

Миттєва пастеризація – 90°C протягом кількох секунд;

Ультрапастеризація – 150°C протягом 0,75 с.

– **прожарювання у полум'ї або фломбування**. Цей метод дає гарні результати при стерилізації невеличких за розмірами лабораторних інструментів, які не псуються під дією

вогню. Фломбуванням стерилізують бактеріологічні петлі, голки, кінчики пінцетів та деякі інші металеві предмети;

– **стерилізація кип'ятінням.** Проводиться у спеціальних стерилізаторах, куди заливають дистильовану воду. На дно стерилізатора вміщують марлю або вату. Стерилізацію проводять протягом 30 хвилин.

– **Стерилізація у полум'ї пальника**

Режим стерилізації: $t = 156^{\circ}\text{C}$.

При прокалюванні згорають вегетативні і спорові форми мікроорганізмів

Об'єкти: бактеріальні петлі, пінцети, предметне скло, деякі інструменти (голки, крючки, лопаточки).

– **стерилізація сухим жаром.** Проводиться у спеціальній сушильній шафі при температурі $160\text{--}170^{\circ}\text{C}$ протягом 2 годин. Стерильні предмети виймають з сушильної шафи, коли температура знизиться до кімнатної. Сухим жаром стерилізують скляний посуд (пробірки, воронки, піпетки, конічні колби Ерленмейера тощо);

Стерилізація сухим жаром (Повітряна стерилізація у сухожаровій шафі).

Режим стерилізації: $t = 180^{\circ}\text{C}$ – 60 хв; або 160°C – 150 хв.

Об'єкти стерилізації: Термостійкі порошки (натрій хлорид, оксид цинку, тальк, біла цегла та ін.), вироби із скла, металів, силіконової гуми, фарфору.

– **дробна стерилізація текучою парою або тиндалізація** використовується для знепліднення поживних середовищ, які змінюють свій склад і властивості при температурі понад 100°C . Суть її полягає в нагріванні середовища у парах киплячої води при температурі 100°C тричі по 30 хв протягом трьох діб. Короткотривале прогрівання кип'ятінням знищує тільки вегетативні клітини мікроорганізмів. Витримка середовищ протягом доби при кімнатній температурі або в термостаті при 30°C дає змогу прорости життєздатним спорам. Вегетативні клітини, які утворюються з термостійких спор, гинуть при повторному кип'ятінні. Дробову стерилізацію поживних

середовищ проводять в кип'ятильнику Коха або автоклаві без підвищеного тиску.

Методи дробної стерилізації.

Стерилізацію проводять для того, щоб позбутися спорових форм бактерій (табл. 14.1).

Таблиця 14.1

Види стерилізації

	ТЕКУЧОЮ ПАРОЮ	ТИНДАЛІЗАЦІЯ
Режим	100 °С і нижче 30 хв. 3 рази	при 60-65°C 5 разів при 70-80°C 3 рази по 60 хв
Використовують	автоклав з привідкритою кришкою або апарат Коха.	водяну баню
Об'єкти стерилізації	розчини з вуглеводами, вітаміни, молоко та ін. матеріали, що змінюють властивості при температурі вище 100°C.	речовини, що денатуруються при температурі 100°C (вітаміни, деякі очні краплі та ін).

– **стерилізація насиченою паром під тиском – автоклавування.** Найбільш надійним способом стерилізації поживних середовищ, посуду і матеріалів є стерилізація паром в автоклаві. При звичайному атмосферному тиску температура водяної пари дорівнює 100°C. При підвищенні тиску пари температура її значно підвищується (табл.14.2).

Таблиця 14.2

Особливості режимів стерилізації автоклава

Тиск пари, атм	Температура, °С	Час стерилізації, хв
0	100	30-60
0,5	111	20-30
1,0	121	15-20
1,5	127	15-20

Спільна дія високої температури та тиску пари спричиняють швидку загибель не тільки вегетативних клітин мікробів, а і їхніх спор.

Стерилізуючим агентом при цьому є водяна пара під надлишковим тиском.

Ефективність стерилізації досягається тільки при одночасному поєднанні:

- *необхідної температури,*
- *достатнього тиску,*
- *часу дії.*

Режими парової стерилізації:

- 132°C, 2 атмосфери 20 хв – основний режим. Стерилізують всі вироби (скло, метал, текстиль, крім гумових)
- 120°C, 1,1 атмосфера 45 хв – щадний режим. (скло, метал, гумові вироби, полімерні вироби)
- 110°C, 0,5 атмосфери 180 хв – особливо щадний режим (нестійкі препарати, поживні середовища).

Методи променеві стерилізації

1. УФ-стерилізація

Об'єкти УФ-стерилізації: поверхні, повітря, вода.

2. Радіаційна

Радіаційна стерилізація гама- або бета-випромінювання; ізоотоп кобальту-60 або цезію-137

Об'єкти стерилізації: одноразові вироби із полімерних матеріалів, ріжучих інструментів, шовний и перев'язувальний матеріал, деякі лікарські препарати.

На ефекті дії хімічних речовин на мікроорганізми побудовані: хімічна стерилізація, дезінфекція, антисептика.

Хімічна стерилізація:

- Газова («холодна»);
- Плазмова;

- Хімічна стерилізація розчинами (пероксид водню, суміш пергідролю та мурашиної кислоти, біанол, гігасепт, аноліт).

До холодної стерилізації відноситься: фільтрування, дія різними фізичними факторами або хімічними речовинами. Фільтрування застосовують для рідин, які змінюють свої властивості при нагріванні, а також для очистки бактеріальних токсинів, фатів і різних продуктів життєдіяльності бактерій. Фільтрування проводять крізь спеціальні дрібнопористі фільтри. Фільтри затримують мікроорганізми завдяки структурі матеріалу, з якого вони складаються.

Існує два основних типи фільтрів – глибинні та мембранні.

Глибинні фільтри складаються з волокнистих або гранульованих матеріалів, які спресовані, звиті або зв'язані в лабіринт проточних каналів. Частинки затримуються в них в результаті адсорбції і механічного захоплення в матеріалі фільтру. Мембранні фільтри мають безперервну структуру, одержують з нітроклітковини, і захоплення ними частинок визначається в основному розміром пор. Як кінцевий процес фільтрування менш надійне порівняно зі стерилізацією паром, через значну ймовірність проходження мікроорганізмів крізь фільтр. Застосовується для стерилізації рідких поживних середовищ та інших рідких матеріалів.

Б) Вологе тепло

Вологе тепло вбиває мікроорганізми, згортаючи їх білки, і це набагато швидше і ефективніше, ніж сухе тепло, оскільки молекули води проводять тепло краще, ніж повітря. Тому потрібна нижча температура та менший час витримки, ніж для сухого тепла. Вологе тепло легко вбиває віруси, бактерії, гриби тощо.

• Кип'ятіння

Більшість вегетативних форм бактерій та грибів гине майже відразу при 90-100°C, але спороутворюючі бактерії, вимагають значного періоду кипіння. Окрім не вважається стерилізуючим засобом, оскільки не завжди можна гарантувати

знищення спор бактерій та інактивацію вірусів. За звичайних обставин більшість видів мікробів можуть бути вбиті протягом 10 хв. Однак спори бактерій та грибів, цисти найпростіших та великі концентрації вірусів гепатиту А потребують впливу до 30 хв або більше, оскільки існує недостатня інформація про термостійкість багатьох мікроорганізмів.

Окріп не є надійним для стерилізації інструментів для хірургічних процедур.

У тих випадках, коли кип'ятіння вважається достатнім, матеріал слід занурити у воду та кип'ятити протягом 10-30 хв. Протягом цього періоду кришку стерилізатора не слід відкривати. Додавання невеликої кількості кислоти, лугу або пральної соди підвищить ефективність процесу.

- ***Стерилізація вище 100°C (пара під тиском)***

Пар під атмосферним тиском використовується для стерилізації поживних середовищ, які можуть розкладатися під впливом більш високої температури. Стерилізатор Коха або Арнольда – це інструмент, який виробляє текучу пару.

Ємність і середовище одночасно стерилізують, а випаровуванню з середовища запобігають. Одна експозиція протягом 90 хвилин зазвичай забезпечує повну стерилізацію середовища. Це недорогий метод.

Тепло у вигляді насиченої пари під тиском є найбільш практичним і надійним агентом для стерилізації. Пара під тиском забезпечує температуру вище тієї, яку можна отримати кип'ятінням. Крім того, він має переваги швидкого нагрівання, проникнення та надлишку вологи, що полегшує згортання білка мікроорганізмів та призводить до повного знищення всіх форм життєдіяльності мікробів, включно з бактеріальними ендоспорами. Важливо відзначити, що стерилізуючим засобом є вологе тепло, а не тиск. Апарат, що призначений для використання пари під регульованим тиском, називається автоклавом. По суті, це парова камера з подвійною оболонкою, обладнана пристроями, які дозволяють заповнювати камеру насиченою парою та підтримувати її при розрахунковій

температурі та тиску протягом будь -якого періоду. Час знищення найбільш стійкої спори бактерії скорочується до 15 хвилин. Для щільніших предметів може знадобитися до 30 хвилин експозиції.

- **Фільтрація** – це процес видалення мікроорганізмів з рідини або газів за допомогою механічного пристрою, відомого як фільтр. Це відмінний спосіб зменшити мікробну популяцію в розчині термолабільних матеріалів, таких як сироватки, розчини антибіотиків, розчинів вуглеводів, що використовуються у підготовці поживних середовищ тощо. Коли рідина проходить через фільтр, мікроорганізми затримуються в порах фільтруючого матеріалу. Розчин, який капає через фільтр, збирається в стерилізовану раніше ємність. Пористість, електричні заряди фільтра, електричний заряд, що переноситься організмами, природа рідини, що фільтрується тощо, можуть впливати на ефективність фільтрації.

Типи фільтрів: фільтр Seltz, фільтр Беркефельда, мембранний фільтр, вискоефективний фільтр твердих частинок повітря (HEPA).

- **Опромінення**

Процес опромінення організмів будь-яким випромінюванням, таким як УФ-промені, рентген, гамма-промені тощо, відомий як опромінення. Опромінення – ефективний метод стерилізації. Для стерилізації використовують два типи випромінювання.

а) Неіонізуюче випромінювання

- УФ-випромінювання
- Інфрачервоне випромінювання

б) Іонізуюче випромінювання

- Рентгенівські промені
- Гамма-промені

Хімічні методи

Фізичні засоби для контролю мікроорганізмів, як правило, призначені для стерилізації. Натомість від них очікується лише знищення патогенних організмів в результаті видалення патогенних мікроорганізмів, що називається дезінфекцією.

Дезінфекція (фр. des – від, лат. infectio - зараження) Знищення патогенних і умовно – патогенних мікроорганізмів в об'єктах зовнішнього середовища з метою розриву шляхів передачі збудників від джерела інфекції до сприйнятливих людей

Основна задача дезінфекції – припинення механізму передачі збудника знезараженням різних об'єктів (вода, поверхні, харчові продукти, повітря, предмети).

Дезінфікуючий засіб – це як правило, хімічна речовина, яка вбиває патогенні мікроорганізми на/в живих об'єктах. Дезінфектант не обов'язково повністю стерилізує предмет, оскільки може залишитися кілька мікроорганізмів та життєздатних спор.

Хімічні агенти, які наносяться на тіло для запобігання зараженню або видам, називаються антисептиками. Антисептик запобігає росту або дії мікроорганізмів, знищуючи їх або пригнічуючи їх ріст та обмін речовин.

Протимікробний засіб зазвичай називають герміцид. Дезінфікуючий засіб або антисептик може бути особливо ефективним проти певної групи, так звані бактерициди, фунгіциди або проти водоростями. Деякі хімічні речовини не вбивають мікроорганізми, але тимчасово перешкоджають їх розмноженню. Багато різних хімічних речовин доступні для використання як дезінфікуючі засоби, і кожна має свої переваги та недоліки.

Основні групи дезінфектантів:

Спирти: Етанол, пропанол, ізопропанол

Галоїди : хлоровмісні препарати; сполуки на основі бром; сполуки на основі йоду

Окисники: пероксид водню; калій перманганат

Гуанідини

Альдегідвмісні

Поверхнево активні речовини

Характеристика ефективного дезінфікуючого засобу

Дезінфікуючий засіб повинен бути ефективним проти широкого спектру інфекцій/агентів, при великих розведеннях та у присутності органічних речовин.

Хімічна речовина повинна бути токсичною для збудників інфекції, але вона не повинна бути токсичною для людей або корозійною при зберіганні, безбарвною з приємним запахом, розчинною у воді та ліпідах для проникнення в мікроорганізми та мати низький поверхневий натяг, щоб вона могла проникати у поверхні. Якщо можливо, дезінфікуючий засіб має бути порівняно недорогим.

Фактори, що впливають на ефективність хімічних дезінфікуючих засобів:

1. Розмір мікробної популяції
2. Природа наявних мікробів
3. Концентрація та характер дезінфікуючого засобу
4. Тривалість впливу
5. Температура
6. Середовище існування

Основна дії дезінфікуючого засобу:

1. Коагуляція білка
2. Порушення клітинної мембрани, що призводить до загибелі клітин.
3. Видалення вільних сульфгідрильних груп, які необхідні для функціонування ферментів, а отже, і життя клітин.
4. Пригнічення дихання катаболічних/анаболічних реакцій.
5. Втрата цілісності мембрани, що призводить до витоку таких важливих складових, як катіони калію, неорганічний фосфат, пентоза, нуклеотиди, нуклеозиди та білки.

Основна група хімічних агентів: фенольні та фенольні сполуки, спирти, важкі метали та їх сполуки, барвники, мило та миючі засоби, альдегіди, газоподібні агенти.

Антисептика (грецьк. anti - проти, septicos – гнійний) знищення патогенних або умовно-патогенних мікроорганізмів на шкірі або слизових оболонках макроорганізму. Антисептика – це щадна дезінфекція стосовно людини.

За механізмом дії на мікроорганізми:

- Мембраноатакуючі (порушують проникність клітинної оболонки мікробів)
- Деструктивні (денатурують білок мікробної клітини)
 - Антиферментні (блокують важливі ферментативні процеси)
 - Окисні
 - Антиметаболічні

Бактерицидна активність антисептиків залежить від:

- хімічної структури
- температури
- середовища (лужне, нейтральне, кисле)
- наявності білкових речовин, які є живильним середовищем для бактерій; у присутності білків бактерицидна активність більшості антисептиків різко падає.

За спектром протимікробної дії:

- Універсальні
- Широкого спектру
- Помірного спектру
- Вузького спектру

За кінцевим ефектом:

- Мікробоцидні
- Мікробостатичні
- Знижуючі чисельність мікробної популяції

За складом:

- Монопрепарати
- Багатокомпонентні засоби

14.3.1. Дезінфекція лабораторних приміщень

Підлогу, стіни та меблі в мікробіологічній лабораторії очищують пилососом і протирають розчинами дезінфікуючих речовин. В якості дезінфікуючих розчинів найчастіше користуються 2-3% розчином соди (бікарбонату натрію), 3-5% розчином фенолу (карболової кислоти) або лізолу, 0,5-3% водним розчином хлораміну та іншими дезінфектантами. Повітря в лабораторії найбільш просто дезінфікувати провітрюванням.

Більш ефективний і найбільш часто вживаний спосіб дезінфекції повітря опромінення ультрафіолетовими променями з довжиною хвилі від 200 до 400 нм. Ці промені мають високу антимікробну активність і можуть викликати загибель не тільки вегетативних клітин, але і спор мікроорганізмів. Вплив ультрафіолетових променів має бути безпосереднім і тривалим. Це пов'язано насамперед з тим, що ультрафіолетові промені мають слабку проникаючу здатність. Вони не проходять, наприклад, крізь звичайне скло, легко поглинаються часточками пилу. Крім того, деякі предмети, такі як білий папір, пластини з полірованого алюмінію або хрому, можуть помітно відбивати ультрафіолетові промені. Тому залежно від ступеня забрудненості повітря для його стерилізації потрібно опромінення від 30 хв до декількох годин. Як джерело ультрафіолетового випромінювання використовуються бактерицидні лампи. Випромінювачем у них служить електрична дуга, що виникає в парах ртуті низького тиску. Більше 80 % випромінюваного ними спектру припадає на хвилі довжиною 254 нм. Необхідно зауважити, що ультрафіолетові промені можуть викликати важкі ураження очей. Тому при роботі з бактерицидними лампами потрібно

строго стежити за тим, щоб ні прямі, ні відбиті ультрафіолетові промені не потрапляли в очі. У невеликих приміщеннях при включеній бактерицидної лампі знаходитися не можна. Слід також враховувати, що при тривалій безперервній роботі бактерицидної лампи інтенсивність випромінювання знижується.

Робоче місце, де безпосередньо проводиться робота з культурами мікроорганізмів, вимагає особливо ретельної обробки. Робочий стіл слід дезінфікувати не тільки до початку роботи, але і після її закінчення. Для протирання поверхні столу можна використовувати розчини лізолу і хлораміну, а також 70% розчини ізопропілового або етилового спиртів. Спирти дуже ефективні відносно вегетативних форм мікроорганізмів. Ці спирти можна також застосовувати для дезінфекції рук. У тих випадках, коли поверхня столу має водовідштовхувальне покриття, особливо зручний лізол. Поверхню робочого столу можна дезінфікувати і ультрафіолетовими променями. При цьому слід враховувати, що бактерицидна дія променів тим вище, чим ближче поверхня, яка опромінюється, до джерела випромінювання. Мікробіологічні дослідження проводяться в умовах стерильності, що виключає забруднення матеріалу сторонніми мікроорганізмами із оточуючого середовища, а також попереджує забруднення зовнішнього середовища мікробами з досліджуваного матеріалу. Таким чином, стерилізація – один з найважливіших і необхідних прийомів в мікробіологічній практиці.

В мікробіології під стерилізацією розуміють знезаражування – цілковите знищення мікроорганізмів або їх форм спокою (спор) у певному середовищі або на предметі.

Неповна стерилізація або пастеризація. Метод, запропонований Луї Пастером, застосовується для знезаражування харчових продуктів. При цьому матеріал нагрівається при температурі 50-65°C протягом 15-30 хв або при 70-80°C – 5-10 хв.

Може проводитися в термостаті або на водяній бані. При цьому гинуть не всі мікроорганізми, можуть залишатись деякі термофільні або спорові форми. Стерилізацію проводять термічним і холодним способами в залежності від властивостей об'єкту та мети дослідження.

Термічна стерилізація здійснюється за допомогою високої температури.

Стерилізація ультрафіолетовими променями. Для цього застосовують спеціальні бактерицидні лампи. Час опромінення 20 хв. Цим методом стерилізують повітря в мікробіологічних лабораторіях, боксах.

Під **хімічною стерилізацією**, або дезінфекцією розуміють знезараження предметів, матеріалів тощо за допомогою хімічних речовин. У мікробіологічних лабораторіях найчастіше застосовують розчин карболової кислоти (3-5%), лізолу (1-3%), формаліну (4%), хлорного вапна (10-20%). Борну кислоту, гліцерин, фенол та деякі інші хімічні речовини часто використовують як консерванти при виготовленні лікувальних і діагностичних сироваток, вакцин.

14.3.2. Підготовка до стерилізації посуду

Підготувати до стерилізації пробірки, піпетки, чашки Петрі, колби. Вимиті та висушені пробірки закривають підготовленими ватно-марлевими пробками, об'єднують по 15-20 штук, та загортають в папір. У верхню частину піпетки вкладають шматочок вати, який попередить потрапляння матеріалу в рот і забруднення рідини мікробами повітря під час роботи. Піпетки щільно загортають в папір, порваний смужками шириною 4-5 см і довжиною 50-70 см. Обмотування починають з нижньої частини піпетки. На папері обов'язково вказати об'єм піпеток.

Чашки Петрі стерилізують обгорнутими в папір по 1-5 штук.

Вимиті та висушені колби закривають приготованими ватно-марлевими пробками і зверху роблять ковпачки з пергаментного паперу.

Стерилізація бактеріологічної петлі прожарюванням у полум'ї спиртівки (пальника)

Бактеріологічну петлю беруть у праву руку і в горизонтальному положенні вносять її в нижню частину полум'я спиртівки, потім переводять в положення близьке до вертикального. Нагрівають у верхній частині полум'я спочатку нижню, а потім верхню частину дроту. Прожарюють до червоного кольору кілька секунд. Петлю рекомендується тримати у полум'ї пальника майже вертикально, щоб дріт був рівномірно розпечений на всьому протязі. При прожарюванні треба пам'ятати, що найвища температура розвивається у верхній та периферійних частинах полум'я, тому не слід опускати петлю безпосередньо до спиртівки.

14.3.3. Техніка мікробіологічного посіву

Для виділення мікроорганізмів з виробничих і природних субстратів, приготування культур з метою передачі у виробництво і т.п. у лабораторній практиці користуються методами посіву та пересіву. Посівом, або інокуляцією, називається внесення мікробного матеріалу в стерильне поживне середовище.

Пересів – це перенесення вирощеної на поживному середовищі культури мікроорганізмів на інше стерильне поживне середовище. Під час посіву (пересіву) мікроорганізмів потрібно дотримуватися таких правил:

1. Запалити спиртівку або газовий пальник.
2. У ліву руку взяти дві пробірки: одну – зі стерильним середовищем, іншу (ближчу до себе) – з культурою, які тримають у нахиленому положенні. Великим і вказівним пальцями правої руки тримати бактеріологічну петлю, простерилізовану у полум'ї пальника.
3. Не випускаючи петлі, з обох пробірок вийняти ватні пробки мізинцем і безіменним пальцем правої руки, притиснути їх до долоні і тримають так під час наступних маніпуляцій.

Обпалити краї пробірок, стежачи за тим, щоб 18 пробки не торкалися сторонніх предметів.

4. Петлю ввести у пробірку з культурою, яку пересівають. Обережно, не торкаючись стінок, відібрати краплю рідкої культури. У разі проведення пересівання із щільного середовища для охолодження петлі спочатку доторкнутися нею до поверхні середовища, де немає культури, після чого взяти невелику кількість мікробної біомаси (рис.14.5).

5. Не торкаючись стінок пробірки, петлю з мікроорганізмами ввести у іншу пробірку й сполоснути у стерильному рідкому середовищі. У разі внесення клітин, взятих петлею зі щільного середовища, матеріал ретельно розтерти по стінці пробірки і верхньому краю рідкого середовища, весь час змиваючи його середовищем. Якщо проводять пересівання на щільне поживне середовище (скошений шар агаризованого середовища), петлю з клітинами мікроорганізмів опускають до дна пробірки, де скупчується невелика кількість конденсаційної води. Злегка торкаючись петлею поверхні косяка, але не руйнуючи його, проводять зигзагоподібний штрих.

6. Петлю вийняти, обпалити краї пробірок і внутрішні кінці пробок, після чого пробірки закрити. Якщо кінець ватної пробки загориться, то не слід кидати пробку. Її потрібно швидко ввести в пробірку, де вата сама потухне. Ні в якому разі не можна дути на пробку, яка горить, так як це тільки посилить горіння. Якщо в момент пересіву ватяна пробка впаде на стіл або на підлогу, то не слід знову вставляти її в пробірку. Потрібно взяти нову стерильну пробку і почати всю операцію заново.

7. Петлю знову прожарити у полум'ї пальника.

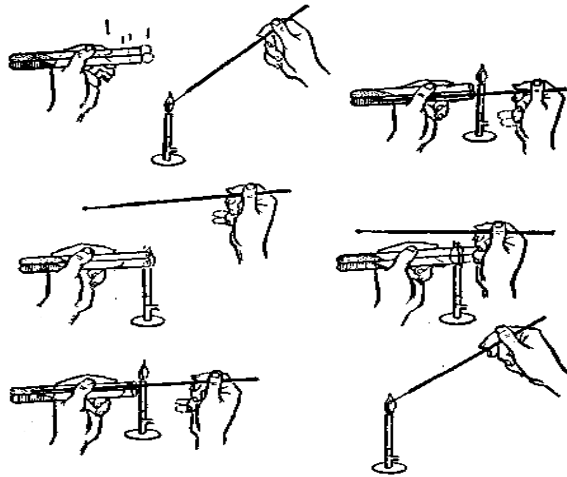


Рис. 14.5. Пересів культури мікроорганізму

На пробірці зазначити назву культури і дату посіву (підпис зробити чорнилом або олівцем по склу). Засіяні пробірки вмістити у термостат для вирощування при оптимальній для цього виду культури температурі.

Описані прийоми слід виконувати біля полум'я пальника для запобігання забрудненню культур сторонніми мікроорганізмами. Не можна робити різких рухів, ходити тощо біля того, хто працює з чистою культурою, оскільки рух повітря посилює небезпеку випадкового зараження культури та середовища. Пересівати мікроорганізми краще в стерильному боксі.

Інструменти в мікробіологічній лабораторії

Найпоширенішим обладнанням є інкуляційна голка, інокуляційна петля, пальник Бунзена, автоклав (або скороварка), термостат, сухо-жарова шафа, холодильник, центрифуга, спектрофотометр, магнітна мішалка, орбітальний шейкер, дистилятор, УФ-лампа, водяна баня, ваги, рН-метр, лічильник колоній, ламінарний бокс, електрофоретичний апарат, мікроскоп тощо.

Інокуляційна петля

Це найбільш часто використовуваний інструмент з ніхромовий або платинового дроту (рис. 14.6). Зараз все

частіше одноразові (з пластмаси) для роботи у ламінарному боксі.

Використовується для перенесення культури з поживного (рідкого або твердого) середовища.

Одразу після використання рештки на петлі повинні бути спалені задля уникнення забруднення та контамінації.

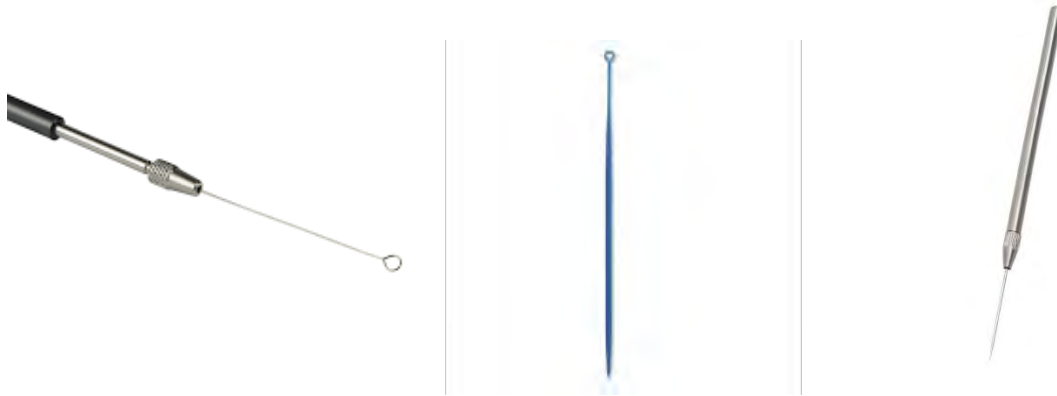


Рис. 14.6. Мікробіологічна петля та голка

Чашки Петрі

Р. Дж. Петрі, учень найвідомішого бактеріолога Роберта Коха, розробив цю чашку, звідси її називають «чашкою Петрі».

Для виділення та вирощування різних типів мікроорганізмів ці чашки використовуються у всіх мікробіологічних лабораторіях (рис. 14.7).

Відповідно до вимог, їх діаметр є різний.

Розплавлене агаризоване середовище асептично вливають на нижню половину стерилізованої чашки Петрі, а потім покривають верхньою половиною.

Чашки Петрі стерилізують, поміщаючи у сухожарову піч або автоклав.



Рис. 14.7. Чашка Петрі

Піпетки

Піпетка – це циліндричний градуйований скляний апарат (рис 14.8).

Один її кінець (нижній бік) звужується, тоді як інший кінець (рот) є нормальним. Середня частина ширша або такого ж розміру, як кінець.

Вони мають різну вимірнювальну здатність, таку як 0,1, 0,5, 1, 5, 10 мл тощо.

Він використовується для перенесення відповідної кількості рідини в інші ємності. Перед використанням його слід стерилізувати в сухожарі або автоклаві. Зберігати у контейнері для піпеток або загорнутими у папір та «забитими» ватою.

Обов'язковим при використанні піпетки для перенесення рідини є використання «груші».

Піпетки слід стерилізувати при 121°C протягом 30 хвилин.



Рис. 14.8.Піпетки

Шпатель

Він виготовляється шляхом згинання скляного стрижня та створення Г-подібної конструкції (рис. 14.9).

Застосовується для рівномірного розподілу мікроорганізмів на поверхні агару, присутніх у рідкому середовищі.

Довгу руку тримають у руці, а малу руку стерилізують полум'ям і наносять на поверхню агару.

Він виноситься вперед і назад, щоб мікроорганізми, що знаходяться в рідині, могли дисоціювати і рівномірно розповсюджуватися по всій поверхні агару.



Рис. 14.9. Шпатель

Пальник Бунзена

Стерилізація інструментів за допомогою пальника називається спалюванням.

Газ надходить у пальник біля основи, і його подача регулюється ззовні краном.

Полум'я пальника при спалюванні природного газу має бути синім. Синє полум'я вказує на безпечне та ефективне згорання, що, вказує на те що газ не втрачається.

Якщо полум'я жовте або помаранчеве, це означає що існують відхилення налаштувань правильного згорання. Різні кольори полум'я виникають через різну кількість кисню, що виконує роллю окисника.

Збільшуючи подачу кисню, отримують більш високі температури при згоранні і як наслідок більш повне згорання з меншим утворенням сажі. Коли процес окислення палива не отримує достатню кількість кисню, тоді помітні зміни кольору

полум'я на червоний, помаранчевий або жовтий. При більш грубих відхиленнях можна помітити сліди темної сажі на кінці полум'я. Через нестачу кисню температура полум'я зменшується, при цьому виділяється більше кількість окису вуглецю. Найхолодніше полум'я жовтого/помаранчевого кольору. Розглянемо як приклад пальник Бунзена, який застосовується у лабораторіях. Обертаючи муфту-заслонку навколо трубки, можна змінювати вільну площу отворів і відповідно, кількість повітря. У свою чергу, від обсягу повітря, залежить відсоток кисню в горючій суміші, висота та температура полум'я.

Колір і поведінка полум'я може бути непрямым індикатором, правильно відрегульоване співвідношення палива і окисника (рис. 14.10).

Якщо отвори перекрити зовсім, то горіти буде тільки газ. Полум'я буде червоного кольору, з t до $+500^{\circ}\text{C}$. При такій температурі газ згорає не повністю і полум'я буде коптити.

Збільшуючи вміст кисню в суміші газ/повітря, збільшується температура горіння. Вона може досягати 1550°C . Газ згорає повністю, кіптява не утворюється, полум'я має блакитний колір. Залежно від використовуваного газу для повного згорання потрібна різна кількість кисню. Наприклад, для пропану потрібно співвідношення повітря до газу близько 24:1. Для природного газу це співвідношення ближче до 10:1.

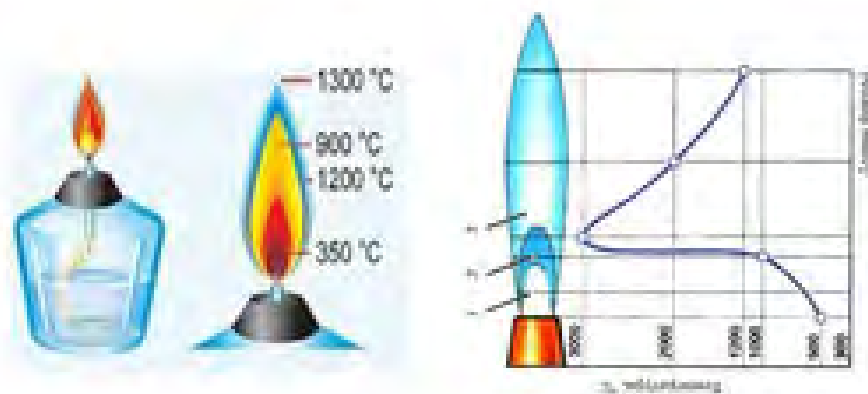


Рис. 14.10. Розподіл полум'я спиртівки

Ламінарна камера повітряного потоку (ламіднар)

Це пристрій, що складається з повітрорудки на задній стороні камери, яка може створювати потік повітря з рівномірною швидкістю по паралельних лініях потоку. Існує спеціальна система фільтрів з високоефективним повітряним фільтром для твердих частинок (HEPA), яка може видаляти частинки розміром до 0,3 мкм.

Перед повітрорудкою розташований механізм, за допомогою якого повітря, що продувається з нагнітача, забезпечує швидкість руху повітря по паралельних лініях потоку.

Принцип приладу ґрунтується на потоці повітряного потоку рівномірної швидкості вздовж паралельних ліній потоку, що допомагає переносити мікробні культури в асептичних умовах. Повітря пропускається через фільтри у корпус, і фільтри не дозволяють будь-якому мікроорганізмов потрапляти в систему.

У камері встановлені одна флуоресцентна лампа та УФ-трубка. Два перемикачі для цих трубок та окремий перемикач для регулювання повітряного потоку встановлені поза LAF. Завдяки рівномірній швидкості та паралельному потоку повітряного потоку, заливання середовищ, покриття, нахили, смуги тощо виконуються без будь-яких забруднень.

Спочатку частинки пилу видаляються з поверхні ламінарного боксу за допомогою гладкої тканини, що просочена спиртом та вмикають ультрафіолетове світло на 30 хвилин, щоб убити мікроби, якщо вони є в зоні робочого простору.

Термостат

Термостат – це інструмент, який складається з мідно-сталевий камери, навколо якої циркулює тепла вода або повітря за допомогою електричного струму або за допомогою невеликого газового полум'я (рис. 14.11).

В ньому є можливість підтримувати постійну температуру (за допомогою зовнішнього керування).

Запобіжні дверцята термостата слід відкривати лише за необхідності.

Температура сильно впливає на ріст мікроорганізмів. Прилад дозволяє забезпечити необхідні температури для інкубування в ньому мікроорганізмів.



Рис. 14.11. Термостат сухоповітряний

Автоклав

Автоклав – це найважливіше обладнання кожної мікробіологічної лабораторії. Автоклави бувають різні (стаціонарні, переносні, вертикальні та горизонтальні), але принцип їх побудови однаковий. Він використовується для стерилізації багатьох середовищ, розчинів, використаних культур, скляних виробів, металевих виробів тощо. Принцип дії автоклаву заснований на зростанні температури кипіння води при підвищенні тиску (при тиску в 1 атм t° кипіння води $99,1^{\circ}\text{C}$, а при тиску 2 атм – $119,6^{\circ}\text{C}$). Вода в автоклаві нагрівається для утворення пари за допомогою електричної енергії. Персонал, що працює з автоклавом має бути відповідно підготовлений і перед роботою має пройти спеціальні курси та отримати посвідчення для роботи з посудинами під тиском (рис. 14.12).



Рис. 14.12. Автоклав

14.3.4. Інокуляція (посів) та інші асептичні процедури

Важливі моменти

- Процедуру не слід розпочинати, поки всі вимоги не будуть виконані;
- Скляний посуд (чашки Петрі, пробірки, флакони і т.д.) повинні бути відкритими протягом мінімально можливого часу. Поки вони відкриті, всі роботи повинні виконуватися поблизу полум'я пальника Бунзена, де потоки повітря йдуть вгору (10 см в околі).
- Після відкриття, горловину пробірки або пляшки необхідно негайно прогріти полум'ям, щоб будь-який рух повітря був спрямований назовні, а посудина знаходилась якомога ближче до горизонталі.
- Під час засівання чашки Петрі вплив забруднення з повітря повинен бути обмежений до абсолютного мінімуму.
- Стерильними піпетками, які будуть поміщені в культури або стерильні посудини, не можна торкатися до інших нестерильних поверхонь (наприклад одяг, поверхня робочої зони, зовнішня частина пробірок/пляшок тощо).

У лабораторії мікроорганізми вирощують на щільних і рідких поживних середовищах, які розливають в пробірки,

колби, матраци та чашки Петрі. Посуд і поживні середовища попередньо стерилізують.

Внесення мікроорганізмів в стерильне середовище називається **посівом**, або **інокуляцією**. Після пересіву пробірки або інші посудини з мікроорганізмами поміщають в термостати з необхідною температурою.

14.3.5. Техніка посіву мікроорганізмів в рідкі поживні середовища

Посів мікроорганізмів зазвичай здійснюється бактеріологічною петлею. Відбір клітин мікроорганізмів здійснюють наступним способом:

- у праву руку беруть петлю і стерилізують її нагріванням в полум'ї спиртівки;
- пробірку з культурою беруть у ліву руку таким чином, щоб поверхню живильного середовища з вирослими колоніями мікроорганізмів була добре видна.
- потім, не випускаючи петлі, мізинцем і безіменним пальцем правої руки притискають зовнішній кінець ватної пробки до долоні та виймають пробку з пробірки;
- краї відкритої пробірки злегка обпалюють у полум'ї пальника, вводять у пробірку стерильну петлю;
- петлю охолоджують дотиком до внутрішньої поверхні скла пробірки або на вільній від мікроорганізмів частини середовища та після цього захоплюють невелику кількість мікробної біомаси;
- обережно виймають петлю з пробірки, шийку пробірки знову обпалюють, ватяну пробку проводять над полум'ям спиртівки та закривають нею пробірку;
- пробірку з культурою поміщають у штатив, а витягнуту культуру переносять у рідке поживне середовище, що знаходиться в іншій пробірці або колбі;
- решту матеріалу на петлі після пересіву клітини мікроорганізмів ретельно спалюють у полум'ї спиртівки;

- потім петлю переводять у вертикальне положення, прожарюють до червоного (щоб знищити клітини, що залишились на ній) і тільки після цього ставлять на місце.

Всі описані вище маніпуляції проводять близько полум'я пальника, по можливості швидко, щоб не забруднювати культуру сторонніми мікроорганізмами.

Не рекомендується робити різкі рухи, ходити біля проводить посів, так як рух повітря збільшує ймовірність випадкового забруднення культури.

14.3.6. Методи виділення чистої культури

Для виділення бактерій у вигляді чистих культур відомо порівняно мало методів. Найчастіше це роблять шляхом ізолювання окремих клітин на твердому живильному середовищі, використовуючи метод посіву штрихом або розливу по чашках невеликої кількості рідкої культури (**метод граничних розведень**). Однак отримання окремої колонії не завжди гарантує чистоту культури, оскільки колонії можуть вирости не тільки з окремих клітин, але і з їх скупчень. Якщо мікроорганізми утворюють слиз, то часто до неї прикріплюються сторонні форми. Для очищення переважно використовують неселективне середовище МПА – м'ясо-пептонний агар, оскільки на ній краще ростуть контамінуючі мікроорганізми та їх легше виявити.

Отримання ізольованих колоній на твердому поживному середовищі досягається або шляхом розсіву суспензії мікроорганізмів шпателем (метод Коха), або за допомогою бактеріологічної петлі (метод виснажливого штриха). У результаті механічного роз'єднання клітин мікроорганізмів кожна з них може дати початок ізольованій колонії одного виду мікробів.

Розсівання шпателем (метод Коха) роблять у наступній послідовності:

1) на поверхню поживного середовища в чашці №1 наносять стерильною піпеткою краплю накопичувальної культури та розподіляють її стерильним шпателем;

2) шпатель дістають, чашку швидко закривають і переносять шпатель в чашку №2, що не стерилізуючи його. Імітують розподіл культури по всій поверхні середовища, торкаючись до її поверхні тієї ж стороною шпателя, якої раніше розподіляли пробу;

3) точно ті ж дії проводять і в чашці №3, після чого шпатель стерилізують;

4) засіяні чашки поміщають в термостат і інкубують за оптимальної температури.

Через певний час чашки дістають з термостата та вивчають ріст мікроорганізмів. Зазвичай в чашці № 1 спостерігають суцільний ріст бактерій, в наступних чашках відзначають колонії.

Розсівання петлею (метод виснажливого штриха) передбачає висів бактеріологічною петлею з накопичувальної культури на поверхню агаризованого середовища в чашках Петрі. На першому етапі петлею з культурою наносять ряд паралельних штрихів на агаризованому середовищі. Петлю стерилізують, охолоджують про незасіяній частина агаризованому середовища та проводять серію штрихів у напрямку, перпендикулярному першим (Б). Потім петлю знову стерилізують, охолоджують і наносять штрихи в напрямку В, а після чергової стерилізації – в напрямку Г (рис. 14.13).

Чашки поміщають в термостат і через певний час враховують результати. Зазвичай на штрихах А і Б виростає велика кількість колоній (іноді суцільний ріст), тоді як на штрихах В і Г формуються окремі (ізольовані) колонії.

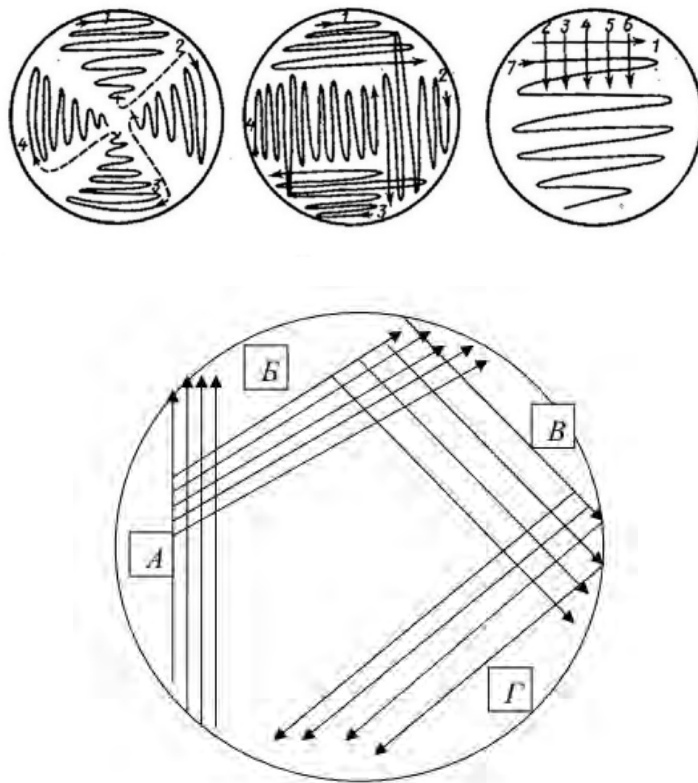


Рис.14.13. Схема розсівання бактерій штрихами для отримання ізолюваних колоній

Послідовні розведення в твердому середовищі – найпростіший спосіб посіву чашок Петрі, який полягає в тому, що після інокуляції проби в пробірку зі стерильним розплавленим та охолодженим агаром, середовище перемішують, виливають в чашку Петрі та дають застигнути.

Для отримання добре ізолюваних колоній готують ряд послідовних десятикратних розведень і по 1 мл проби вносять відразу в чашку Петрі, додають 15-20 мл розплавленого агаризованого середовища та змішують, похитуючи чашку. Іноді окремі колонії виявляються зануреними в агар і видобути їх можна тільки механічно.

14.3.7. Контроль стерилізації

Існує 3 методи контролю ефективності стерилізації:

✓ **Фізичний** – проводиться контроль параметрів роботи стерилізаційного обладнання (температури, тиску та часу стерилізації);

✓ **Хімічний** – за допомогою хімічних речовин, що володіють температурою плавлення близькою до температури стерилізації. Це одноразові індикатори, які незворотно змінюють колір термоіндикаторної мітки при відповідно режимів стерилізації;

Відомо, що хімічні індикатори бувають:

- зовнішні (клеються зовні упаковки для стерилізації);
- внутрішні (поміщаються всередину упаковки).

Для парової стерилізації як індикатор використовують бензойну кислоту, для повітряної – гідрохінон та сахарозу. Зміна кольору хімічного індикатора означає задовільний результат проведеної стерилізації (температури, тиску, тривалості).

✓ **Біологічний** – є найкращим інструментом, «золотим стандартом» оцінки ефективності стерилізації. Тільки вони підтверджують реальну загибель мікробних спор усередині стерилізатора.

Хімічні індикатори класифікують за кількістю контрольованих параметрів, стерилізаційного циклу.

Виділяють 6 класів індикаторів (чим більше параметрів контролює індикатор, тим вище його клас).

Клас 1 – індикатори процесу, які дозволяють визначити чи пройшла стерилізація (рис. 14.4)



Рис. 14.14. Хімічні індикатори 1 класу

Випускають у вигляді клейкої стрічки, схожої на скотч, з нанесеним на лицьову поверхню хімічним індикатором (у вигляді смужок чи написів)

Шматочки стрічки наклеюють перед проведенням стерилізації на підготовані до стерилізації упаковки, контейнери, тощо. Можуть навіть застосовуватись для закріплення країв пакувальних матеріалів чи наклеюватись безпосередньо усередині автоклава чи стерилізатора (розміщують на різних рівнях);

Повинні володіти чіткою безповоротною зміною кольору індикатора на смужках, що вказує на правильність проходження стерилізації;

Не контролює параметри стерилізації, а оцінюється рівномірність розподілу пара в камері стерилізатора;

Невдалий результат виявляється світлішим кольором в центрі зразка ніж по краях або нерівномірною зміною кольору.

Позитивним результат вважається при однорідній зміні кольору індикатора.

Клас 2 – індикатори для спеціальних випробувань (рис. 14.15)

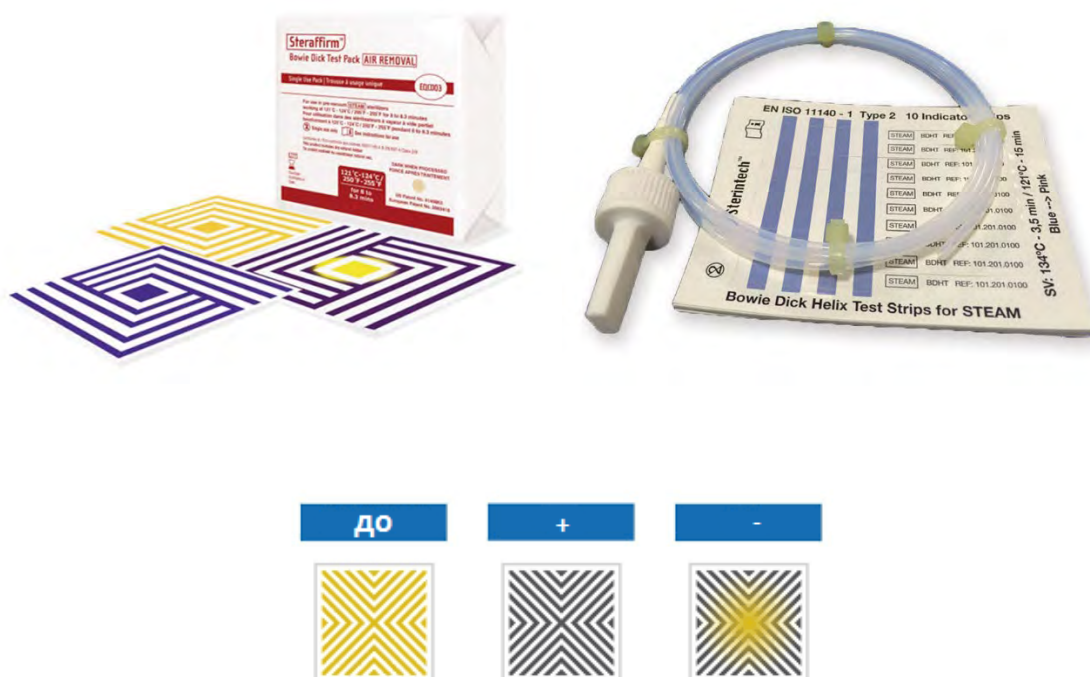


Рис.14.15. Хімічні індикатори 2 класу

Наприклад, вони визначають мінімальну температуру, проте не дають інформації про час впливу температури.

Найхарактернішим представником даного класу індикаторів є індикатор тесту Бов'є-Діка (Bowie-Dick). Він призначений для випробувань ефективності вакуумної системи парового стерилізатора. Цей тест має першим сигналізувати про несправність стерилізатора. Тест не визначає якість стерилізації як таке, але є невід'ємною частиною всебічної програми гарантії стерилізації. За допомогою тесту можна оцінити рівномірність розділення пару в камері стерилізатора та її герметичність.

Індикатором слугує лист паперу з нанесеним на нього складним малюнком з хімічної речовини, що змінює свій колір під дією насиченої водяної пари.

Невдалий результат визначається більш світлим кольором у центрі листка ніж по краях, або нерівномірною зміною кольору малюнка. Позитивний результат визначається при рівномірній зміні кольору малюнку по всьому листку індикатора. Варіантом тесту є Хелікс-тест (Helix-test).

Клас 3 – відносяться індикатори, за допомогою яких визначається один параметр стерилізації, наприклад, максимальна температура. Однак вони не дають інформації про час впливу температури (рис. 14.16).



Рис. 14.16. Хімічні індикатори 3 класу

Термохімічний індикатор представляє собою скляну трубку з хімічною речовиною, що змінює свій агрегатний стан або колір за температури близької до температури стерилізації. Визначення параметрів досягнутих у процесі стерилізації полягає у зміні кольору термоіндикаторної фарби при досягненні «температури переходу» строго визначеної для кожної фарби (бензойна кислота, тіосечовина).

Такі індикатори застосовуються для контролю повітряної стерилізації.

Клас 4 – відносяться індикатори, що оцінюють два і більше фактори (мультипараметричні індикатори); які змінюють колір при впливі декількох параметрів стерилізації; (рис. 14.17).



Рис. 14.17. Хімічні індикатори 4 класу

Вони відрізняються від попереднього класу індикаторів лише тим, що індикаторна фарба змінює колір лише протягом певного часу дії контрольованого фактора. Тому частіше за все маркується кількома цифрами, наприклад 180-60 (180°C, 60 хв).

Щоб адекватно оцінювати процес стерилізації, індикатори повинні бути мультипараметричними.

Мультипараметричні індикатори Comply™ дозволяють вірогідно виявляти та ідентифікувати потенційні порушення в процесі стерилізації, визначають більшість критичних параметрів, надають інформацію про якість стериліанта.

Це багатопараметрові індикатори, що містять барвники які змінюють свій колір при одночасному впливі декількох параметрів стерилізації, найчастіше – температури і часу.

Застосовуються для контролю повітряної стерилізації.

Індикаторна фарба змінює свій колір тільки протягом певного часу впливу контрольованого фактора. Тому найчастіше маркуються двома цифрами, наприклад: 180-60 (180 градусів, 60 хвилин).

Клас 5 – індикатори-інтегратори, що реагують на всі критичні параметри методу стерилізації; контролюють одночасно всі параметри методу стерилізації (інтегратори – аналоги біологічних індикаторів).



Рис. 14.18. Хімічні індикатори 5 класу

Колір контрольної мітки інтегратора має необоротно змінюватись у ході стерилізації тільки при відповідності всіх критичних параметрів застосовуваного процесу необхідним критеріям. Наприклад, при температурі 132-135°C колір мітки повністю зміниться впродовж 3-4 хв за умови дії на інтегратор насиченої водяної пари.

Аналогічно працюють інтегратори етилоксидної стерилізації. Одночасні випробування інтеграторів та біологічних індикаторів показали, що колір хімічного індикатора змінюється раніше, ніж пройде час, необхідний для повного знищення контрольних мікроорганізмів біологічного індикатора.

Кольоровий стандарт для порівняння повинен бути надрукований на кожній смужці інтегратора.

При будь-якому типі стерилізації вплив на оброблювані вироби визначається дотриманням декількох критичних параметрів.

- Для повітряної стерилізації це час експозиції та температура.
- Для парової стерилізації – концентрація пари, час та температура.
- Для етилен-оксидної стерилізації – концентрація газу, відносна вологість, час та температура.

Тільки при дотриманні відповідних значень усіх параметрів стерилізація може бути успішною.

Колір хімічного індикатора змінюється не раніше, ніж пройде час, необхідний для повного знищення контрольних мікроорганізмів біологічного індикатора.

Кольоровий стандарт для порівняння повинен бути надрукований на кожній смужці інтегратора.

Характеристика цього класу індикаторів порівнюється з інактивацією високорезистентних мікроорганізмів.

При успішному закінченні циклу стерилізації всі секції хімічних індикаторів змінюють колір з бузкового на зелений.

До використання Після використання Найбільш досконалим типом мультипараметричних хімічних індикаторів є інтегратори, які інакше називаються «хімічними біологічними індикаторами». Особливість інтеграторів полягає в тому, що вони містять складну хімічну речовину, плавлення та розповсюдження якої вздовж віконця індикатора під впливом всіх критичних параметрів стерилізаційного циклу відповідає швидкості загибелі тестових спор при тих самих умовах. Таким чином, робота інтегратора моделює роботу біологічного індикатора. На відміну від біологічного індикатора інтегратор дає відповідь про якість стерилізації безпосередньо після завершення циклу, не потребує наявності лабораторії, простий в інтерпретації (відповідь типу ТАК/НІ).

Клас 6 – це індикатори-емулятори (рис. 14.19).

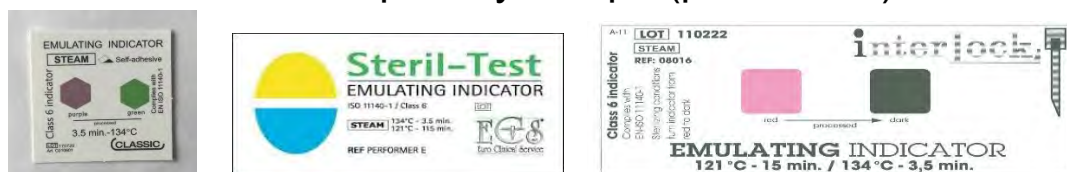


Рис. 14.19. Хімічні індикатори 6 класу

Індикатори відкалібровані відносно параметрів режимів стерилізації при яких вони застосовуються. Вони реагують на всі критичні параметри відповідного методу стерилізації та наразі є найсучаснішими.

Вони реєструють якість стерилізації при правильному співвідношенні всіх заданих параметрів – температури, насиченої пари, часу. При недотриманні одного з критичних параметрів емулятор не спрацює. Теоретично ці індикатори реагують на все, а не тільки на критичні параметри процесу стерилізації.

Біологічні індикатори представлені стрічкою зі спорами, що знаходиться у пластиковому пеналі, що містить запаяну скляну ампулу із поживним середовищем та чутливим барвником (рис. 14.20). Пенал закритий ковпачком

із бактеріальним фільтром. Впродовж стерилізації індикатор знаходиться всередині автоклава чи стерилізатора. А після стерилізаційного циклу згідно інструкції, індикатор поміщають у термостат чи спеціальний інкубатор для індикаторів, та оцінюють результат через 1-48 годин.

В основі будь-якого такого індикатора є непатогенні спороутворюючі мікроорганізми з відомою високою стійкістю до певного стерилізаційного процесу. Біологічні індикатори Attest™ містять спорові форми *Bacillus stearothermophilus* чи *Bacillus subtilis*, які є стійкими до парової та повітряної/етилен-оксидної стерилізації.

Особливість біологічних індикаторів полягає у тому, що вони визначають не просто витримування технічних нормативів стерилізаційного циклу, але й фіксують загибель спор тестових мікроорганізмів. Спори нетоксигенного штаму *Clostridium tetani* використовуються як мікробіологічний тест ефективності сухожарової шафи.

Біологічні індикатори складаються зі:

1. Стрічки, що містить спори *B. stearothermophilus* із мінімальною кількістю спор на стрічці 1 000 000.
2. Поживне середовище в ампулі, що роздавлюється. Середовище є похідною соєво-трипсинового бульйону із додаванням рН-чутливого індикаторного барвника (бромкрезолу пурпурового).
3. М'який поліпропіленовий пенал, в якому розміщуються стрічка та ампула.
4. Поліпропіленовий ковпачок, який містить гідрофобний бактеріальний фільтр, що пропускає стериліант.
5. Етикетку з датою виробництва, що містить хімічний індикатор, який змінює колір з рожевого на коричневий після стерилізаційного циклу, з місцем для запису дати стерилізації.

Примітка: Не застосовувати дані індикатори в повітряних і газових стерилізаторах.

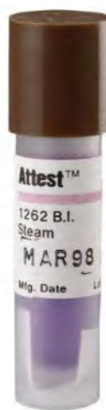


Рис. 14.20. Біологічний індикатор

При здійсненні його для контролю беруть посіви з простерилізованих матеріалів у тіогліколеве середовище (для бактерій) та середовище Сабуро (для грибів). Потім мікропроби цих середовищ перевіряють на стерильність в термостаті при температурі 37°C. Якщо ріст відсутній, значить стерилізація проведена ефективно. Бактеріологічний контроль стерилізації проводять не рідше 1 разу на місяць.

1. Аналіз мікробіоти ґрунту.

Під час загального мікробіологічного аналізу ґрунтів обов'язково проводять виявлення загальної кількості мікроорганізмів, а також їх окремих еколого-трофічних груп та іноді окремих їх видів в 1 г ґрунту (титр мікроорганізмів).

Мета: оволодіти прямим та непрямим методами визначення чисельності мікроорганізмів.

Завдання:

1. Відібрати проби ґрунту.
2. Виготовити ґрунтову суспензію без десорбції та із десорбцією.
3. Підрахувати кількість мікроорганізмів за допомогою капілярів Перфільєва або Габе.
4. Виділити різні фізіологічні (еколого-трофічні) групи мікроорганізмів.
5. Провести кількісний аналіз мікроорганізмів різних груп у пробах ґрунту.

6. Дати порівняльну характеристику кількості ґрунтових мікроорганізмів, отриманих двома методами підрахунку (мікроскопія та визначення титру).

Обладнання та посуд: технічна вага, люмінесцентний мікроскоп, набори для мікроскопування, термостат для вирощування мікроорганізмів, фарфорові ступки, капілярні камери Перфільєва або Габе, скляні або алюмінієві бюкси, чашки Петрі, пробірки, колби, піпетки, шпателі Дригальського.

Хід роботи.

1. **Відбір проб.** На території площею до 1000 м² вибрати дві ділянки, на кожній з яких намітити чотири точки по кутах і одну в центрі. Стерильною лопаткою відібрати з глибини до 20 см та масою 150-250 грам, п'ять проб ґрунту. Відібраний ґрунту помістити в стерильну посудину або пакет для відбору проб. Орієнтовно, з однієї ділянки повинна вийти проба масою до 1 кг. Після відбору проби ретельно перемішуємо, пересіваємо та відбираємо одну середню пробу з ділянки масою до 500 г. Всі наступні дослідження необхідно виконати протягом наступних 4-6 годин.

2. **Підрахунок мікроорганізмів за допомогою не прямого методу.** Для цього кількісного підрахунку мікроорганізмів ґрунту використовують висівання ґрунтової суспензії на елективні середовища які зазначені нижче:

1) Для амоніфікувальних бактерій м'ясо-пептонний агар (МПА) готують із готового сухого порошку (промисловий Nutrient agar). Готується згідно рекомендацій виробника які зазначені на упаковці (зазвичай 15-23 г сухого порошку на 1 л дистильованої води).

2) Для грибів середовище Чапека-Докса (г/л) – сахароза 30,0; NaNO₃ – 3,0; KH₂PO₄ – 0,1; MgSO₄×7H₂O – 0,5; KCl – 0,25; FeSO₄×7H₂O – 0,01; агар-агар – 20,0.

3) Для актиноміцетів (актинобактерій) крохмально-аміачне середовище (КАА) – розчинний крохмаль- 10,0;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; NaCl – 1,0; CaCO_3 – 3,0; агар-агар – 20,0. Крохмаль попередньо заварити окремо у невеликій кількості гарячої води й пізніше додати до решти середовища.

4) Для олігонітрофілів і азотфіксаторів; агаризоване середовище Ешбі наступного складу (г/л): KH_2PO_4 – 0,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NaCl – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; CaCO_3 – 5,0; сахароза або маніт – 20,0; агар-агар – 20,0.

5) Для целюлзотрувальних мікроорганізмів середовище агар Гетчинсона наступного складу (г/л): KH_2SO_4 – 0,1; NaCl – 0,1; CaCl_2 – 0,1; FeCl_3 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; NaNO_3 – 2,5; агар-агар – 20,0; з використанням пластинок фільтрувального паперу або додаванням карбоксиметилцелюлози.

Усі середовища стерилізувати при 1 атм протягом 15 хв. Простерилізовані середовища розлити в стерильні чашки Петрі та засіяти відповідними розведеннями ґрунтової суспензії.

Виготовлення ґрунтової суспензії без десорбції.

Зразки ґрунту просіяти через сито з діаметром пор 0,5 мм. Зваживши 5 г просіяного ґрунту перенести його в колбу що містить 50 мл стерильної води й перемішувати за допомогою мішалки (шуттера) протягом 20-30 хв. Виготовити суспензії з розведенням від 1:100 до 1:10 000 000 включно. З останніх трьох розведень засіяти газоном на чашки Петрі з вищезгаданими середовищами.

Виготовлення ґрунтової суспензії з використанням десорбції (за Звягінцевим). Наважку просіяного ґрунту в кількості 1 г перенести у стерильну фарфорову ступку, зволожити 1-2 мл стерильної водогінної води та розтирати 5-7 хв гумовим товкачем. Одержану суспензію багаторазовими змивами (10 мл) кількісно перенести у порожню пробірку. Виготовити розведення від 1:100

до 1:10 000 000 включно та засіяти на чашки з вищезгаданими середовищами.

Для посіву виготовленим одним із вищезгаданих способів суспензій ґрунту необхідно їх нанести в об'ємі 0,1 мл на поверхню агаризованого середовища та рівномірно розтерти шпателем Дригальського. Засіяні чашки поставити в термостат із температурою 26-28°C. Підрахунок колоній виконують через 3-4 доби – для бактерій та 5-7 діб для актиноміцетів та грибів.

Кількість колоній на всіх чашках (одного варіанту, одного типу середовища) підраховують та визначають їх середню кількість, після чого перераховують на 1 г ґрунту за формулою:

$$K=a \times n \times 10 / 0,1 \times m,$$

де K – кількість КУО в 1 г ґрунту;

a – середня кількість колоній на чашці;

n – розведення, з якого зроблено посів;

10 – об'єм вихідної суспензії, мл;

0,1 – об'єм розведеної суспензії;

m – маса ґрунту, взятого для аналізу, г.

3. Визначення вологості ґрунту. Вологість необхідно знати для перерахунку його на 1 г абсолютно сухого ґрунту. Наважку ґрунту вагою 5 г помістити в попередньо зважений, пустий алюмінієвий бюкс та висушити при температурі 105°C до сталої маси. Висушений ґрунт (разом із алюмінієвим бюксом) зважити й за формулою вирахувати вологість:

$$B=(a-b) \times 100 / a-c,$$

де B – вологість ґрунту,

%; a – маса бюкса з вологим ґрунтом, г;

б – маса бюкса з висушеним ґрунтом, г;
с – маса порожнього бюкса, г.

4. Прямий підрахунок кількості мікроорганізмів у ґрунті за допомогою капілярів Перфільєва та Габе.
Прямий підрахунок мікроорганізмів ґрунту виконують за допомогою люмінесцентного мікроскопу, використовуючи як флюорохром – акридин оранжевий. Для цього до 1 мл ґрунтової суспензії (1:100) додати десять крапель розчину акридин оранжевого (1:100) і залишити на 10 хв. Відрізок капіляра довжиною 3-4 см заповнити отриманою суспензією та прикріпити його парафіном до предметного скла. Підрахувати клітини мікроорганізмів у капілярі під люмінесцентним мікроскопом при збільшенні 10×90.

Кількість клітин у 1 г ґрунту обчислити за формулою

$$K=a \times 10 \times n / V \times m,$$

де К – кількість клітин в 1 г ґрунту;

а – середня кількість клітин в одному ході капіляра;

10 – об'єм вихідної суспензії, мл;

n – розведення ґрунтової суспензії;

V – об'єм одного ходу капіляра, см³;

m – наважка ґрунту, г.

За результатами дослідів вирахувати кількість таких мікроорганізмів у 1 г ґрунту: амоніфікатори, актиноміцети, гриби, целюлозоруйнівні бактерії, олігонітрофіли та азотфіксувальні бактерії та кількість бактерій у капілярі. Провести порівняльну характеристику кількості ґрунтових мікроорганізмів, отриманих обома методами підрахунку.

14.4 Біопрепарати для рослинництва

Відомо, що рослини харчуються поживними речовинами з ґрунту лише завдяки діяльності мікроорганізмів,

які в ньому живуть та впливають на фізіологічний оптимум таких речовин рослини. Найбільш вивчені механізми стимулювання росту рослин бактеріями включають забезпечення рослин поживними речовинами, які є дефіцитними або важкодоступними, такими як азот, фосфор, калій, залізо. Багато ґрунтів сільськогосподарського призначення не мають достатньої кількості одного або більше цих сполук, і таким чином, ріст рослин не є оптимальним. Щоб усунути цю проблему та отримати більш високі врожаї, фермери стають все більш залежними від хімічних джерел даних елементів. Крім того, що хімічні добрива є досить високовартісними, їх виробництво вимагає використання невідновлювальних джерел – нафти та природного газу, що негативно впливає як на людство так і на навколишнє середовище в цілому.

Пошук альтернативних рішень для сільського господарства спонукав дослідників поглянути по-новому на сферу агрономічно корисних мікроорганізмів, що стало поштовхом до швидкого зростання виробництва біодобрив, біопестицидів та інших препаратів на основі рістрегулюючих мікроорганізмів. В майбутньому, на думку багатьох вчених, сталий розвиток сільського господарства буде залежати від використання генетично сконструйованих рослин і рістрегулюючих бактерій – PGPB (Plant-Grows Promotion Bacteria).

Ці мікроорганізми, в цілому, представлені різноманітними природними групами мікробів, інокуляція ґрунтової екосистеми якими здатна підвищити фізико-хімічні властивості ґрунту, збільшити біологічне різноманіття ґрунтового біоценозу, активізувати ріст і розвиток рослин, а також збільшити врожайність сільськогосподарських культур. Агрономічно корисні мікробні популяції включають бактерії, що сприяють розвитку рослин, азотфіксуючі ціанобактерії, мікоризні гриби, корисні бактерії, що пригнічують хвороби

рослин, ендوفіти, що підвищують стійкість до стресів і мікроорганізми-біодеструктори.

Більшість бактеріальних добрив створені на основі мікроорганізмів із такими ознаками, як: фіксація атмосферного азоту, здатність переводити нерозчинні сполуки фосфору у доступні для рослин форми, спроможність до продукування речовин фітогормональної та фунгіцидної дії тощо.

Перші спроби використання мікроорганізмів для підвищення врожаю сільськогосподарських культур з'явилися наприкінці XIX ст. Після того як М. Бейерінк виділив бульбочкові бактерії бобових рослин, виникла ідея використовувати їх для ефективного формування бульбочок та посилення фіксації атмосферного азоту. У 1885 році співробітники Саксонської Королівської дослідної станції з фізіології рослин у м. Тарандт (поблизу Дрездена) Ф. Ноббе і Л. Хільтнер вперше спробували реалізувати ідею використання бульбочкових бактерій у землеробстві. Вони уклали контракт із фірмою «Фарбверке Хоекст» (Farbwerke Höchst) на виробництво препарату на основі чистої культури *Rhizobium*. Наприкінці XIX століття практика змішування «природно інокульованого» ґрунту із насінням стала рекомендованим методом для обробки бобових, а у 1896 році був зареєстрований перший патент на препарат для бобових на основі ризобій «нітрагін» (Nitragin). Обробку насіння бактеріальними добривами називають інокуляцією або бактерізацією, а препарати для обробки насіння – інокулянтами. Нині добрива на основі бульбочкових бактерій одні з найбільш широко застосовуваних бактеріальних препаратів для рослинництва у світі.

На сьогоднішній день, біопрепарати впевнено зайняли своє місце на аграрному ринку та необхідна їх кількість із кожним роком неупинно збільшується. Такий приріст обумовлений головним чином зростаючими площами

органічних сільськогосподарських угідь, а також широким визнанням біодобрив серед фермерів.

Мікробні продукти використовуються у комерційних цілях в світовому сільському господарстві більше 120 років, але останнім часом їм надається підвищена увага. В даний час зареєстровано понад 149 мікробних штамів, які використовуються у сільському господарстві. Недавнє спеціальне видання Американського товариства мікробіологів висловило припущення, що мікроорганізми можуть бути, принаймні частково, ефективним рішенням для стійкого збільшення сільськогосподарського виробництва.

Мікроорганізми, безумовно, будуть відігравати важливу роль в революційних підходах до ведення сільського господарства протягом наступних кількох десятиліть, щоб допомогти задовольнити потреби зростаючої кількості населення. Для досягнення максимальної вигоди з точки зору економії добрив і більш високих темпів зростання, технологія інокуляції на основі PGPB має мати відповідний рівень інфекційного навантаження. Крім того, використання ефективних інокулянтів можна вважати важливою стратегією стійкого сільського господарства та тою, що дозволить зменшити екологічні проблеми за рахунок зменшення використання хімічних добрив.

14.4.1. Агрономічно корисна мікрофлора або PGPB, як основа для створення біопрепаратів

Plant-Grows Promotion Bacteria (PGPB) класифікуються на основі їх функціональної активності: (I) біодобрива (фіксація або підвищення доступності поживних речовин для рослин – азот, фосфор, калій тощо), (II) біопестициди (боротьба із захворюваннями та шкідниками, (III) фітостимулятори (стимуляція росту рослин) і (IV) ризоремедіатори (руйнування або зв'язування ксенобіотиків).

Механізми, за допомогою яких RGPB стимулюють ріст рослин знаходяться під контролем генетичних процесів. Крім того, у більшості вивчених випадків, один і ті ж RGPB володіють кількома властивостями, в тому числі і біологічного контролю.

Варто відзначити, що для ефективної інокуляції RGPB повинні володіти наступними властивостями: (I) вони повинні бути здатними колонізувати поверхню кореня, (II) вони повинні виживати, розмножуватися та конкурувати з іншою мікробіотою, принаймні, протягом часу, необхідного для стимуляції/захисту росту рослин і (III) вони повинні сприяти росту рослин.

Нещодавно було запропоновано класифікувати RGPB асоціації за ступенем близькості бактерій до кореня. Загалом, вони можуть бути розподілені на: позаклітинні – вільноіснуючі бактерії та ціанобактерії (колишня назва синьо-зелені водорості), що розвиваються у ризосфері; асоціативні, що розвиваються на ризоплані та внутрішньоклітинні – формують специфічні симбіотичні взаємовідносини з рослинами (наприклад, *Rhizobia spp.* або *Frankia spp.*) та існують всередині клітин кореня, як правило, в спеціалізованих утвореннях – бульбочках або є бактеріальними ендofітами, які здатні колонізувати деякі рослини чи частини їх внутрішніх тканин. Несимбіотичні ендofітні відносини відбуваються в міжклітинних просторах тканин рослин, які містять високі рівні вуглеводів, амінокислот, і неорганічні поживні речовини. Ендofітні RGPB є найкращими кандидатами для виробництва інокулянтів, оскільки вони колонізують коріння та створюють сприятливі умови для його розвитку й функціонування.

Прикладами позаклітинних є *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas* і *Serratia*. Прикладами внутрішньоклітинних є *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* і

Rhizobium, які є членами родини *Rhizobiaceae*. Більшість ризобактерій, що належать до цієї групи є грамнегативними паличками, деякі є грампозитивними паличками, коками або навіть плеоморфами. Крім того, численні актиноміцети також є одними з основних компонентів ризосферних мікробних спільнот, що володіють здібностями стимулювати розвиток рослин. Серед них варті уваги *Micromonospora* sp., *Streptomyces* sp., *Streptosporangium* sp., і *Thermobifida* sp., які продемонстрували величезний потенціал в якості агентів біоконтролю проти різних кореневих грибкових патогенів.

Незважаючи на відмінності між цими бактеріями, всі вони використовують одні і ті ж механізми для впливу на розвиток рослин. RGPB можуть сприяти розвитку рослин безпосередньо через збільшення доступності для рослин поживних сполук, модулювання фітогормональної активності або опосередковано – завдяки зменшенню інгібуючої дії різних патогенних агентів на ріст і розвиток рослин, тобто, виконуючи роль біоконтролюючих бактерій.

Нижче буде більш детально описано найбільш вивчені механізми стимулювання росту рослин бактеріями, що включають забезпечення рослин поживними речовинами, які є дефіцитними або важкодоступними, такими як азот, фосфор та залізо.

14.4.2. Азотфіксувальні мікроорганізми

Азот – найважливіший елемент, який був виявлений у ґрунті, воді та повітрі. Це біогенний елемент, що входить до складу амінокислот, білків, нуклеїнових кислот, нуклеотидів, вітамінів, хлорофілу та загалом складає від 1 до 5 % сухої маси рослини. В більшості сільськогосподарських районів врожаї визначаються запасом азоту в ґрунті, але він повністю зв'язаний з гумусом і лише невелику його частину містять

свіжі рослинні залишки або внесені органічні залишки, що швидко мінералізуються із вивільненням аміаку.

У процесі трансформації азоту в ґрунті основна роль відведена мікроорганізмам, що приймають участь в амоніфікації, нітрифікації, азотфіксації та денітрифікації. Лише за умов достатньої уваги до мікроорганізмів задіяних у трансформації азоту можна очікувати на високу ефективність використання азотних добрив без надмірного нагромадження нітратів у рослинній продукції та запобігти масовому забрудненню біосфери окислами азоту.

Кругообіг азоту складається із наступних етапів. Одним із основних шляхів перетворення азоту в ґрунті є гниття, або розклад білків мікроорганізмами, який дістав назву процесу амоніфікації. 1-й етап – амоніфікація – розкладання білка (гниття) – продукти метаболізму рослин і тварин, а також тканини відмерлих організмів під впливом мікроорганізмів розкладаються з утворенням амонію (процес амоніфікації). Це складний багатофазовий процес, кінцеві результати якого залежать від будови й складу білка, умов, у яких відбувається розклад, і від збудників, що спричинюють його. Гниття білків починається з їхнього гідролізу під впливом протеолітичних ферментів, які виділяються мікроорганізмами в навколишнє середовище. Процесу амоніфікації піддаються не тільки білки, а й їхні похідні — пептони, пептиди, амінокислоти, а також нуклеїнові кислоти та їх похідні — пуринові і піримідинові основи, сечовина, сечова кислота, складний азотовмісний цукор хітин і гумусові кислоти. Амоніфікуючу здатність проявляє більшість мікроорганізмів, які синтезують протеолітичні ферменти: *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *B. cereus*, *Clostridium tetani*, *C. perfringens*, *C. putrificum*, *C. sporogenes* та інші бактерії, а також гриби. Механізм процесу амоніфікації білків полягає у ферментативному їх гідролізі до пептонів, пептидів, а потім до амінокислот.

Частина аміаку утвореного при амоніфікації піддається другому етапу перетворення азоту в ґрунті – нітрифікації. Бактерії що приймають в ньому участь називають нітрифікаторами. Тут, аміак, який утворюється при розкладі органічних речовин у ґрунті, воді та інших середовищах, окислюється до азотистої, а потім азотної кислот. С.Н. Виноградський, ще у 1890-1892 рр. встановив, що одна група із нітрифікуючих мікроорганізмів окислює аміак до азотистої кислоти, а друга окислює азотисту кислоту до азотної. До нітрифікаторів першої фази відносять представників п'яти родів: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* і *Nitrosovibrio*. До нітрифікаторів другої фази належать представники родів *Nitrobacter*, *Nitrospira* і *Nitrococcus* (рис.14.21).

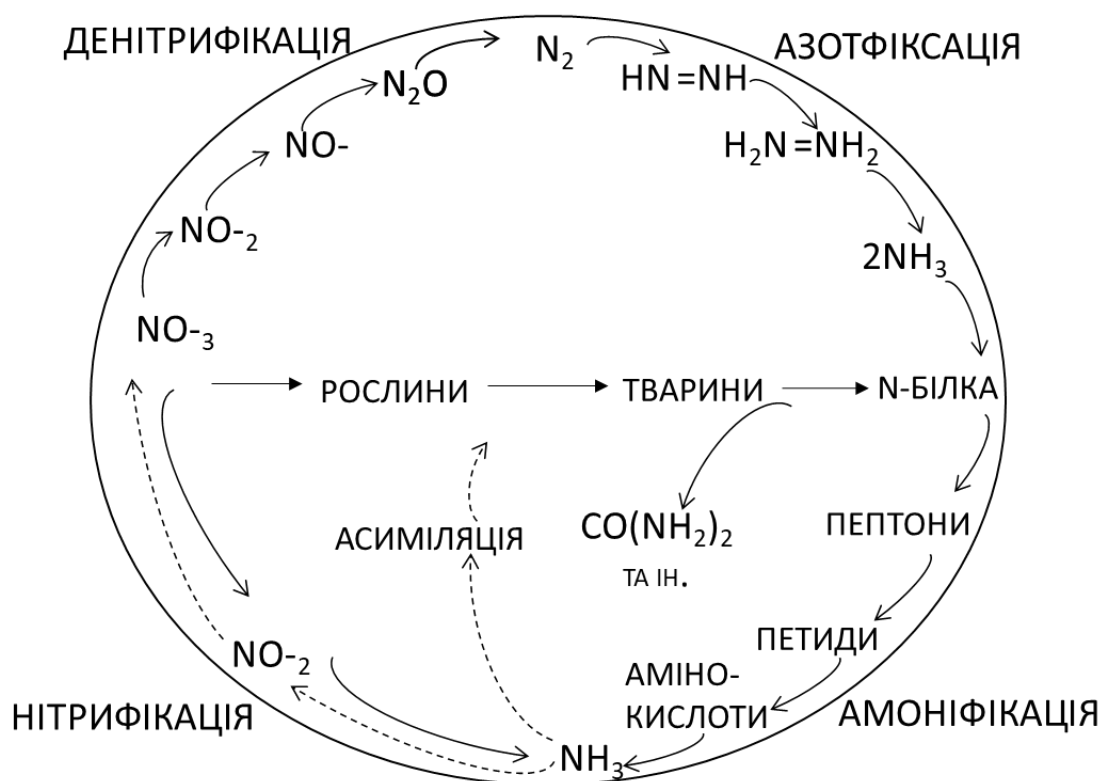


Рис. 14.21. Основні етапи кругообігу азоту

За певних умов (наприклад, анаеробні умови чи наявність органічних сполук, що легко розщеплюються) нітратний азот відновлюється до інших сполук азоту різних ступенів окислення або до газоподібного азоту, який

втрачається з ґрунті, виходячи в атмосферу. Процес, внаслідок якого окислені форми азоту (нітрати, нітрити) відновлюються до газоподібних називається денітрифікацією, а мікроорганізми, що беруть в ньому участь – денітрифікаторами. Денітрифікуючі бактерії (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paracoccus*) використовують нітрати як акцептор водню при відсутності O_2 для окислення органічних речовин. У присутності нітратів денітрифікатори ростуть анаеробно, а без них – аеробно. Процес денітрифікації призводить до істотних втрат із ґрунту доступних для рослин форм азоту, а також приблизно до 15% азотних добрив, що вносяться в ґрунт. Іноді для запобігання втрат нітратів та процесу денітрифікації використовують хімічні інгібітори нітрифікації. Це такі сполуки, як наприклад, нітрапірін, діциандіамід (DCD), 3,4-діметилпіразолфосфат (DMPP), 3-метилпіразол (3-MP або КМП) та інші. Такі інгібітори блокують окислення NH_4^+ до нітритів. Препарати на основі нітрапірину, можна вносити з сухими добривами, в т.ч. і з органікою, однак найкраще його застосовувати з рідкими добривами – КАС та аміачною водою, в т. ч. через сопла розпилювачів. Ці препарати слід заробляти в ґрунт або з основним внесенням, або з передпосівною культивацією. Для того, щоб вони спрацювали, необхідна волога – 10-15 мм протягом 10 днів після внесення.

Значна кількість азотовмісних мінеральних сполук іммобілізується (засвоюється) мікроорганізмами внаслідок чого переходить у недоступну для рослин форму.

Важливою ланкою кругообігу азоту є зв'язування його молекулярної форми в доступні для рослин сполуки. Цей процес називається – азотфіксація (біологічна фіксація азоту) та відбувається за допомогою азотфіксуючих бактерій, які зв'язують (фіксують) газоподібний азот із утворенням його амонійної форми (NH і солей амонію).

Біологічна фіксація молекулярного азоту атмосфери за допомогою бактерій є біологічною альтернативою мінеральним азотним добривам в сільському господарстві. Відомо, що біологічний азот, менш схильний до вилуговування, сублімації та денітрифікації, оскільки ця хімічна речовина використовується на місці. Біологічна фіксація азоту відбувається, як правило, при помірних температурах і є економічно вигідною та екологічно безпечною альтернативою хімічним добривам.

Взагалі, відомо два основних природних шляхи зв'язування молекулярного азоту – фізико-хімічний та біологічний. Перший пов'язаний із впливом на молекулярний азот електричних розрядів, які бувають під час грози. Кількість зв'язаного таким чином азоту незначна та не відіграє великої ролі в живленні рослин. Другий шлях фіксації молекулярного азоту пов'язаний із життєдіяльністю мікроорганізмів, що належать до двох груп: мікроби, які перебувають у симбіозі з рослинами, та азотфіксатори, що вільно живуть у ґрунті та воді.

Азофіксатори бувають – вільноіснуючі (ціанобактерії, *Azotobacter* та ін.), ризосферні (*Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Citrobacter* та ін.) та симбіотичні (бульбочкові) (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mezorhizobium*, *Allorhizobium* та ін.) (табл 14.3). Всі азотфіксатори в тій чи іншій мірі відіграють важливу роль не лише у кругообігу азоту, а й у життєдіяльності рослин.

Таблиця 14.3

Типи взаємодій рослин із азотфіксуючими мікроорганізмами

Система фіксації азоту (та мікробна взаємодія)	Симбіотична (напр. <i>Rhizobium</i>) 	Асоціативна (напр. <i>Azospirillum</i>) 	Вільноіснуюча (напр. <i>Azotobacter</i>) 	
Джерело енергії (органічного вуглецю)	Цукри рослини-господаря	Кореневі екsudати рослини-господаря	Гетеротрофи (рослинні рештки)	Автотрофи (за рахунок фотосинтезу)
Розташування бактерій	У ризосфері кореня	Всередині кореня	У ґрунті навколо кореня	
Рівень фіксації азоту (кг/га/рік)	50-400	10-120	1-2	10-80

Так, наприклад, *Azotobacter* відіграє важливу роль у кругообігу азоту в природі, оскільки володіє різними метаболічними функціями. Окрім фіксації азоту, азотобактер має здатність виробляти вітаміни, такі як тіамін і рибофлавін, а також рослинні гормони – гетероауксин (ІОК), гібереліни (ГА) та цитокініни (ЦК). Цей рід включає в себе різні види, а саме: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. armeniacus* і *A. paspali*. *A. chroococcum* покращує ріст рослин завдяки підвищенню схожості насіння та збільшення кореневої архітектури, шляхом пригнічення патогенних мікроорганізмів навколо кореневої системи культурних рослин. Він використовується в якості біодобрива для різних культур, таких як пшениця, овес, ячмінь, гірчиця, сезам, рис, льон, соняшник, рицина, кукурудза, сорго, бавовна, джут, цукровий буряк, тютюн, чай, кава, і кокоси.

Azospirillum це ще один рід вільноіснуючих, рухливих, аеробних бактерій, що може жити в різних умовах та сприяти різним аспектам росту та розвитку рослин. Було показано, що *Azospirillum* сприяє врожайності сільськогосподарських культур, як в умовах закритого ґрунту, так і в польових випробуваннях. Різні види роду *Azospirillum*, що включають *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens* і *A. irakense* зареєстровані як добрива для підвищення продуктивності різних культур. Цікавим є той факт, що інокуляція бактеріями *Azospirillum* може змінювати кореневу морфологію за допомогою продукування ріст регулюючих сполук та сидерофорів. Це також збільшує число бічних коренів і посилює утворення корневих волосків, що забезпечує більшу площу поверхні кореня і дозволяє абсорбувати достатню кількість поживних речовин.

Найбільш відомим прикладом успішного використання бактерій є обробка насіння бобових симбіотичними мікроорганізмами – ризобіями, яка націлена на максимальну реалізацію потенціалу врожайності шляхом внесення високої кількості життєздатних ризобій до ризосфери, для забезпечення швидкої колонізації, нодуляції і фіксації атмосферного азоту (N_2) за допомогою обраного штаму інокулянту.

Rhizobia – загальна назва для широкого кола бактерій, які здебільшого фіксують азот у симбіозі з бобовими рослинами-господарями. До 1982 року один бактеріальний рід, *Rhizobium*, був представлений таким, що має ці властивості. На сьогоднішній день ризобії поширені в класах *Alphaproteobacteria* і *Betaproteobacteria* виду *Proteobacteria*. Альфапротеобактеріальні ризобії належать до родин *Bradyrhizobiaceae*, *Brucellaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Phyllobacteriaceae* та *Rhizobiaceae* порядку *Rhizobiales*. Кількість описаних ризобіальних родів до 2011 р. зросла до 17. Роди *Agrobacterium*, *Allorhizobium*,

Aminobacter, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* та *Synorhizobium* було віднесено до протеобактерій; *Burkholderia*, *Cupriavidus* та *Herbaspirillum* належать до родин *Burkholderiaceae* та *Oxalobacteraceae* класу *Betaproteobacteria*. На сьогодні 21 бактеріальний рід ідентифіковано як мікросимбіонти, що утворюють бульбочки.

До порядку *Rhizobiales* входять бактерії, які функціонально не ідентичні один одному. Їх загальна особливість – формування зв'язків із рослинами та здатність викликати розростання тканин рослини-хазяїна у вигляді корневих бульбочок, галлів та ін. Це фенотипово гетерогенні, переважно аеробні, неспороутворюючі, грамнегативні паличкоподібні ґрунтові бактерії, які здатні до довготривалого сапрофітного існування без рослини-господаря.

Бульбочкові бактерії (ризобії) проникають у корінь рослини-господаря через кореневі волоски. У корені бактерії значно збільшуються у розмірах та перетворюються на особливі симбіотичні форми – бактероїди. Навколо бактероїда формується капсула з рослинної тканини й таким чином формується бульбочка. Саме у вигляді бактероїдів ризобії здатні до фіксації азоту повітря, тобто перетворюють його з газоподібної на органічну молекулу амідів або уреїдів.

Rhizobiales поділяють на повільнорослі *Bradyrhizobium* та швидкорослі *Rhizobium*. У повільнорослих ризобій клітини можуть ділитись протягом 30 годин, колонії твердих середовищах з'являються лише на 8-13 добу. Швидкорослим ризобіям властива тривалість клітинного циклу 2-4 години, і вже на 2-3 добу після висіву на тверде поживне середовище вони формують добре видимі колонії.

Важливо пам'ятати, що для кожного виду бобових притаманний свій особливий вид бактерій, на який рослина реагуватиме утворенням бульбочок. Наприклад, соя реагує

лише на види *Bradyrhizobium japonicum* (найбільш ефективні та поширені), *Bradyrhizobium elkanii* або *Sinorhizobium fredii* (табл.14.4).

Таблиця 14.4

Бактерії симбіонти бобових рослин

РОСЛИНА	Бактерія-симбіонт
Соя	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
Горох	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Люпин	<i>Bradyrhizobium sp.</i>
Нут	<i>Mesorhizobium ciceri</i>
Сочевиця	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Квасоля	<i>Rhizobium phaseoli</i>
Люцерна	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
Конюшина	<i>Rhizobium trifolii</i>
Козлятник	<i>Rhizobium galegae</i>
Лядвенець	<i>Mezorhizobium loti</i>
Еспарцет	<i>Rhizobium simplex</i>

Відносини між бульбочковими бактеріями й бобовими рослинами можна ідентифікувати як мутуалізм, тобто такий вид симбіозу, при якому обидва симбіонта отримують користь від співжиття: рослина отримує азот, а бульбочкові бактерії — азотовмісні речовини й мінеральні солі.

Окрім надання симбіотичного N, деякі ризобії також виявляють фізіологічно бажані риси, такі як синтез фітогормонів, що стимулюють ріст рослин, які включають індол-3-оцтові кислоти (ІОК), цитокініни, гібереліни, рибофлавін, люміхром, Nod фактори тощо (рис. 14.22). Таким чином, ризобії надають рослинам кілька переваг, крім забезпечення азотом від симбіотичних взаємодій.

Сприятливий вплив ризобій на рослини проявляється також в утворенні різноманітних метаболітів та ферментів, які виділяються ризобіями та рослинами під час утворення бульбочок.

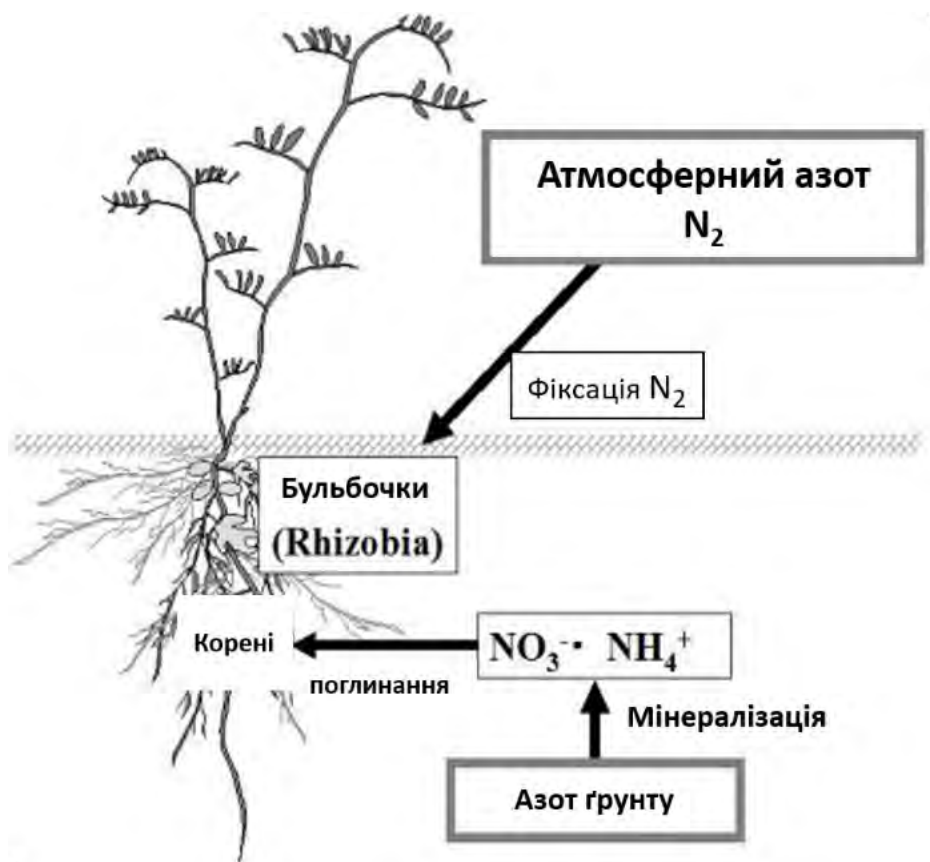


Рис. 14.22. Фіксація атмосферного азоту бульбочковими бактеріями

Відомо, що бобові культури вирощуються на площі понад 250 млн га у всьому світі та фіксують близько 90 млн т атмосферного азоту в рік. Ефективні ризобіальні інокулянти демонструють високі темпи фіксації азоту та успішно конкурують з менш ефективними аборигенними популяціями ризобій. У дослідях з інокуляції сої біопрепаратами на основі ризобій показано, що середня прибавка врожаю від застосування інокулянта становить близько 120 кг сої на га у порівнянні з інфікуванням аборигенними расами бактерій. Це відбувається за рахунок внесення бактерій прямо на насіння

(в ґрунті вони містяться хаотично) та високої активності лабораторно відібраних мікроорганізмів для створення біопрепарату. Для успішного комерційного виробництва ризобій потрібна можливість їх нарощування у великих кількостях і підвищення терміну їх зберігання. На жаль, багато мікробних продуктів не дотягують в останній специфікації, що веде до загального зниження продуктивності в польових умовах. Дослідження збереження титру на інокульованому насінні бобових культур, проведені в Австралії, показали, що кількість життєздатних ризобій на деяких насінинах рідко відповідає необхідним загальноприйнятим стандартам їх чисельності, необхідної для успішної нодуляції. У 80-90-ті роки минулого століття багато ризобіальних продуктів показали погану ефективність, проте, за останнє десятиліття якість та ефективність цих продуктів значно покращилися, і кілька комерційних продуктів демонструють постійне поліпшення врожайності бобових культур. На сьогодні препарати на основі азотфіксаторів містять значно вищі кількості життєздатних організмів на г, ніж ті, що вироблялися у попереднє десятиліття. Крім того, поліпшення рецептури продукту призвело до підвищеної стабільності препаратів.

Соеві боби містять 37-45% білка за вагою, і таким чином, при урожайності 3600 кг/га потрібно внесення 136 кг азоту. Щоб проілюструвати вплив ризобіальних продуктів на врожайність сої, розглянемо комерційні продукти, що є у продажі Monsanto BioAg Alliance (Optimize®), BASF (Vault®), ABM (Excalibre™) і MycoGold™. Окрім живих клітин *Bradyrhizobium*, Optimize® для сої містить ліпохітоолігосахариди, молекули, які підсилюють ефективність обробки. Насіння, оброблене Optimize® послідовно показує збільшення врожайності в порівнянні з необробленим контролем. Точно таким же чином, Vault®, що складається з клітин *Bradyrhizobium* і запатентованого окремо розчину для покращення дії даних бактерій. Excalibre SATM

являє собою суміш двох штамів *Bradyrhizobium*, а MycoGoldTM – суміш *Bradyrhizobium* із біостимуляторами та іншими мікроорганізмами, зокрема, мікоризою. Використання біоінокулянтів на сої послідовно забезпечує віддачу від інвестицій у співвідношенні 4:1.

Ефективність бактеріальних препаратів визначається низкою показників, зокрема:

1. Важливим фактором ефективності біопрепаратів є штами азотфіксуючих мікроорганізмів. Успішність симбіозу залежить від наявності у бульбочкових бактерій комплексу таких властивостей:

- специфічність до рослини-господаря – здатність вступати у симбіоз із чітко визначеною кількістю видів бобових рослин;

- вірулентність та конкурентоздатність – спроможність проникати в корінь рослини-господаря й викликати утворення бульбочок у присутності інших штамів цього ж виду бульбочкових бактерій;

- азотфіксувальна активність – властивість перетворювати молекулярний азот в іони амонію завдяки діяльності спеціалізованої ферментної системи;

- ефективність – здатність підвищувати врожай і вміст азоту (білка) у рослини-господаря, що пов'язано зі здатністю до синтезу додаткових фізіологічно активних сполук;

- комплементарність – ефективність взаємодії з різними сортами відповідних рослин-господарів.

2. Однією з умов високої ефективності бактеріальних добрив є їхня стерильність. Не допускати пошкодження цілісності упаковки. Після відкриття упаковки (пляшки, пакету тощо) використовувати препарат одразу. Контамінація (забруднення) препаратів іншою мікрофлорою знижує їхню вірулентність та конкурентоспроможність за відношенням до диких рас ґрунтових мікроорганізмів.

3. Дотримання правил та умов зберігання та застосування біопрепаратів.

14.4.3 Розчинення фосфатів і мобілізація калію

Поліпшення росту рослин деякими асоціативними та ґрунтовими мікроорганізмами пов'язане з їх здатністю діяти як "біодобрива" за рахунок збільшення доступності поживних речовин у ризосфері рослин. У порівнянні з іншими поживними речовинами ґрунту, фосфор є найменш мобільним і, як правило, у відносно недоступній формі для поглинання рослиною.

Поруч із азотом, ця поживна речовина є другим найбільш важливим біогенним компонентом в рослинництві. Фосфор (P) бере участь в якості структурного компонента нуклеїнових кислот, фосфоліпідів і аденозинтрифосфатів (АТФ), як ключовий елемент метаболічних і біохімічних шляхів, особливо важливий для біологічної фіксації азоту та фотосинтезу. Для подолання дефіциту P в ґрунтах, часто застосовують фосфатні добрива на сільськогосподарських полях. Рослини поглинають меншу кількість застосовуваних фосфатних добрив, а решта швидко перетворюється в нерозчинні комплекси в ґрунті. Крім того, регулярне застосування фосфорних добрив є не лише дорогим, але також екологічно небажаним.

Зазвичай кількість фосфору в ґрунті, зазвичай, досить висока (як правило, між 400 і 1200 мг на 1 кг ґрунту), через те, що велика частина цього фосфору не доступна для живлення рослин. Рослини поглинають P у двох розчинних формах: одноосновній (H_2PO_4^-) і двоосновній (HPO_4^{2-}). Проте, велика частина P присутня в нерозчинній формі і, отже, не доступна для живлення рослинами.

Таким чином, наявність P залежить від розчинності цього елемента, що може впливати на діяльність коренів рослин і

мікроорганізмів у ґрунті. Для того, щоб забезпечити найбільш ефективне використання обмежених запасів фосфорних добрив та уникнути в майбутньому нестачі, необхідно широко застосовувати у практиці сільськогосподарського виробництва фосфатмобілізуючі мікроорганізми, що забезпечить ефективне використання даного елемента. Фосфатрозчинні бактерії та гриби складають приблизно 1-50% і 0,1-0,5% від загальної чисельності мікроорганізмів у ґрунті, відповідно.

Найбільш ефективними фосфатмобілізуючими бактеріями є представники таких родів, як *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Serratia* і *Rhizobium*.

Фосфатмобілізуючі бактерії розчиняють неорганічні ґрунтові фосфати, такі як $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 і AlPO_4 , завдяки виробництву органічних кислот, сидерофорів і гідроксильних іонів. Деякі бактерії розчиняють лише фосфат кальцію, в той час як інші мікроорганізми здатні розчиняти інші форми неорганічних фосфатів із різною інтенсивністю. Бактеріальні ізоляти, що належать до родів *Enterobacter*, *Klebsiella* і *Pantoea* розчиняють $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ більшою мірою, ніж FePO_4 і AlPO_4 . Серед 336 штамів, пов'язаних з рослинами рису було відібрано 101 ізолят, що належать до роду *Burkholderia*, *Cedecea*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea* і *Pseudomonas*, які були здатні до розчинення трикальційфосфату $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Виробництво органічних кислот, зокрема, глюконових і карбонових, є одним із добре вивчених механізмів, які використовують мікроорганізми для розчинення неорганічних фосфатів. Бактерії *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Gordonia*, *Phyllobacterium* і *Delftia* використовують лимонну, глюконову, молочну, янтарну та пропіонову кислоти. Стресостійкі бактерії *Burkholderia vietnamiensis* виробляють глюконову і 2-кетоглюконову кислоти, які беруть участь в розчиненні фосфатів.

Відомо, що 10-50% від загального фосфору органічних форм фосфору в більшості ґрунтів становлять фітати, що мінералізуються за допомогою фітаз (міо-інозитол гексакіфосфат фосфогідролаз). Бактерії із фітазною активністю, були виділені з ризосферного ґрунту та запропоновані в якості RGPB для використання в ґрунтах із високим вмістом органічного фосфору. Бактеріальні ізоляти, ідентифіковані як *Advenella*, активно продукують фітази, і підвищують вміст фосфору і активізують ріст індійської гірчиці (*Brassica juncea*). Також є інформація про фітазпродукуючі бактерії, що належать до родів *Tetrathlobacter* і *Bacillus*, які також сприяли зростанню індійської гірчиці та значно покращили її живлення фосфором. Деякі дослідники повідомляли, що позаклітинні фітази виділені із *B. amyloliquefaciens* FZB45 сприяли зростанню проростків кукурудзи. Синтезом фітаз характеризуються й інші ризосферні бактерії, такі як, наприклад, *Bacillus* sp., *Cellulosimicrobium* sp., *Acetobacter* sp., *Klebsiella terrigena*, *Pseudomonas* sp., *Paenibacillus* sp. та *Enterobacter* sp.

Отже, як правило, розчинення неорганічного фосфору відбувається в результаті дії низькомолекулярних органічних кислот. З іншого боку, мінералізація органічного фосфору відбувається шляхом синтезу безлічі різних фосфатаз, каталізацією гідролізу складних ефірів фосфорної кислоти. Важливо відзначити, що розчинення фосфатів та їх мінералізація можуть співіснувати в одному бактеріальному штамі. Бактерії з обома активностями (виробництво органічних кислот для розчинення неорганічних фосфатів і виробництво фітаз для мінералізації фітатів), були виділені з ризосфери різних рослин, таких, як райграс пасовищний (*Lolium perenne* L.), біла конюшина (*Trifolium repens* L.), пшениця (*Triticum aestivum* L.), овес (*Avena sativa* L.) і люпин жовтий (*Lupinus luteus* L.).

Крім забезпечення рослин фосфором, фосфатмобілізуючі бактерії також збільшують ріст рослин шляхом стимулювання ефективності біологічної фіксації азоту, підвищення доступності інших мікроелементів, синтезу важливих для росту рослин речовин. Так, наприклад, фосфатмобілізуючий бактеріальний штам НДІ-0909 з *Micrococcus* sp. окрім розчинення фосфатів продукує сидерофори. У ризосфері соняшника були виявлені *Enterobacter* і *Burkholderia*, які окрім розчинення фосфатів також продукують сидерофори та індольні сполуки.

Мікроміцети *Fusarium*, *Sclerotium*, *Aspergillus* та *Penicillium* були зареєстровані, як активні фосфатмобілізатори. *Aspergillus fumigatus* та *A. niger* були виділені з кори рослин кассави що розкладалася, в якій, як виявилось, вони перетворюють рештки кассави в фосфатні добрива, шляхом напівтвердої ферментації.

Підвищення врожайності в результаті застосування комерційних препаратів фосфатмобілізуючих організмів було відмічено при застосуванні бактерій *Bacillus* і *Pseudomonas* (Symbion-P®), а також таксонів грибів *Aspergillus* та *Penicillium*. При порівнянні ефективності розчинення фосфатів між бактеріями та грибами, було виявлено, що гриби виявляють більшу активність, ніж бактерії. Так, наприклад, *Penicillium bilaiae* є біологічною основою комерційного препарату Jumpstart®, що випускається фірмою Monsanto BioAg Alliance і рекомендується для використання з пшеницею та ріпаком. Вищезгаданий мікроорганізм розчиняє фосфор за допомогою виділення лимонної та щавлевої кислот. Канадські виробники пшениці звітують, що середній приріст врожайності після застосування препарату складає ~ 6%, також є повідомлення про значно більший приріст врожайності – до 66 % для пшениці, хоча багаторічні результати випробування в різних регіонах світу вказують лише на незначну прибавку – близько 2–3%.

Каліймобілізуючі мікроорганізми, такі як *Aspergillus*, *Bacillus* та *Clostridium*, знайдені в ризосфері різних культур, є ефективними у підвищенні доступності калію в ґрунті та мають механізми схожі із тими завдяки яким відбувається мобілізація фосфатів.

14.4.4. Підбір і оптимізація поживних середовищ для культивування агрономічно-корисних мікроорганізмів

Основна частина біопрепаратів для сільського господарства це препарати на основі біомаси мікроорганізмів. Підбір та оптимізація поживних середовищ для вирощування продуценту є важливим етапом на шляху створення рентабельного біотехнологічного продукту. Оптимальне поживне середовище росту забезпечує значний вихід біомаси бактерій або максимально можливий вихід необхідної речовини, що вона продукує (фітогормони, ферменти, антибіотики тощо), які є основою для створення біопрепарату для стимуляції росту рослин та підвищення їх врожайності. При створення більшості біопрепаратів для сільського господарства необхідно оптимізувати середовище, що буде забезпечувати швидкий приріст біомаси бактерій.

Фізіологічні процеси у мікроорганізмів суттєво відрізняються, тому не існує універсального середовища придатного для росту всіх мікроорганізмів. Так, зміна навіть кількості однієї із речовин у поживному середовищі може суттєво впливати на ріст навіть різних штамів одного виду мікроорганізмів. Тому, середовища для їх культивування підбираються індивідуально для кожного штаму-продуцента. Вони повинні містити в собі джерела вуглецю, азоту, й різні мікро- і макроелементи. Також, приріст мікробної біомаси безпосередньо залежить від їх умов культивування, таких як: температура вирощування, рН середовища, швидкість масообміну, аерація та ін.

При підборі джерел вуглецю необхідно враховувати, які вуглеводи здатний засвоювати даний мікроорганізм. Найважливішими джерелами вуглецю для культивування мікроорганізмів є різні цукри (глюкоза, сахароза, фруктоза, галактоза тощо), багатоатомні спирти (сорбіт, манітол, гліцерин та ін.), рідше вуглеводні (крохмаль, целюлоза, глікоген, хітин та ін.). Іноді в якості джерел вуглецю використовують кислоти: бурштинову, піровиноградну, оцтову молочну тощо.

Джерела азоту також дуже суттєво впливають, як на приріст біомаси мікроорганізмів, так і на синтез ними різноманітних біологічно активних речовин. Джерела азоту поділяються на органічні та неорганічні. До органічних джерел азоту відносяться кукурудзяний та дріжджовий екстракти, різні пептони (м'ясний, соєвий, пшеничний), соєве борошно та ін. До неорганічних джерел відносять різні амонійні солі, солі азотної (рідше азотистої) кислоти, амінокислоти. Органічні джерела азоту є комплексом великої кількості різних азотовмісних речовин, що ускладнює їх застосування. Склад речовин у різних партіях сировини може дуже сильно коливатися і це може призвести до великого розкиду показників продуктивності штаму. Азотфіксуючі мікроорганізми часто вирощують на безазотних середовищах.

Джерелами мінерального живлення мікроорганізмів служать фосфор, сірка та інші мікро- і макроелементи.

Сірка є важливим елементом живлення мікроорганізмів, бо входить до складу амінокислот, вітамінів та певних кофакторів. Найчастіше сірка міститься в поживних середовищах у вигляді різних сульфатів. Найчастіше для вирощування мікроорганізмів використовують MgSO_4 .

Фосфор – входить до складу нуклеїнових кислот, коферментів і фосфоліпідів. У поживних середовищах джерелом фосфору найчастіше є фосфати (солі фосфорної кислоти).

Деякі мікроорганізми вимагають також наявності у середовищі так званих факторів росту, до яких належать – вітаміни, пурини, піримідини та амінокислоти. Поживні середовища для таких мікроорганізмів можуть включати, наприклад, одну, кілька або повний набір амінокислот.

14.5. Методи вивчення та виділення симбіотичних азотфіксуючих мікроорганізмів (ризобій)

Для створення нових біопрепаратів на основі ризобій беруть ґрунт у якому росте необхідна рослина-симбіонт у регіонах, де її раніше не вирощували. Відбір проб ґрунту та ґрунтову суспензію готують згідно методики описаної вище (див. розділ 1.3 Методи вивчення біорізноманіття мікробних спільнот. Визначення чисельності, складу та активності ґрунтових мікроорганізмів). Ґрунтову суспензію висівають на середовище для культивування ризобій.

Якщо в умовах, що було зазначено вище (регіонах, де раніше цю рослину не вирощували), знайдено рослин, які утворили бульбочки то можна отримати чисту культуру з них. Для цього необхідно відділити бульбочки від коренів, ретельно промити водою, простерилізувати спиртом та після чого спробувати виділити мікроорганізм-симбіонт.

14.5.1. Культивування ізолятів ризобій

Культивування симбіотичних мікроорганізмів проводять на живильних середовищах в чашках Петрі. Живильні середовища повинні містити всі необхідні компоненти для нормального розвитку мікроорганізмів, з урахуванням всіх їх фізіологічних особливостей. Окрім того вони повинні відповідати таким вимогам:

- Бути поживними;

- Містити необхідні поживні речовини у легкозасвоюваній формі (мінеральні, азотисті, вуглеводневі речовини);

- Містити необхідну кількість вологи;
- Значення pH;
- Окисно-відновний потенціал Eh;
- Бути хорошими буферами;
- Бути ізотонічними відносно мікробної клітини;
- Бути стерильними та прозорими.

Універсальним середовищем для вирощування більшості бульбочкових бактерій є бульйон що містить у 1 літрі води 1 г дріжджового екстракту, 10 г бактотриптон у та 1 г хлористого натрію. Для отримання твердого середовища до цих компонентів додають 15 г агар-агару. Для роботи із ризобіями, виділення їх в чисту культуру (із ґрунту або бульбочки) зазвичай проводять висів на бобовий (гороховий) відвар, наступного складу: бобовий відвар (100 г гороху) – 1л, маніт (або сахароза) – 10 г, KH_2PO_4 – 1 г, агар-агар – 15 г.

Для більшості повільнорослих бульбочкових бактерій (*Bradyrhizobium*) використовують манітно-дріжджове середовище (МДА), яке має наступний склад (г/л): KH_2PO_4 - 0,5, дріжджовий екстракт – 1, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,2; CaCO_3 – сліди; NaCl - 0,1; маніт – 10,0; агар-агар – 15 г.

Найбільш поширеним способом виділення чистих культур є непрямі методи, засновані на ізоляції однієї мікробної клітини від маси мікроорганізмів і наступному вирощуванні потомства цієї клітини на поживних середовищах ізольовано від інших видів. Для посіву частіше використовуються агаризовані поживні середовища в чашках Петрі. Цей метод запропонований відомим німецьким мікробіологом Кохом і називається методом пластинчастих (або чашкових) культур Коха.

Метод Дригальського заснований на механічному розподілі мікробних клітин на поверхні щільного живильного середовища в чашках Петрі. Кожна мікробна клітина, фіксуючись в певному місці, починає розмножуватися, утворюючи колонію. Для посіву за методом Дригальського використовують декілька чашок Петрі, залитих щільним поживним середовищем. На поверхню середовища вносять краплю досліджуваного матеріалу. Потім за допомогою стерильного шпателя цю краплю розподіляють по всьому живильному середовищі (посів газоном).

Посів також можна проводити штрихом, використовуючи бактеріологічну петлю. Цим же шпателем або петлею здійснюють посів у другу, третю і т.д. чашки. Як правило, в першій чашці після культивування посіву мікроорганізми ростуть у вигляді суцільного шару, в подальших чашках кількість мікроорганізмів знижується та утворюються ізольовані колонії, з яких відсівом можна легко виділити чисту культуру. Отже, у перших секторах спостерігається суцільний ріст бактерій, а вздовж наступних штрихів ростуть відокремлені колонії, що представляють собою нащадків однієї клітини.

Для виділення ізольованих колоній з бактеріальної суміші роблять посів штрихом у чашку Петрі із відповідним середовищем (МДА або бобовий агар) за методом виснаження штрихів. Далі чашки поміщають в термостат з оптимальною температурою для культивування ризобій – 26-28°C протягом 4-7 діб. Посіви розглядають, виділяють ізольовані колонії, які відрізняються за зовнішнім виглядом та мають характерні для ризобій властивості та відсівають їх, як чисті культури, паралельно готуючи з описаних колоній фіксовані мазки та фарбують їх за Грамом.

Колонії швидкорослих ризобій білуваті, часто напівпрозорі, з рівними краями, помірно опуклі. Із часом сильно розростаються чого ніколи не стається із

повільнорослими ризобіями. Жоден штам із повільнорослих ризобій не росте на м'ясо-пептонному агарі (МПА). Швидкорослі бульбочкові бактерії, за виключенням ризобій люцерни, буркуна та пажитніку, на МПА не ростуть. Тому, необхідно обов'язково висівати виділений ізолят на дане середовище для того щоб впевнитися чи він на ньому не росте.

14.5.2. Ідентифікація виділених ізолятів ризобій

Вже давно розроблено різноманітні доступні й швидкі тести, які дозволяють, як мінімум в загальних рисах, ідентифікувати виділені мікроорганізми. У відношенні бактерій найбільшого поширення знайшли підходи до систематизації запропоновані американським бактеріологом Девідом Берджі, що враховують один або декілька найбільш характерних ознак. "Визначник бактерій Берджі" - характерний приклад зручної штучної систематики. Згідно з цими принципами, мікроорганізми легко об'єднуються у великі групи, а тому дуже зручно ідентифікуються.

При ідентифікації та класифікації мікроорганізмів проводять вивчення певних генотипових та фенотипових характеристик, які притаманні об'єкту що досліджується.

По-перше це морфологічні ознаки – форма та розмір клітин, особливості їх взаємного розташування, структура. Так, клітини *Bradyrhizobium* мають паличковидну форму та мають один субполярний або полярний джгутик, у віці 1-3-х діб рухливі.

Друге – це тинкторіальні властивості культури, тобто, ставлення до різних фарбників (характер фарбування), перш за все до забарвленням по Граму. За цією ознакою всі мікроорганізми поділяють на грампозитивні (+) та грамотрицательні (-). Ризобії відносяться до групи грамотрицательних мікроорганізмів.

Дослідження морфологічних властивостей та відношення до забарвлення за Грамом є основними тестами, що дозволяють віднести досліджуваний мікроорганізм до певних таксонів – родини та роду.

Третє – дослідження характеру росту мікроорганізму на поживних середовищах. Так, культура *Bradyrhizobium* на 3-5 добу росту на чашках Петрі утворює колонії округлої форми, напівпрозорі, слизисті, їх діаметр досягає 2-5 мм. Штрих слизистий, напівпрозорий, опуклий.

Дуже важливою частиною, більш детальної ідентифікації є біохімічні тести. Ці тести показують здатність даних мікроорганізмів ферментувати різні субстрати (вуглеводи, білки та амінокислоти тощо), синтезувати в процесі своєї життєдіяльності різні біохімічні продукти за рахунок активності різних ферментних систем і особливостей обміну речовин.

Фізіологічні дослідження – це способи вуглеводного (аутотрофи, гетеротрофи), азотного (аміноавтотрофи, аміногетеротрофи) та інших видів харчування, тип дихання (аероби, мікроаерофіли, факультативні анаероби, строгі анаероби).

Для більшості штамів *Bradyrhizobium* характерні такі фізіологічні та біохімічні ознаки: вони аероби; молоко з лакмусом не пептонізують, здатні підвищувати рН середовища до лужного; желатину не розріджують; щодо відношення до джерел вуглецю – добре ростуть на середовищах із глюкозою, галактозою, арабінозою, манітом та сорбітом, помірно використовують рамнозу, мальтозу і сахарозу, дуже слабо – ксилозу, не засвоюють дульцит та рафінозу; добре ростуть на середовищах із амонійними солями, азотнокислим калієм, гліцином та тирозином, переважно використовують відновлені форми азоту; на м'ясо-пептонному агарі та м'ясопептонному бульйоні не ростуть; чутливі до більшості антибіотиків.

Важливим етапом ідентифікації є здатність мікроорганізму до спороутворення. Так, наприклад всі ризобії відносяться до неспороутворюючих мікроорганізмів.

Також, іноді проводять антигенні тести, що залежать переважно від хімічного складу та будови клітинної стінки, наявності джгутиків, капсули, розпізнаються за здатністю макроорганізму (господаря) виробляти антитіла та інші форми імунної відповіді і виявляються в імунологічних реакціях. Такі тести поширені в медичній мікробіології.

Для детальних характеристик штамів використовують дослідження хімічного складу клітинних стінок мікроорганізмів, – основних цукрів і амінокислот, а також ліпідний та жирнокислотний склад.

В останні десятиріччя для класифікації мікроорганізмів, крім їх фенотипічних характеристик, широко використовуються різні генетичні методи (вивчення генотипових властивостей), для чого використовуються такі методи як рестрикційний аналіз, ДНК-ДНК гібридизація, ПЦР, сиквенс та ін.

14.5.3. Визначення нітрогеназної активності

Для точної характеристики ефективності утвореного симбіозу рослини-господаря та мікроорганізму-симбіонта проводять вимірювання нітрогеназної активності. Для цього відмиті корені рослин розміщують у герметичних флаконах, з яких відбирають по 5 мл газової фази та додають по 5 мл ацетилену допоки газова фаза не збільшиться на 10%. Вміст цього флакону інкубують протягом однієї години за температури 22°C, обов'язково накриваючи зразки для створення темряви (зادля запобігання розкладання газу). Після завершення інкубації 1мл газової суміші, що містить етилен, який утворився в результаті редукції ацетилену нітрогеназою, аналізують на хроматографі «Chrom 4» в

режимі полум'яно-іонізаційного детектування. Розділення відбувається на колонці розміром 0,40×130 см, яка заповнена Рагорак Т при температурі 80°C. В якості газу-носія використовують гелій (40 см³/хв), як стандарт використовують – чистий етилен.

Шляхом поступового розбавлення етилену повітрям готують калібрувальну суміш, яку аналізують хроматографічним методом. При остаточному розрахунку обов'язково враховують калібрувальний коефіцієнт. Коли аналіз завершено проводять вимірювання газової фази кожного флакону разом із коренем рослини та масу кореневих бульбочок даної рослини – показники, необхідні для обрахунку ацетилен-відновлювальної активності. Утворену з ацетилену за час інкубування зразка (1 або 2 год) під дією нітрогенази, кількість етилену виражали в молярних одиницях (мкмоль або наномоль C₂H₄).

Нітрогеназну активність симбіотичного апарату було виражають в мкмоль C₂H₄/(рослину • год) – загальна активність, мкмоль C₂H₄/(г бульбочок • год) – питома активність. Нітрогеназну активність однієї морфо-структурної симбіотичної одиниці (бульбочки) прийнято в мкмоль або наномоль C₂H₄/(бульбочку • год) та мкмоль або наномоль C₂H₄/(масу бульбочки • год). Азотфіксувальну здатність оцінюють на ранній стадії розвитку рослини (одного-трьох справжніх листків). Вимірювання здійснюють у 4–9-кратній повторності на варіант.

Лабораторна робота 2. Виділення чистих культур бульбочкових бактерій

Для створення інокулянту на основі симбіотичних бактерій необхідно, в першу чергу, виділити необхідний мікроорганізм для необхідної рослини-симбіонта, на основі такої культури створюється біопрепарат. Для виявлення

нових штамів ризобій беруть ґрунт в якому росте необхідна рослина у регіонах, де її раніше не вирощували. Якщо в таких умовах знайдено рослин, які утворили бульбочки то можна отримати чисту культуру з них.

Мета: оволодіти методом виділення із ґрунту або бульбочок сої чистої культури ризобій.

Завдання.

1. Отримати накопичувальні культури мікроорганізмів симбіонтів бобових рослин (соя, горох, нут тощо).

2. Одержати чисті культури бульбочкових бактерій симбіонтів рослин сої (горох, нут тощо). Описати морфолого-культуральні властивості заданого виду бактерій. Знайти систематичне положення бактерій за визначником Берджі. Перевірити їх здатність до формування симбіозу.

Обладнання та посуд: технічна вага, мікроскоп, предметні та покривні скельця, набори для фарбування за Грамом, термостат для вирощування мікроорганізмів, фарфорові ступки, чашки Петрі, мікробіологічні петлі, пробірки, колби, піпетки, шпателі Дригальського, скальпелі, набори для біохімічних тестів для мікроорганізмів.

Хід роботи.

1. **Методика отримання накопичувальних культур ризобій шляхом виділення їх із бульбочок рослини-симбіонта (соя, нут, горох тощо).**

Для виділення мікроорганізмів роду *Rhizobium* відбирають бобові рослини певного виду (соя, горох, люцерна, нут тощо) із добре розвинутою кореневою системою та наявним кореневими бульбочками. Активність бульбочок при відборі зразків визначають візуально – утворення лег-гемоглобіну надає їм червоно-рожевого забарвлення на зрізі. Неактивні бульбочки, навпаки, мають коричневе або зелене забарвлення. Відбираємо активні бульбочки які потім ретельно промиваємо та переносимо на поверхню поживного

середовища (МДА, бобовий агар) у чашці Петрі, розрізаємо їх стерильним скальпелем (без прокалювання!) та послідовно розсіваємо вміст бульбочки ще на 4 чашки Петрі. Вирощують в термостаті при температурі 26-28°C. Відбір ізолятів проводять на 4-5 добу. Колонії відбирають по типовому зовнішньому вигляду та пересівають на чашки із МДА.

Типові культурально-морфологічні ознаки повільнорослих ризобій (*Bradyrhizobium japonicum*): добре росте на манітно-дріжджовому середовищі, штрих слизистий, напівпрозорий, опуклий. На 4-7 добу росту колонії округлої форми, напівпрозорі, слизисті. Діаметр колоній 2-6 мм.

Типові культурально-морфологічні ознаки швидкорослих ризобій (*Rhizobium leguminosarum*): культура дає слизистий, молочно-білий ріст, колонії з'являються на поверхні агару на 2-3 добу. Колонії поверхневі, білого кольору, з рівними краями, діаметром не більше 5 мм. Із часом колонії можуть ослизнюватись та розтікатися.

2. Аналіз та характеристика виділених мікроорганізмів.

А) Дослідження та опис характеру росту виділених ізолятів;

Б) Дослідження морфологічних ознак виділених мікроорганізмів – мікроскопія, опис клітин, наявність джгутиків, здатність до спороутворення;

В) Фарбування за Грамом отриманих культур мікроорганізмів;

Г) Виявлення деяких фізіолого-біохімічних ознак.

1) Для аналізу та характеристики росту виділених ізолятів беруть накопичувальні культури мікроорганізмів, що було отримано раніше із окремих типових колоній ризобій. Детально описують їх ріст по штриху, розмір та форму

колоній, їх колір і швидкість росту на середовищі яке було взято в роботу.

2) Для дослідження морфологічних ознак клітин проводять мікроскопію препарату бактерій по методу – «роздавлена крапля». Для цього готують препарат предметне скло наносять (мікробіологічною петлею) краплю культури бактерій із краплею фізіологічного розчину та обережно перемішують до гомогенного стану. Нанесену на предметне скло краплю розчавлюють; для цього беруть покривне скло і ставлять на ребро в краю краплі та обережно опускають, поступово витісняючи повітря, що знаходиться між предметним і покривним склом, щоб уникнути утворення в краплі бульбашок повітря. У правильно приготованому препараті роздавленої краплі обидва скла щільно склеюються й рідина найтоншим шаром заповнює простір між ними, не виступаючи за краї покривного скла. Проводять мікроскопію даного препарат використовуючи об'єктиви x40 або x50. Треба не забувати, що такі препарати швидко висихають, тому слід переглядати їх відразу після виготовлення. Описують форму, розмір та здатність до руху виявлених бактерій. Також, в даному препараті можна провести виявлення спор. Спори мають вищий показник заломлення світла, ніж цитоплазма, тому при мікроскопії зразка «роздавлена крапля» вони виглядають як темніші включення округлої чи овальної форми.

Для виявлення джгутиків проводять фарбування по методу Леффлера. Для цього на предметне скло нанести декілька крапель суспензії бактерій, висушити та зафіксувати у полум'ї пальника. Обробити фіксований препарат протравою Леффлера 10 хв, прогріти на водяній бані. Обережно промити препарат водою Профарбувати фуксином Циля 2-3 хв, тримаючи на водяній бані. Ретельно промити водою, висушити на повітрі. Препарат розглянути в імерсійній

системі мікроскопа. Джгутики та клітини повинні зафарбуватися в червоний колір.

3) Методика фарбування по Граму. На предметному склі готують тонкий мазок із колонії мікроорганізмів, що досліджується. Фіксують мазок в пальнику спиртівки. На фіксований мазок кладуть просочений фарбою генціанвіолету фільтрований папір і наносять 2-3 краплі дистильованої води і через 1,5 хв його знімають, а залишки фарби зливають. На мазок наносять розчин Люголя і через 2 хвилини його також зливають. Мазок знебарвлюють 96% етиловим спиртом, наносячи його на 20-30 с, після чого мазок ретельно промивають водою. На 1-2 хв наносять фуксин Пфейфера. Фарбу змивають, а препарат висушують, і мікроскопують. Грампозитивні мікроби фарбуються у фіолетовий колір, і грамнегативні у червоний.

Описують форму та колір виявлених у зразку мікроорганізмів.

4) Тести на використання цукрів і спиртів. Найчастіше для цього дослідів використовують – арабінозу, ксилозу, глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, гліцерин та маніт – у кількості 1%. Ріст на середовищах з цими сполуками може приводити до нагромадження кислот, газів тощо. Це реєструють додаванням індикаторів які змінюють колір при зміні рН. Для цього додаємо бромтимоловий синій – 2 мл спиртового розчину на 1 л середовища росту, після підкислення середовища індикатор змінює забарвлення із синього на жовте. Результати оцінюють через 2-5 діб після посіву культури.

Додаванням поплавка в рідке середовище росту (без додавання агар-агару) дозволяє виявити утворення газу культурою бактерій. Поплавок – мініатюрна пробірка, що додається в середовище запаяним кінцем догори, з якого витісняють повітря перевертанням вмісту пробірки. Утворений газ можна буде спостерігати в середині поплавка або він буде

підніматися до поверхні вмісту пробірки. Результати оцінюють через 2-5 діб після посіву культури.

Тест на розрідження желатини – спостерігають у результаті посіву досліджуваних бактерій у стовпець м'ясо-пептонної желатини (МЖП), результат оцінюють візуально. МПЖ готують наступним чином: в 1 л м'ясо-пептонного бульйону (приготованого заздалегідь) поміщають 100-150 г желатину, залишити на 20-30 хвилин для набухання, потім нагріти до повного його розчинення. Середовище розлити у пробірки по 8-10 мл (високим стовпчиком), і автоклавують за 0,5 атм 20 хвилин. Температура плавлення желатини залежить від відсоткового вмісту в середовищі – 10% желатину плавиться при 24°C, 15% – при 25°C. У літню пору середовища готують, додаючи 15% желатини. Готове, ще рідке середовище в пробірках залишають застигати високим стовпчиком. Після чого мікробну біомасу вносимо уколом в середину середовища.

3. Перевірка чистоти виділених ізолятів мікроорганізмів. Чистоту мікроорганізмів перевірити візуально, оцінюючи однорідність росту мікроорганізмів, морфологію колоній, мікроскопічно (фарбування за Грамом, відповідний тип клітин та їх розмір) – всі дані показники повинні відповідати характеристикам ризобій, що досліджуються. Також, обов'язково проводять висівання на різні селективні середовища, у випадку із ризобіями – вони не повинні рости на м'ясо-пептонному агарі (МПА)!. Середовище МПА готують із готового сухого порошку (промисловий Nutrient agar), згідно рекомендацій виробника які зазначені на упаковці (зазвичай 15-23 г сухого порошку на 1 л дистильованої води) та розливається в чашки Петрі на які потім висівають ізоляти мікроорганізмів. Вирощують у термостаті при температурі 26-28°C протягом 2-3 діб.

4. Перевірка здатності виділеної чистої культури до створення симбіотичного апарату.

Насіння культури симбіонта досліджуваної бактерії перед посівом стерилізують 70% етиловим спиртом (10-15 хв), промивають стерильною водою (проточною 5 хвилин), потім інокують суспензією виділених ізолятів (*Bradyrhizobium japonicum* тощо). Титр суспензій для інокуляції (обробки) насіння 10^7 – 10^8 кл./мл. Насіння обробляють в кількості 1 мл суспензії мікроорганізмів на 10 г насіння. Контролем слугують рослини, інокульовані активним вихідним штамом (промисловим препаратом що містить даний мікроорганізм). На рослинах, які інокульовані ризобіями повинні утворитися бульбочки через 4-6 тижнів після сходів (в залежності від виду взятої рослини). Для цього рослини обережно виймаються із ґрунту, піску чи вермікуліту (що було взято в якості простерилізованого субстрату вирощування), коріння промивають та наявність бульбочок виявляють візуально. Відзначають колір бульбочок розрізаючи їх скальпелем навпіл (зелені, рожеві, коричневі). По можливості виміряють нітрогеназну активність за допомогою газового хроматографа.

14.6. Способи культивування мікроорганізмів

Культивування – це процес вирощування мікроорганізмів в (або на) живильному середовищі, при якому відбувається їх розмноження, накопичення біомаси і продуктів метаболізму (продуктів мікробного синтезу). Спосіб культивування залежить від кінцевої мети культивування (метою є або накопичення біомаси, або отримання певного продукту життєдіяльності – метаболіти).

Ферментація (культивування мікроорганізмів) – це вся сукупність послідовних операцій від внесення у заздалегідь приготовлене пживне середовище посівного матеріалу

(інокулята) до завершення процесів росту мікроорганізмів, або біосинтезу ними необхідних речовин, внаслідок вичерпання поживних речовин середовища.

Відомо безліч способів промислового культивування мікроорганізмів, що розрізняються: за вмістом кисню (аеробні та анаеробні); за кількістю ферментерів (одно-, дво- і багатостадійні); за наявністю або відсутністю перемішування (динамічні і статичні); по фізичному стану живильного середовища (поверхневі і глибинні); за способом дії (періодичний, безперервний і проміжні).

При створенні біопрепаратів для сільського господарства найчастіше використовують саме мікробну біомасу та їх супутні екзометаболіти, що отримують за умов глибинного культивування.

Глибинний метод культивування полягає у вирощуванні мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі.

Переваги глибинного культивування продуцентів:

1. Дозволяє отримувати бактеріальну масу за короткий час.

2. Процес легко керований через високий ступінь автоматизації.

3. Дозволяє легко коригувати рН середовища в ході культивування за допомогою додаткового внесення поживних речовин, особливо вуглеводних і біологічних стимуляторів.

4. При даному способі вирощування максимальні результати культивування легко відтворювані.

Технологічний процес глибинного вирощування мікроорганізмів у апаратах-культиваторах (біореакторах) складається з наступних етапів:

1. Отримання посівного матеріалу. Посівний матеріал для засіву живильного середовища готують також глибинним способом. Вид посівного матеріалу залежить від виду мікроорганізму: для грибів, актиноміцетів і не спороутворюючих бактерій - це клітинна або вегетативна

біомаса, а для спороутворюючих бактерій - молода зростаюча культура на початковій стадії спороношення.

Отримання посівного матеріалу здійснюється постадійним збільшенням маси мікроорганізмів в чотири ступені: вихідна культура продуцента; маточна культура, вирощена в колбах на гойдалці; посівна культура, вирощена в інокуляторі; посівна культура, вирощена в посівному апараті.

Обсяг посівного матеріалу залежить від фізіологічних особливостей продуцента. Він складає 5-20% від загального обсягу середовища, якщо продуцент розмножується тільки вегетативно, і скорочується до 1%, якщо культура спороутворююча. Обсяг посівного апарату складає до 10% від обсягу промислового ферментера. При використанні занадто молоді культури процес отримання посівного матеріалу значно подовжується.

2. Приготування поживних середовищ. У промислових умовах поживні середовища зазвичай готують в окремому цеху, щоб забруднена мікроорганізмами сировина не потрапила в основне виробництво. Середовища готують в посудинах, забезпечених механічними мішалками, додаючи в певній послідовності розчинні (цукри, соєве борошно, кукурудзяна мука, крейда тощо) компоненти. При необхідності окремі компоненти додатково обробляють: подрібнюють, просівають, відварюють або екстрагують. Тому цех для приготування поживних середовищ повинен бути обладнаний теплообмінниками, дозаторами, подрібнювачами, екстракторами, варильними котлами, апаратами для гідролізу та іншим. Для кращого розчинення середовище нагрівають до 70-80°C.

3. Стерилізація живильних середовищ. Приготоване живильне середовище стерилізують двома способами – відділенням мікроорганізмів від середовища або знищенням їх в середовищі. Перспективніше перший спосіб, оскільки при будь-якому методі знищення мікроорганізмів відбувається

часткове руйнування поживних компонентів середовища. Перший спосіб (відділення мікроорганізмів) проводять за допомогою напівпроникних мембран у процесі мікрофільтрації. Другий метод стерилізації проводять за допомогою високих температур.

Стерилізацію живильних середовищ можна проводити періодично і безперервно. При періодичному способі процес ведуть у самому ферментері, куди заливають живильне середовище, нагрівають його до температури необхідної для стерилізації даного середовища, витримують при цій температурі потрібний час і охолоджують. При безперервному способі попередньо стерилізують апарати проточним паром, після чого подають у ферментер середовище, яке пройшло через нагрівальну колонку, де нагрілося парою до 120-140°C, витримуватель, де середовище знаходилося потрібний час при температурі стерилізації і холодильник, де воно охолло до температури культивування.

Окремо від середовища періодичним способом стерилізують піногасник і всі коригувальні розчини.

4. Очищення повітря до і після аерування. Атмосферне повітря містить частинки пилу органічної та неорганічної природи, краплі води і мікроорганізми в кількості до 10^5 часток на 1 м^3 . Стерильність його досягається фільтрацією через об'ємні волокнисті фільтри. Зазвичай необхідна подвійна очистка - на головному фільтрі, потім на індивідуальних фільтрах безпосередньо перед введенням повітря у посівні і виробничі ферментери.

Після аерування виробничої культури газовий потік, що відводиться з ферментера, несе з собою клітини продуцента. Їх відловлюють фільтрами на зворотному повітряносі.

5. Виробниче культивування. Біосинтез речовин при вирощуванні глибинним способом протікає досить швидко. Тривалість вирощування мікроорганізмів у культиваторі відбувається 18-24 год, 120-140 год для повільнорослих

культур та для спороутворюючих культивування (для отримання високої концентрації спор) коливається від 40 до 250 год (для актиноміцетів і мікроскопічних грибів) при безперервному подаванні повітря (крім анаеробів) і перемішуванні.

Високі концентрації поживних речовин на перших етапах можуть гальмувати зростання біомаси мікроорганізмів. Тому живильне середовище вводиться в ферментер поступово на стадії активного росту мікроорганізмів. Більшість продуцентів є мезофільними мікроорганізмами і оптимум їх розвитку знаходиться при температурі 22-32°C. Майже всі швидко інактивуються при підвищенні температури понад оптимальної.

Процес культивування контролюють по зміні температури, рН, витраті повітря, частоті обертання мішалки, вмісту кисню, а також шляхом періодичного відбору проб (через кожні 1-12 год). У пробах визначають рН, наявність сторонньої мікрофлори, досліджують морфологію мікробних клітин.

Глибинний спосіб вирощування мікроорганізмів може бути як періодичним, так і безперервним.

При періодичному способі культивування продуценти вирощують у поживному середовищі без її зміни, завантажуючи у біореактор весь обсяг середовищ та посівного матеріалу (інокулят) одночасно. Процес ведеться до утворення певної кількості біомаси або продукту метаболізму. Безперервне культивування, на відміну від періодичного, має явні переваги і є більш перспективним. Сутність його полягає в тому, що у ферментері (біореакторі) підтримуються постійні умови, в результаті чого мікроорганізм залишається в певному фізіологічному стані.

У лабораторних умовах найчастіше мікроорганізми вирощують методом періодичної культури використовуючи при цьому рідкі поживні середовища та струшувачі або

качалки, що забезпечують струшування колб чи пробірок зі швидкістю 100-250 обертів за хвилину. Таке струшування збільшує зіткання середовища з повітрям, за рахунок чого воно краще насичується киснем та має хороший масообмін. Для визначення рівня насиченості середовища киснем застосовують показник під назвою – сульфітне число. Для цього, в одну із колб для вирощування замість поживного середовища наливають розчин сульфіту та через певні проміжки часу міряють кількість сульфіту, що окислився за тих же умов аерації, за яких вирощуються необхідні мікроорганізми. Для усунення згустків (вони осідають на дно та можуть отримувати мало кисню), які можуть утворюватися при вирощуванні деяких мікроорганізмів (мікроміцети, актиноміцети) у колби додають скляні або пластикові кульки (діаметром від 2 до 10 мм), що здатні під час струшування розбивати скупчення міцелію. Потреба різних аеробних мікроорганізмів у вільному кисні дуже відрізняється, тому ступінь аерування необхідно підбирати для кожної культури експериментально.

14.6.1. Контролювання росту мікроорганізмів під час культивування

В процесі культивування мікроорганізмів для створення біопрепарату найважливішим показником, що контролюється є оцінювання росту мікроорганізмів. Про зростання мікроорганізмів у природних субстратах або поживних середовищах судять по зміні кількості їх клітин або біомаси в одиниці об'єму.

Одним із найпростіших таких методів є візуальний метод, але його найчастіше використовують для вирощування на твердих середовищах, при цьому фіксують появу КУО (колонійутворюючих одиниць) та підраховують їх кількість.

Іноді, також для приблизного але швидкого визначення кількості мікроорганізмів використовують стандарт мутності. Це запаяна скляна пробірка, що містить суспензію дрібних частинок скла (які мають розмір приблизний до розміру клітин бактерій) та цей стандарт порівнюють із досліджуваною суспензією бактерій. До стандарту мутності також входять таблиці порівняння та дві порожні скляні пробірки (для суспензії що досліджують), товщина стінок яких точно збігається з пробірками-еталонами. Порівняння виконують візуально прикладаючи еталон та дослід до порівняльної таблиці та підсвічуючи лампою. Якщо видимі елементи порівняльної таблиці видно крізь стандарт мутності і дослідну пробірку з однаковою чіткістю то їх мутність вважають однаковою (тобто такою яка зазначена на еталоні).

Визначення кількості клітин мікроорганізмів проводять методом прямого підрахунку під мікроскопом або опосередкованим висіванням на тверде середовище (див. вище).

Найчастіше при вирощуванні культури мікроорганізмів проводять визначення мікробної біомаси. Вимірювання біомаси застосовують для підрахунку «врожаю» мікроорганізмів, розуміючи під біомасою суху масу живого матеріалу, виражену в одиницях ваги (г/л). Масу клітин певного об'єму можна визначити різними методами, але найбільш широко використовуються метод зважування та оптичний метод.

Метод зважування. Цей метод широко застосовують для оцінки зростання мікроорганізмів у рідких поживних середовищах. Його можна використовувати й для визначення маси клітин, вирощених на щільному живильному середовищі, однак в цьому випадку мікроорганізми необхідно попередньо ретельно змити з поверхні середовища фізіологічним розчином або стерильною водою і перевести в суспензію.

Перед самим безпосередньо зважуванням необхідно відділити масу бактерій від середовища, оскільки воно також має свою масу. Для цього користуються центрифугуванням або фільтруванням.

При центрифугуванні в центрифужну пробірку наливають точно виміряний об'єм ретельно перемішаної рідкої культури, який в залежності від її щільності коливається від 5 до 20 см³. Час центрифугування й число оборотів залежать від розмірів клітин. Чим вони менші, тим більше потрібно оборотів і тим тривалішим має бути час центрифугування. Найчастіше центрифугують 20-30 хв при 3-5 тис. об./хв. Після центрифугування надосадову рідину (супернатант) обережно зливають, осад промивають злегка підкисленою дистильованою водою (1 мл концентрованої HCl на 1000 мл води) і знову центрифугують при тому ж числі оборотів. Супернатант зливають відразу після зупинки центрифуги. В іншому випадку частина осаду може бути втрачена.

Міцелій актиноміцетів і грибів відокремлюють фільтруванням. Паперовий фільтр поміщають в скляну воронку та фільтрують через нього точно виміряний об'єм культури – від 5 до 10 мл. Осад на фільтрі багаторазово промивають підкисленою дистильованою водою.

Для відділення бактерій використовують мембранні фільтри. Розміри пор мембранного фільтру повинні бути менше ніж розміри клітин, біомасу яких визначають. Мембранний фільтр поміщають на пористу пластинку спеціального тримача, вставленого в колбу. Щоб прискорити фільтрування, установку можна підключати до водоструминного насоса. Осад кілька разів промивають підкисленою водою.

Для визначення біомаси сухих клітин, центрифужну пробірку або фільтр із осадом клітин мікроорганізмів поміщають в сушильну шафу, висушують і зважують. Режим

висушування і зважування той же, що використовували і при визначенні маси пробірок або фільтрів (105°C).

Сушу біомасу визначають за формулою:

$$M=(A-B)1000/V,$$

де M – суха біомаса г/л;

A – маса фільтра (пробірки) з осадам, г;

B – маса фільтра (пробірки) без осаду, г;

V – об'єм культуральної рідини, взятий для фільтрування (центрифугування), мл.

Точність методу визначається повнотою відмивання клітин від компонентів середовища і ретельністю зважування.

Оптичний (нефелометричний, турбидиметричний) метод визначення біомаси знайшов широке застосування в лабораторних мікробіологічних дослідженнях, оскільки дозволяє швидко і достатньо точно визначити концентрацію клітин в суспензії або культуральній рідини. Даний метод ґрунтується на зміні інтенсивності проходження світла через суспензію мікроорганізмів, яка пропорційна до їхньої концентрації та залежить від форми і розміру клітини, товщини клітинної стінки, а також довжини хвилі світла й інших параметрів. Тому, даний метод, придатний лише для тих мікроорганізмів, зростання яких викликає рівномірне помутніння середовища і не супроводжується помітною зміною форми і розмірів клітин, утворенням міцелію, плівок або інших скупчень. Також цей метод не придатний до використання при вирощуванні на середовищах, які мають темне забарвлення (сусло, м'яса тощо), високу мутність (борошно) або для мікроорганізмів що утворюють яскраві пігменти.

Зміна інтенсивності світла при проходженні через суспензію клітин вимірюють за допомогою нефелометра, фотоелектроколориметра (ФЕК) або спектрофотометра,

вибираючи довжину хвилі (зазвичай в інтервалі 540-650 нм), при якій поглинання світла даної суспензією клітин мінімальне. При високих концентраціях клітин у культуральному середовищі відбувається вторинне розсіювання світла, що призводить до заниження результатів. Правила роботи на зазначених приладах детально викладені в доданих до них інструкціях. Точніший результат отримують, якщо є калібрувальна крива залежності густини суспензії клітин від значення її поглинання світла. Калібрувальну криву будують у такий спосіб. Вимірюють величину оптичної щільності суспензії із різним вмістом клітин і в кожній із них визначають одним із застосовуваних методів кількість клітин або біомасу. Отриману залежність виражають графічно, відкладаючи на осі ординат показання приладу, а на осі абсцис - кількість клітин, що містяться в 1 мл суспензії, або біомасу в г/л. Для кожного мікроорганізму слід будувати свою калібровану криву.

Біохімічні методи визначення біомаси.

Іноді вимірювання біомаси часто не приводить до бажаних точним результатами внаслідок великої кількості побічних ефектів, пов'язаних із відбором проб та їх вимірюванням (найбільш характерно для природних проб (води, ґрунту тощо). Тому для визначення біомаси в природних зразках найбільш прийнятні методи, пов'язані з визначенням біохімічних параметрів клітин. Вони припускають, що кількість вимірюваного компонента однаково для всіх видів клітин, що, звичайно ж, ідеалізовано. Тому вимірювання біохімічних параметрів біомаси необхідно екстраполювати з обережністю.

При вимірі біомаси найбільш популярним є вимір кількості АТФ і загального змісту аденінових нуклеотидів із наступним перерахунком на вміст вуглецю клітини або ваги сухої біомаси. Метод дозволяє швидко і точно (з люциферин/люциферазної пробою) виміряти вміст АТФ в

зразку. Кількість АТФ строго відповідає біомасі живих клітин, так як після їх відмирання пул АТФ в ній різко знижується або зникає зовсім. Загальний пул аденілату ($At = AТФ + AДФ + AМФ$) не залежить від метаболічного стану клітини і більш повно відповідає вмісту біомаси у пробі яка аналізується. Також іноді іншим біохімічних способом є вимірювання вмісту компонентів клітинних стінок – мурамової кислоти (МК) або ліпополісахаридів.

Для оцінки вмісту біомаси мікроміцетів використовують визначення концентрації хітину, але на точність даного методу може впливати кількість ґрунтових членистоногих і комах.

При відсутності в пробі рослин можна визначати біомасу фототрофних водоростей і бактерій, вимірюючи кількість хлорофілу. За концентрацією хлорофілу а судять про зміст біомаси водоростей та ціанобактерій після екстракції проби хлороформ-метанольною сумішшю з наступним виміром на СФ при поглинанні 665 нм. Поглинання того ж екстракту, виміряний в максимумі при 850 нм, буде відображати кількість всіх бактеріальних хлорофілів і таким чином оцінюють кількість пурпурних фототрофних бактерій. Зміст різних хлорофілів можна вимірювати і за спектрами флуоресценції.

Концентрація ДНК у клітинах мікроорганізмів є досить постійним значенням, тому визначення ДНК може бути хорошим методом для визначення біомаси. У природних зразках, де чутливість методу визначення ДНК має першорядне значення, застосовують проби з флуоресцентними фарбами, такими, як етідіум бромід або розчином Hoechst 33258 із використанням спектрофлуориметрії. Перед вимірюванням необхідна ретельна очистка тотальної ДНК, а також контролі наявності еукаріотичної ДНК.

Визначення ліпідів також служить хорошим маркером для обліку біомаси, оскільки всі клітини оточені мембранами,

що містять ліпіди. Кількість ергостеролу в пробі відображає зміст грибів, так як його практично не містять ні рослини, ні археї з бактеріями. Визначення змісту і складу метилових ефірів жирних кислот фосфоліпідів (МЕЖК) дозволяє поряд з оцінкою загальної біомаси специфічно кількісно оцінити зміст тієї чи іншої групи мікроорганізмів у зразку, взятому з природних ніш.

Також є фізіологічні підходи до визначення біомаси, що засновані на вимірі дихання проби після додавання субстрату або на вимірюванні кількості CO_2 , який виділився після розкладання мікробної біомаси після стерилізації проби при додаванні хлороформу. Обидва методи вимагають постановки численних контролів.

РОЗДІЛ 15

ЕКОЛОГІЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ

15.1. Очищення стічних вод в аеротенках

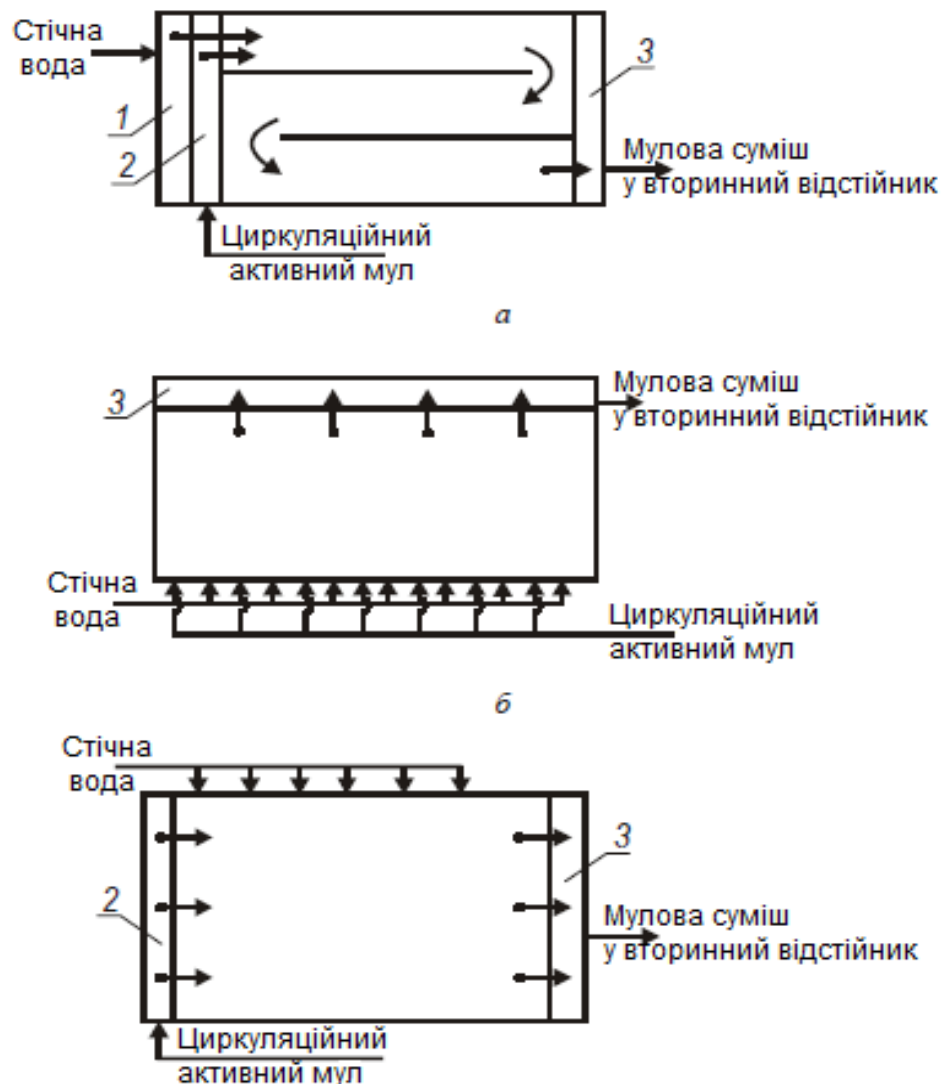
Класифікація аеротенків. Аеротенк – резервуар прямокутного перетину з глибиною 3-6 м, який виготовлено з металу, збірного або монолітного залізобетону чи ж пластмаси. Аеротенки в залежності від умов заглиблюються або ж розміщуються на поверхні землі, в наметах-утеплювачах чи на відкритому повітрі.

Повітря, яка запускається за допомогою механічних або пневматичних пристроїв, перемішує дану оброблювану рідину з активним мулом, а також насичує її киснем, що потрібний для життєдіяльності бактерій, багатоклітинних і найпростіших тварин. Застосовуються аеротенки для очищення більшості видів стічних вод у широкому діапазоні їхніх витрат, а також концентрацій забруднень.

Кількість конструктивних модифікацій аеротенків (рис. 15.1) весь час збільшується. За способом подання стічних вод, а також гідродинамічного режиму, конструкції аеротенків, які застосовуються, поділяються на три типи: витіснячі із «поршнеvim» потоком стічних вод (рис. 15.1, а), змішувачі із центральною або розосередженою подачею і випуском стічних вод (рис. 15.1, б) та аеротенки проміжного типу (рис. 15.1, в).

Аеротенки-витіснячі відділені поздовжніми направляючими перегородками, які не доходять не до однієї із торцевих стін, на коридори. Кількість коридорів від 1 до 4, а співвідношення загальної довжини коридорів до ширини >30–40. У самих торцях аеротенків знаходяться канали для впуску, а також виведення стічних вод. В залежності від геометричних розмірів аеротенків, їх гідродинамічний режим тим чи іншим чином наближається до витіснення.

Своєрідністю процесу, який відбувається в аеротенках-витіснячах, є зміна концентрації забруднюючих речовин, які містяться у стічних водах, а також швидкості очищення по всій довжині аеротенків. Процес окислення в аеротенках-витіснячах здійснюється нерівномірно: на початку аеротенку – це відбувається швидше, а із наближенням до кінця та зменшенням об'єму субстрату – набагато повільніше. Аерація теж має відбуватися нерівномірно.



а) – аеротенк-витісняч; б) – аеротенк-змішувач; в) – аеротенк проміжного типу:

1 – канал стічної води; 2 – канал циркуляційного активного мулу; 3 – канал мулової суміші

Рис. 15. 1. Аеротенки

У даних аеротенках є можливість досягати високої глибини очищення, проте у випадку залпового надходження забруднюючих речовин, які традиційно притаманні для виробничих стоків, активний мул стає перевантаженим та втрачає свою активність, а також спухає й виводиться із вторинних відстійників.

В аеротенках-змішувачах створюються відповідні умови для швидкого повного змішування стічних вод із активним мулом, а також здійснюється рівномірний розподіл розчиненого кисню та органічних забруднень. Таке швидке розведення стічних вод за допомогою очищеної води дає можливість подавати стічні води із досить високою концентрацією забруднень, які в сталому режимі працюють із рівномірними швидкостями самого процесу очищення. Недоліками ж аеротенків-змішувачів є складніша система входу та виходу рідини, а також досить низька середня питома швидкість процесу окислення, через те що концентрація забруднень у муловій суміші розміщена на рівні значень, які висуваються до очищеної води. Тому, окислювальна потужність даних споруд є нижчою, за аеротенків-витіснячів.

До аеротенків проміжного типу належать коридорні аеротенки із розосередженою подачею по всій довжині стічних вод, а також із пропусканням активного мулу у самий початок коридору. У даному випадку на вході концентрація активного мулу максимальна, а далі поступово зменшується з наближенням до виходу. Щоб дотримуватись стабільної роботи даних споруд доцільно стічні води подавати нерівномірно по всій довжині споруд для дотримання однакового співвідношення між об'ємом забруднень, а також масою беззольної речовини активного мулу.

Аеротенки також підрозділяють:

- *за видом аерації*, яку використовують – аеротенки із пневматичною (найпоширеніша) або механічною аерацією;

- за способом регенерації активного мулу - з регенераторами мулу, які стоять окремо, а також ті, які суміщені з регенераторами.

В аеротенках процес окислення органічних забруднюючих речовин здійснюється за допомогою життєдіяльності аеробних мікроорганізмів, які формують пухкі скупчення – активний мул. Одна частина органічних речовин, постійно поступає зі стічними водами та окислюється, а інша – витрачається на певний конструктивний обмін, іншими словами забезпечує приріст бактеріальної маси самого активного мулу.

В залежності від того, який потрібен ступінь зменшення вмісту органічних забруднюючих речовин, самі аеротенки проектується так, щоб відбувалося повне біологічне очищення (значення БПК_{повн} очищених вод до 15 мг/дм³) та часткове (БПК_{повн} > 15 мг/дм³).

15.1.2. Характеристика активного мулу

Склад і структура мулу. Активний мул за зовнішнім виглядом нагадує дрібні пластівці (флокули, зооглеї) від ледь помітних до 2-3 мм та більше. Зооглеї розрізняють за формою: бувають гроневидної, кулястої, деревовидної форми або ж є вузькими щільними тяжами. Характер і розвиток зооглеїв напряду залежить від складу стічних вод, а також параметрів очищення. Колір їх пластівців від буро-жовтого до темно-коричневого. Мабуть, через наявність в активному мулі актиноміцетів, він має землистий запах. Внаслідок аерації пластівці активного мулу удержуються у підвішеному стані. Пластівці містять велику кількість багат шарово розміщених бактеріальних клітин, розкладених у слизі. Слиз – позаклітинні полімери, які представлені протеїнами, полісахаридами та нуклеїновими кислотами. Завдяки тому, що групи цих сполук мають здатність до реакцій

(карбоксильних, гідроксильних, сульфгідрильних та ін.) здійснюється хімічна і фізико-хімічна взаємодія пластівців мулу із нерозчиненими та розчиненими забрудненнями, а також швидке вилучення цих забруднень із стічної води. Процес біохімічного окислення вилучених забруднень проходить значно повільніше. Сумарна поверхня пластівців активного мулу може досягати 100 м^2 на 1 г сухої речовини, що вказує на дуже високу його сорбційну здатність.

Суха речовина активного мулу складається на 70-90% із органічних речовин, а також на 10-30% – із мінеральних. Більша частина маси органічних речовин містить білки, вміст яких досягає 70%. Сама кількість білкових речовин, насамперед, залежить від віку мулу, а також виду культур мікроорганізмів, які формують активний мул (визначається складом забруднень стічних вод). Органічна частина, крім білків, містить також вуглеводи, ліпіди й амінокислоти.

Біоценоз активного мулу аеротенків. Всі організми, які є в аеротенці, потрапляють до неї із зовнішнього середовища: зі стічною водою, в якій кількість їх досягає 10^6 клітин на 1 мл, також із повітря, ґрунту, заносяться комахами тощо. В умовах аеротенка здійснюється селекція мікроорганізмів, іншими словами переважаючий розвиток одних видів, які мають здатність знаходити сприятливі умови для себе, і придушення всіх інших. Факторами, які визначають сам напрямок селекції, можуть бути аерація, температура, склад забруднень, швидкість росту, флокуляційні та седиментаційні характеристики тощо. Окрім цього, ще відбувається адаптація ряду організмів до відповідних умов у аеротенках.

Отже, в аеротенках утворюється екосистема, яка містить складний комплекс мікроорганізмів різних класів, черв'яків, найпростіших, членистоногих. Сама чисельність мікроорганізмів складає 10^{10} – 10^{11} клітин на 1 мл.

Вивчення якісного й кількісного (видового й родового) складу активного мулу є досить важким із певних *причин*:

1) жодне із середовищ не забезпечує зростання всіх організмів активного мулу. Найбільша кількість мікроорганізмів перебуває на агаризованому середовищі з екстрактом активного мулу;

2) зберігання клітин у складі бавовни. Суттєвою для кількісного обліку мікроорганізмів є гомогенізація активного мулу перед самим посівом. Застосування ультразвуку для руйнації пластівців дає змогу збільшити кількість клітин у 20, а той більше разів;

3) протягом тривалого розвитку у складі активного мулу видозмінюються фенотипічні ознаки мікроорганізмів, тобто з'являються мутантні форми. Внаслідок цього ідентифікація мікроорганізмів стає ще складнішою.

Поруч з цим, необхідне знання основних груп мікроорганізмів, які беруть участь у розпаданні забруднень стічних вод, для управління самим процесом очищення. Зміна певних умов у очисній споруді, зазвичай, призводить до збільшення кількості бажаних форм, а також зменшення вмісту небажаних.

Мікроорганізмами біоценозу активного мулу аеротенка, які домінують, є *гетеротрофні флокуло утворюючі бактерії*. Адже бактерії легше адаптуються до застосування нових джерел живлення, а також більш здатні пристосовуватися до несприятливих умов, аніж інші організми. При потраплянні токсичних речовин бактерії, зазвичай, залишаються єдиними жителями очисних споруд.

Бактерії – перша харчова ланка на очисних спорудах. Внаслідок споживання розчинених речовин і синтезування на їх базі речовини власної біомаси, бактерії роблять доступними їх для тих організмів, які не мають здатності засвоювати розчинені речовини.

Більша частина маси бактерій у пластівцях (84,0-98,5% від загальної кількості) має паличкоподібну форму (рис. 15.2). Коки, зазвичай, це клітини з діаметром менше 0,6 мкм, деякі

бувають дуже великі (діаметром до 1,5 мкм) (рис. 15.3), досить часто зустрічаються спірили, проте у невеликих кількостях.

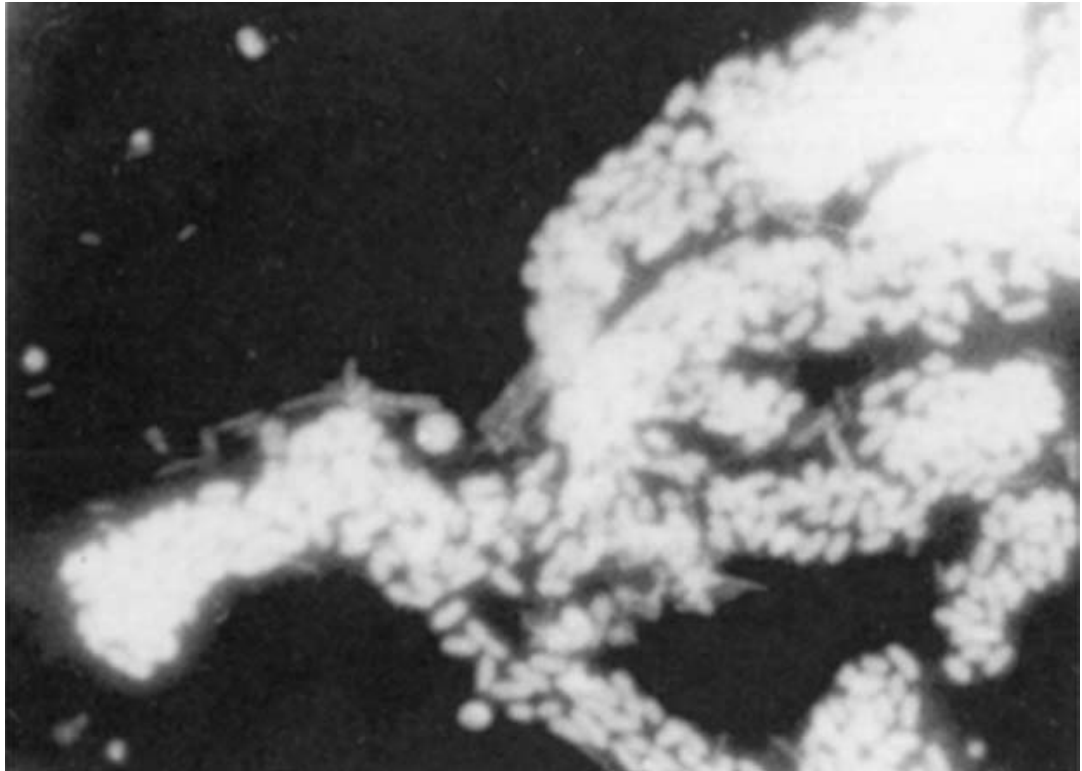


Рис. 15.2. Паличкоподібні бактерії активного мулу в компактних флокулах

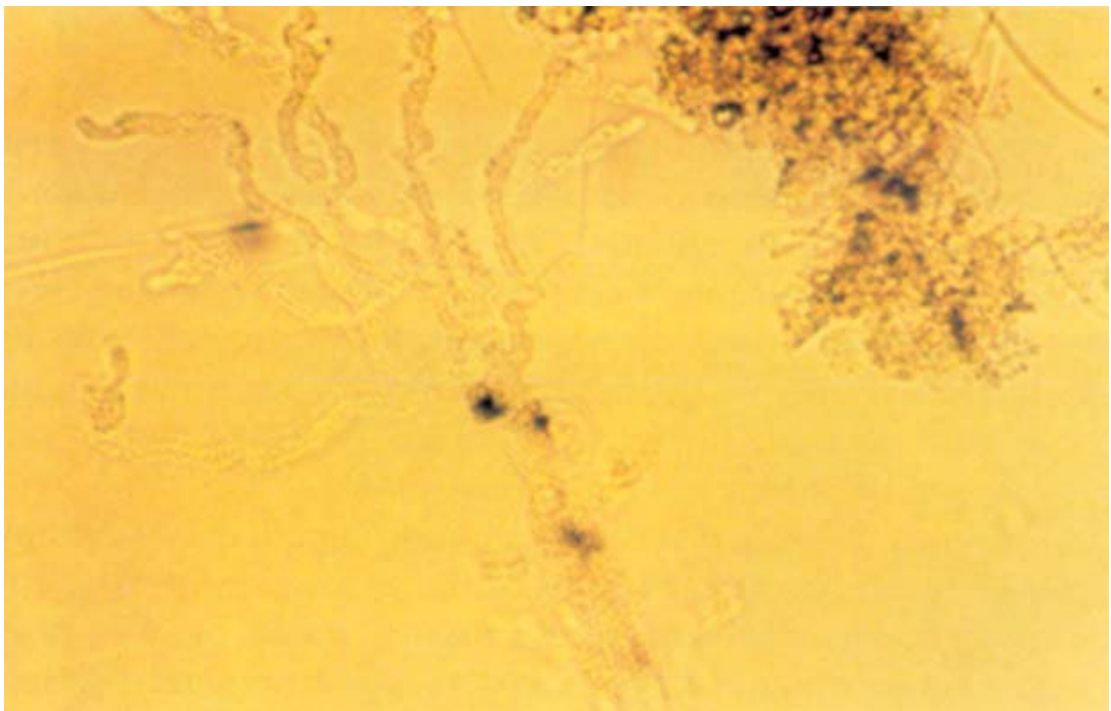


Рис. 15.3. Сферична форма бактерій у пластівцях активного мулу

Вже у дослідженнях 1935-1939 рр. описувалися, що домінуючими в активному мулі є капсульні бактерії *Zoogloea ramigera* (рис. 15.4). Це неспороутворюючі грамнегативні паличкоподібні монотрихи, які утворюють капсули. Штами *Zoogloea ramigera* можуть проростати у великих проміжках температур від 9 до 37°C, при цьому оптимальною температурою є 28°C, а значення pH 7,0. *Zoogloea ramigera* є аеробами, але як показує практика, вони мають здатність досить довго переносити анаеробні умови.

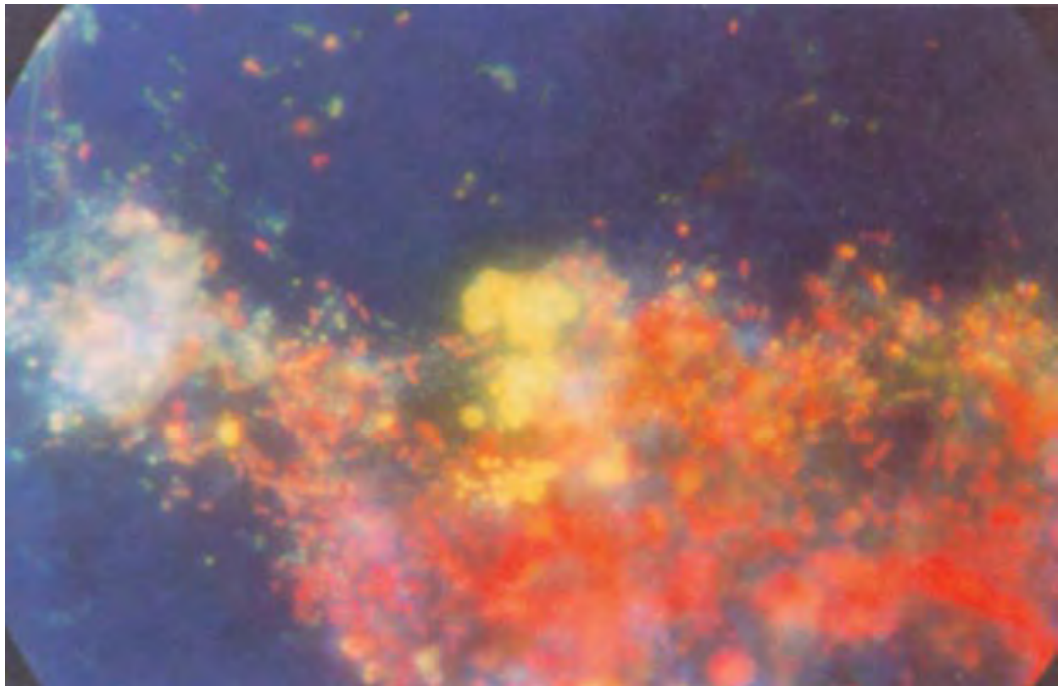


Рис. 15.4. *Zoogloea ramigera*

Вагомою для очищення води, а також подальшого виділення активного мулу, є здатність даних бактерій до формування пластівців (зооглеїв). На поживних середовищах з фруктозою, глюкозою, лактозою, галактозою, сахарозою та розчинним крохмалем такі бактерії утворюють таку кількість позаклітинного полімеру, при якій культуральна рідина трансформується у гель. Сама структура такого полісахариду цілковито ще не встановлена, адже в його складі виявлені аж два аміноцукри: N-ацетилглюкозамін та N-ацетилфукозамін у співвідношенні 1:2. Важливого значення в очищенні має капсульна речовина, оскільки викликає сорбцію органічних й

неорганічних сполук, та клітин, які не мають здатності до формування пластівців, проте беруть участь безпосередньо у розкладанні забруднень. Клітини *Zoogloea ramigera* можуть у великій кількості накопичувати гранули волютина, які складаються із довголанцюгових поліфосфатів. Така здатність бактерій є суттєвою в очищенні води, яка забруднена речовинами, що містять фосфор.

Крім *Zoogloea ramigera*, в активному мулі виявлено представників родів *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium* тощо. Переважна кількість бактерій, які беруть участь в очищенні, є гетеротрофами, які, зазвичай, є представниками водної біоти, а також незначна їх частка належить жителям кишкового тракту людини й тварин. Водночас, патогенні мікроорганізми при цьому не знаходять сприятливих для себе умов, не витримують конкуренції, внаслідок чого гинуть.

Ізолюють **нитчасті форми бактерій** із активного мулу, кількісний розвиток яких пов'язують із спуханням активного мулу. На Рис. 15.5, 15.6 зображені пластівці активного мулу, які пофарбовані за допомогою флуоресціюючих барвників.

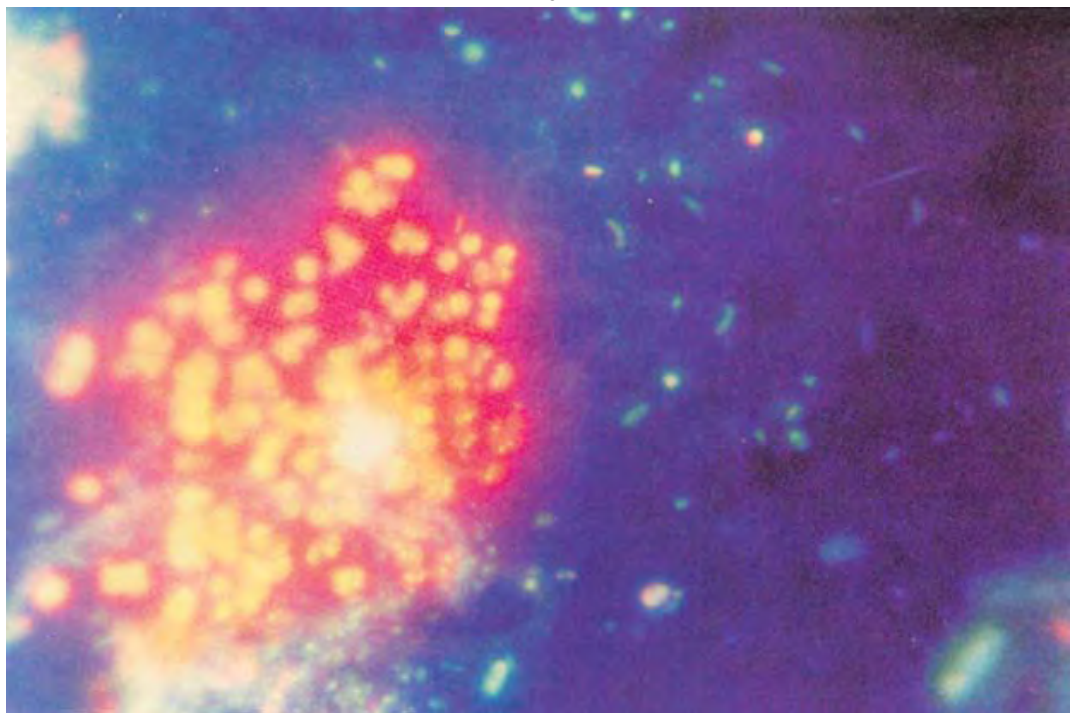


Рис. 15.5. Компактні пластівці активного мулу



Рис. 15.6. Дефлокуляція пластівців мулу при нитчастому розбуханні

У задовільних умовах функціонування переважаюча кількість бактерій перебуває у флокулірованому стані (рис. 15.4). Пластівці розпухлого активного мулу (рис. 15.5) втрачають компактність, через що в ньому відбувається підвищення морфологічного розмаїття бактерій, а також збільшується кількість вільноживучих (не пов'язаних із пластівцями) форм.

Серед причин спухання активного мулу є вплив токсикантів. За їх наявності порушується система утворення клітинами флокулоутворюючих бактерій біополімерного гелю, здійснюється розпорошення пластівців. У таких умовах виживають **хламідобактерії** – скупчення клітин у формі довгих ниток (трихомів), огорнене трубчастим чохлом, який складається із полісахариду, що захищає клітини від дії токсикантів. Клітини трихомів перебувають у тісному контакті один з одним й досить рідко є самостійними організмами. Нитчасті бактерії мають вигляд тонких ниток (діаметр 1-60 мкм), тому гарно насичуються розчиненим киснем, що й дозволяє їм виживати при його дефіциті.

До хламідобактерій відносяться *Sphaerotilus*, які найчастіше зустрічаються в активному мулі. Нитки *Sphaerotilus* (рис. 15.7) огорнуті слизовим чохлам і мають хибне розгалуження.

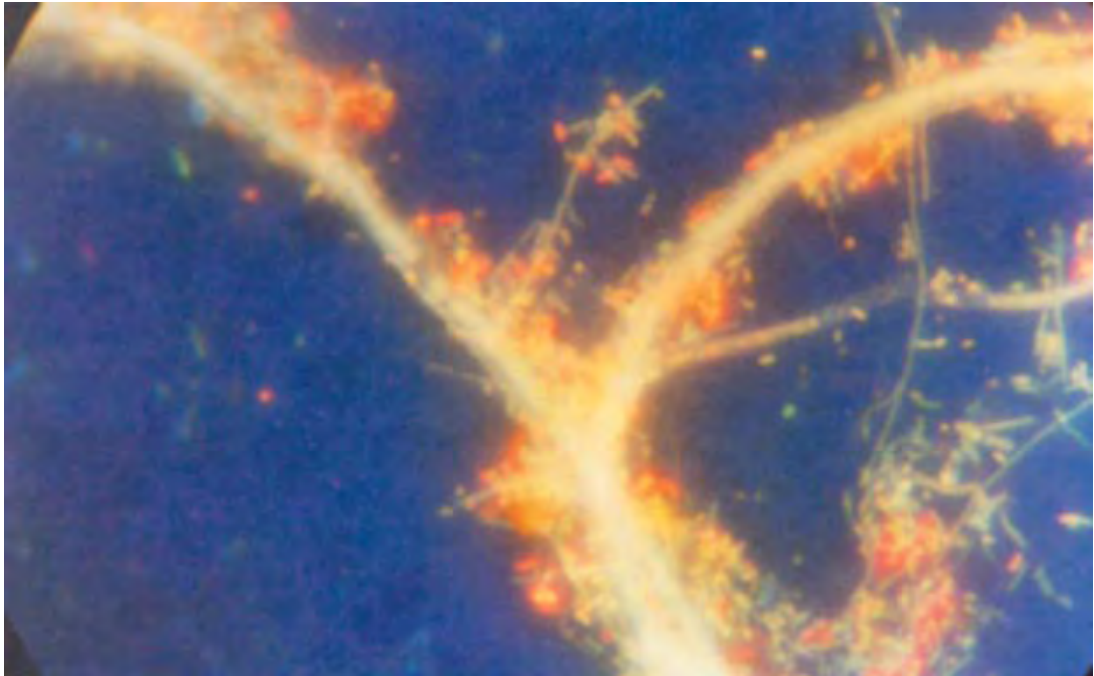


Рис. 15.7. Нитчасті бактерії роду *Sphaerotilus*

Також здатність утворювати довгі нитки мають безбарвні сірчані бактерії (роди *Thiothrix*, *Beggiatoa*, *Leucothrix* тощо) (рис. 15.8). Їх відносять до групи ковзаючих бактерій. Під час руху можна спостерігати характерний вигин клітини у вигляді дуги та рух вперед зігнутою частиною. Кількісний розвиток сіркобактерій прослідковується в активному мулі аеротенків, які працюють із досить великими навантаженнями по забрудненнях, під час нестачі кисню у муловій суміші, за наявності токсичних речовин у стічних водах (цинк, мідь і т.п.), під час очищення стічних вод, які включають відновлені сполуки сірки.

Сіркобактерії, за високого вмісту в стічних водах відновлених з'єднань сірки, мають здатність накопичувати в клітинах гранули сірки, а це є показником досить неглибокого очищення (рис. 15.9).

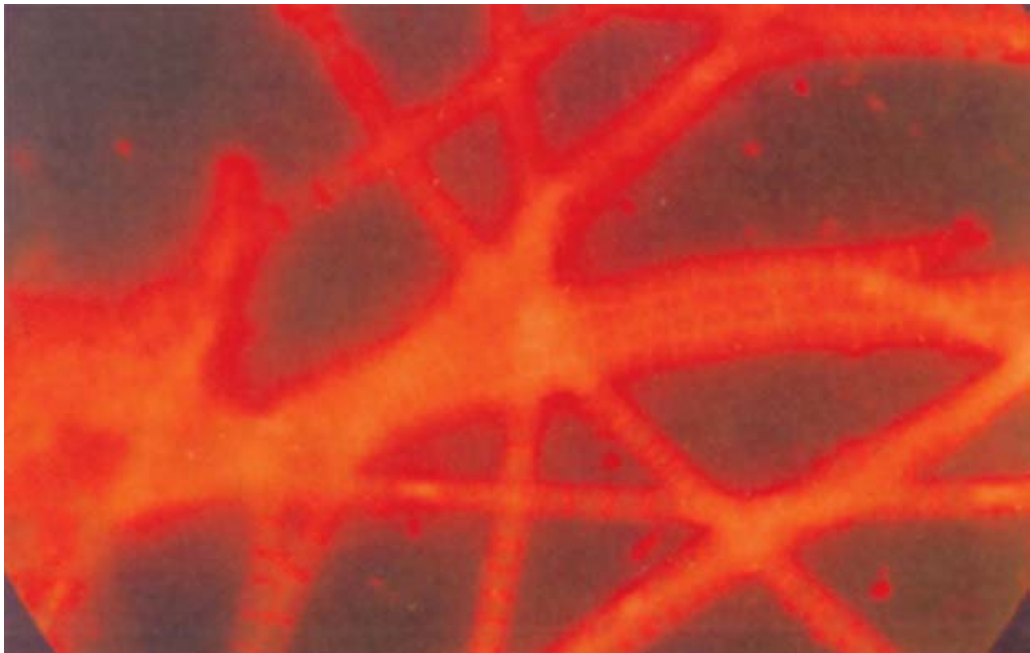


Рис. 15.8. Тріхомна будова безбарвних сіркобактерій

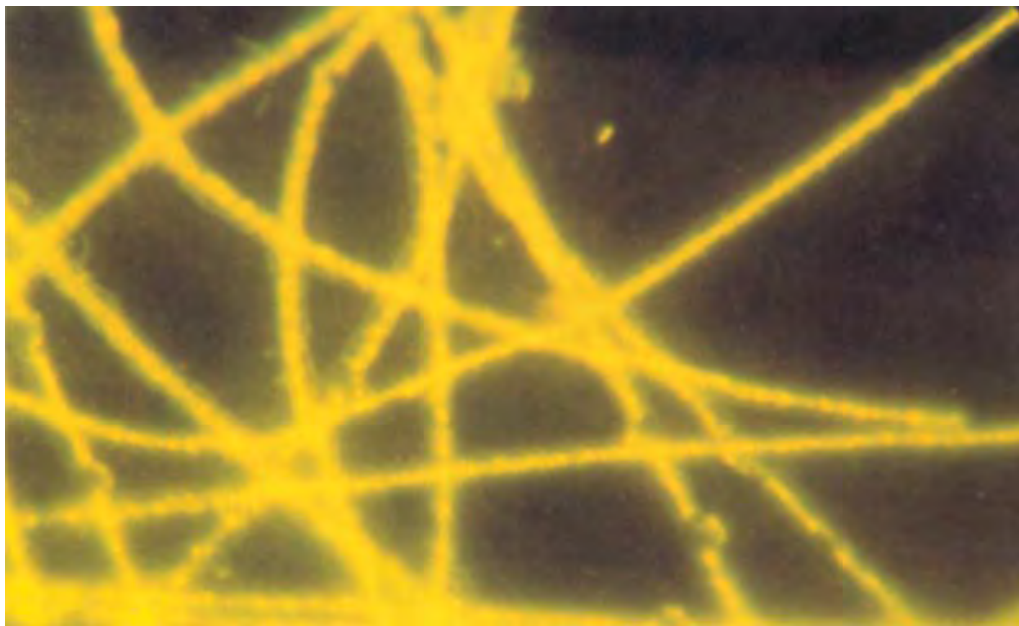


Рис. 15.9. Гранули сірки в клітинах безбарвних сіркобактерій

Також в активному мулі наявні **фототрофні прокаріоти** – ціанобактерії (*Cyanobacterium*), які мають здатність переходити до гетеротрофного харчування. Внаслідок цього відбувається втрата ними пігментів, а клітини ціанобактерій перетворюються на безбарвні. Клітини ціанобактерій у вторинних відстійниках можуть мати зелене

забарвлення, а в гарно освітлених місцях – типове синьо-зелене.

В активному мулі найчастіше зустрічаються такі ціанобактерії як *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Nostoc*. Через високу стійкість ціанобактерій до впливу на них несприятливих факторів (лужність середовища, температура) та токсикантів, вони здатні досягати значної кількості в активному мулі аеротенків, а також викликати спухання. Ціанобактерії, зазвичай, є причиною «цвітіння» водойм.

В процесі мікроскопіювання досить важко розрізнити ціанобактерії й нитчасті хламідобактерії, через те, що в них багато однакових морфологічних ознак: здатність до ковзаючого руху, нитчаста будова тіла, відсутність справжніх ядер, вакуоль та мітохондрій тощо.

Хламідобактерії та ціанобактерії є важливими індикаторними організмами активного мулу, тому що їх пришвидшений розвиток спричиняє його спухання. У такому випадку порушуються седиментаційні властивості мулу, які передбачають різке погіршення якості вже очищених стічних вод через надмірне винесення з вторинних відстійників мулу, де він незадовільно відокремлюється від очищених вод.

Інформація щодо виявлення **грибів** в активному мулі поступає не часто. Розвиткові грибів, насамперед, сприяє кисле середовище. Відомі представники дріжджеподібних грибів *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*. Із міцеліальних грибів здебільшого трапляються *Geotrichum*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, які беруть участь у розкладанні забруднень. Вміст *Mucor*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium* традиційно маленький, і взагалі вважають, що вони потрапили випадково.

Розвиток великої кількості грибів в аеротенках є небажаним, адже у такому випадку погіршуються седиментаційні характеристики активного мулу. Поруч з цим

гриби мають здатність засвоювати токсичні та важкоокислюючі речовини, тому інколи їх розвиток є позитивним.

Головні форми грибів активного мулу – сапрофітні та хижі.

Сапрофітні гриби – найтиповіші жителі аеротенків, які є стійкими до зміни рН у кислий бік, і в даних умовах здатні породжувати спухання активного мулу. Відрізняються від хижих грибів вони товщим септірованим міцелієм (рис. 15.10).

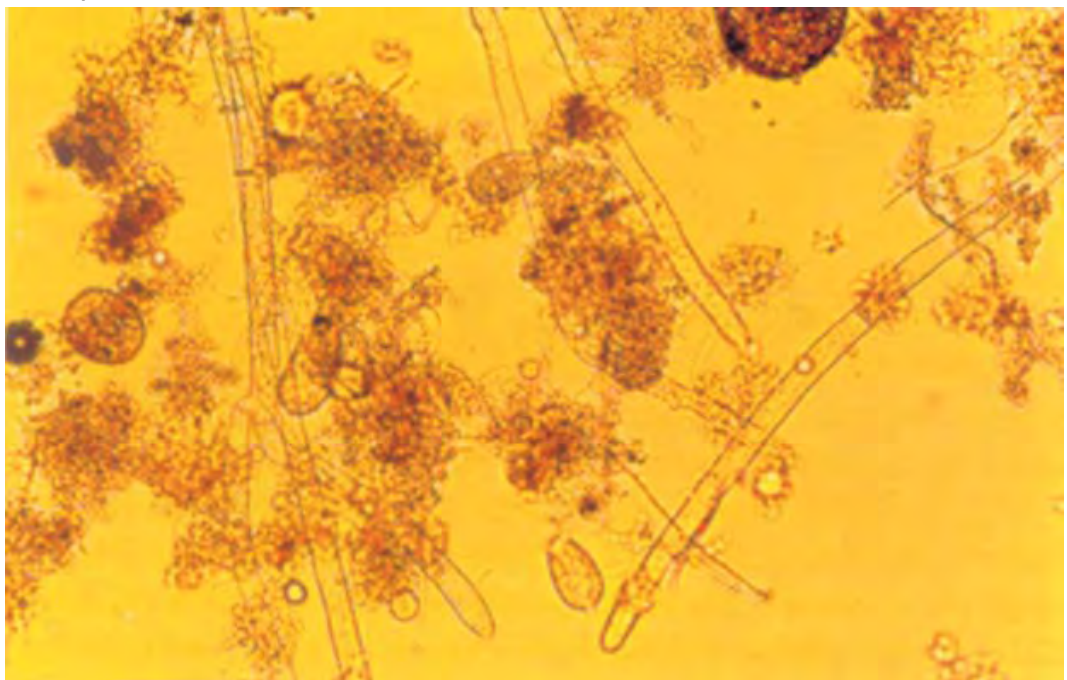


Рис. 15.10. Сапрофітні гриби активного мулу

На вегетативному міцелії *хижі гриби* товщиною не більше 5-8 мкм містять ловчі пристосування (рис. 15.11) для уловлювання і застосування в їжу коловороток, нематод, найпростіших, і зазвичай їх перевершують за розмірами. Розвиваються хижі гриби в біоценозі мулу при якісному очищенні з нітрифікацією, при малих навантаженнях на активний мул.

Призначення в активному мулі **актиноміцетів** ще остаточно не встановлене, проте в процесі очищення деяких стічних вод, їх виявлено у великій кількості, зокрема

представників роду *Gordonia*. Під час утилізації вуглеводнів, а також інших гідрофобних речовин, актиноміцети виділяють поверхнево-активні речовини та сприяють утворенню густої піни у вторинних відстійниках та в аеротенках.

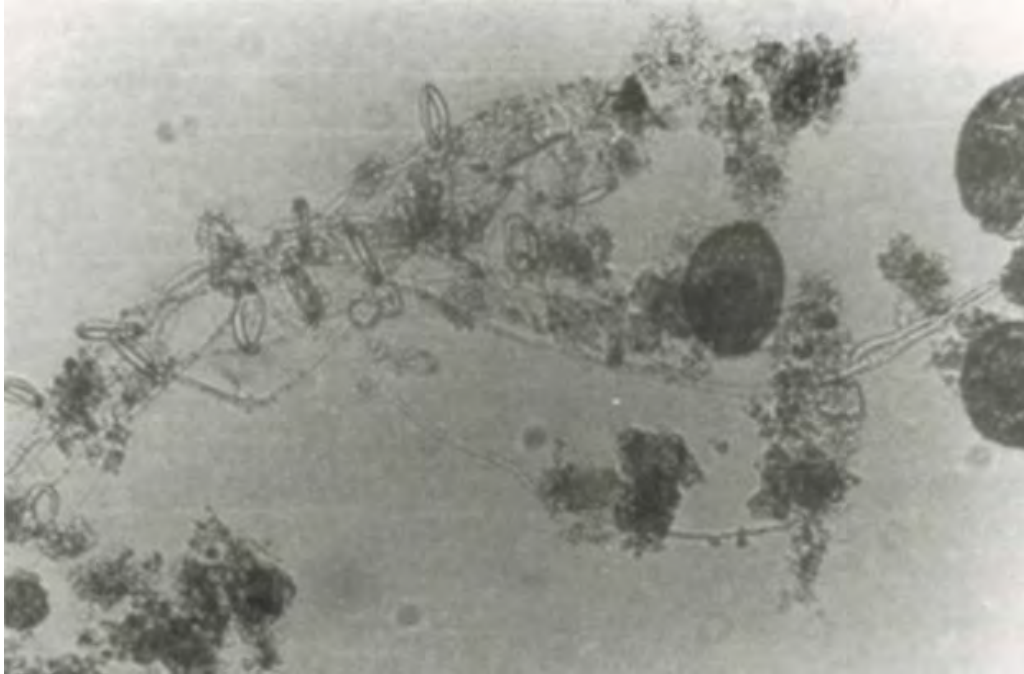


Рис. 15.11. Хижі гриби з ловчими петлями

Біоценоз активного мулу аеротенків практично повністю гетеротрофний. Але такі умови проживання у вторинних відстійниках як відсутність перемішування, а також присутність світла, сприяють розвитку автотрофних **водоростей**, де беруть участь у процесі очищення стічних вод, є постійно в наявності і досягають кількісного розвитку в обростаннях стінок відстійників. Через те, що частина активного мулу постійно переходить від вторинних відстійників до аеротенка, разом з потоком циркулюючого мулу переходять до нього і водорості. Проте в аеротенку водорості не знаходять відповідних умов для існування, а тому і не беруть участі в очищенні стічних вод. Хоч в активному мулі аеротенку водорості зустрічаються весь час, їх чисельність досить низька, а в зимовий період зменшується до поодиноких чи взагалі до повної відсутності.

Також в активному мулі, окрім бактерій, грибів, водоростей і актиноміцетів, зустрічаються типи організмів: жгутикові (*Flagellata*), саркодові (*Sarcodina*), смоктущі інфузорії (*Suctoria*), війчасті інфузорії (*Ciliata*), коловертки (*Rotifera*), первиннополостні (*Nematoda*), вториннопоросні черви (*Oligochaeta*), тихоходки (*Tardigrada*), водні кліщі класу павукоподібних (*Arachnida*), черевовійчасті черви (*Gastrotricha*).

Представниками **саркодових** є голі амеби (рис. 15.12), які мають м'яку мінливу форму тіла, а також здатність утворювати псевдоподії, які застосовуються в якості органів руху, і з метою захоплення їжі; ракові амеби, які несуть раковину з різних мінеральних включень та з органічної речовини (рис. 15.13, 15.14).



Рис. 15.12. Зміна форми тіла голих амеб при русі за допомогою псевдоподій

Вид голих амеб розпізнати досить складно. Це під силу лише досвідченим фахівцям тільки за цистоутворенням або ж на етапі мітозу ядра. На практиці значну роль відіграє розмір амеб. Дрібні амеби є показниками порушення очищення, неефективної аерації, великого навантаження по забрудненнях, диспергування пластівців, а також високого

вмісту бактерій, які не пов'язані з пластівцями, у муловій суміші. Великі амеби є звичайними мешканцями оптимально функціонуючого мулу. З метою оцінки стану активного мулу достатньо визначити співвідношення дрібних і великих амеб, не ідентифікуючи при цьому їх до виду.

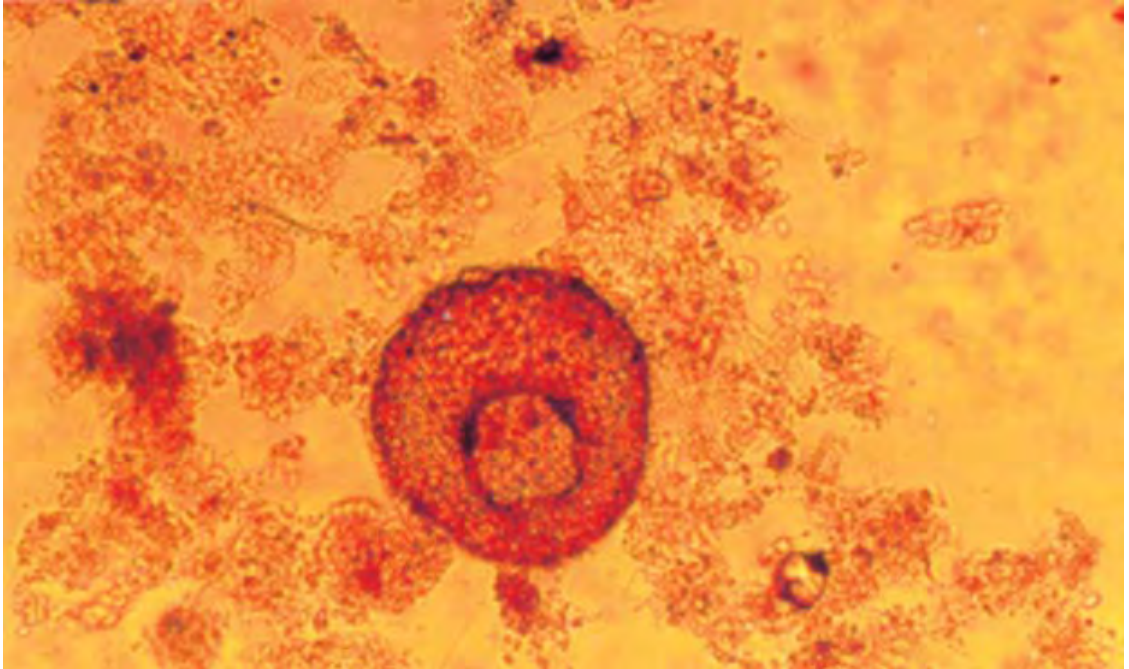


Рис. 15.13. Раковина амеба роду *Centropyxis*

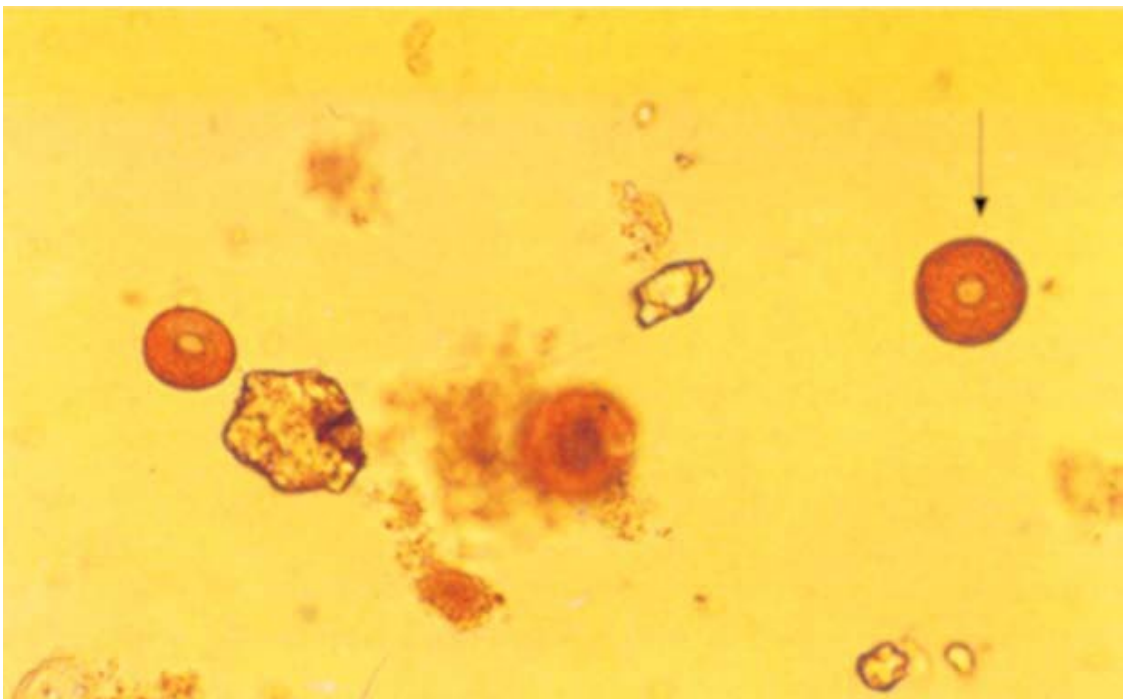


Рис. 15.14. Раковинная амеба *Arcella vulgaris*

Раковини амеби досить легко ідентифікувати в активному мулі через наявність в них щільної раковини з отвором, з якого в деяких випадках виходять псевдоподії.

Раковини амеби в активному мулі підрозділяють на дві екологічні групи: планктонні і приурочені до пластівців активного мулу. Планктонні корененіжки в процесі відстоювання мулової суміші досить повільніше осідають порівняно із основною муловою масою. Тривалий час вони залишаються в підвішеному стані завдяки великій питомій поверхні. Вони харчуються диспергованими бактеріями, дрібними найпростішими, через це розвиваються як при порушенні процесу очищення, так і при дефлокуляції пластівців активного мулу. Примноження чисельності бентосних корененіжок (пов'язані з пластівцями активного мулу) здійснюється під час зростання у воді вмісту розчиненої легкозасвоюваної органіки. У такому випадку покращується дифузне живлення раковини амеб, а також створюються сприятливі умови для їхнього активного розмноження.

Майже постійно містяться в активному мулі представники пологів *Centropyxis*, *Arcella*, *Pamphagus*, *Diffugia*, *Euglypha* тощо. *Centropyxis* (до 200 мкм) має круглу раковину із шипами (рис. 15.15), гирло ексцентрично розташоване (зміщене від центру). *Arcella vulgaris* (діаметр від 30 до 100 мкм) має круглу темну раковину з гирлом у середині раковинки (рис. 15.16). У *Pamphagus hyalinum* раковина прозора, тонка, філоподії тонкі (рис. 15.17), а у амеб роду *Euglypha* крізь тонку раковину можна помітити зернистий шар ендоплазми (рис. 15.18).

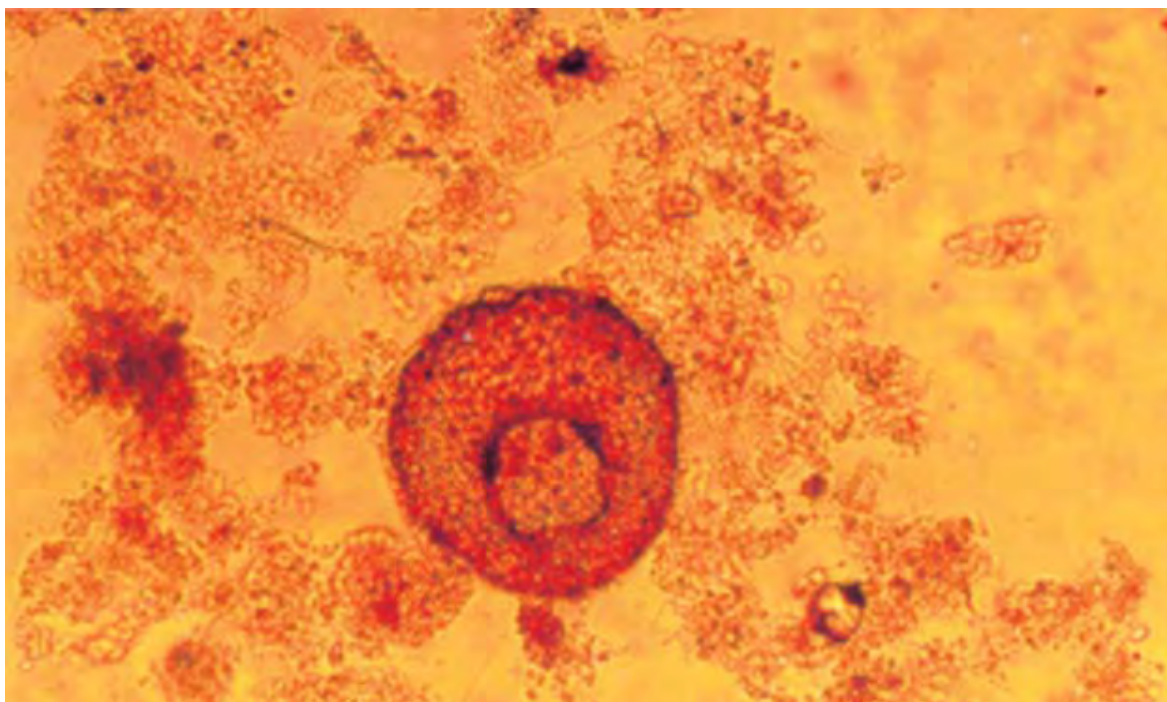


Рис. 15.15. Раковина амеба роду *Centropyxis*

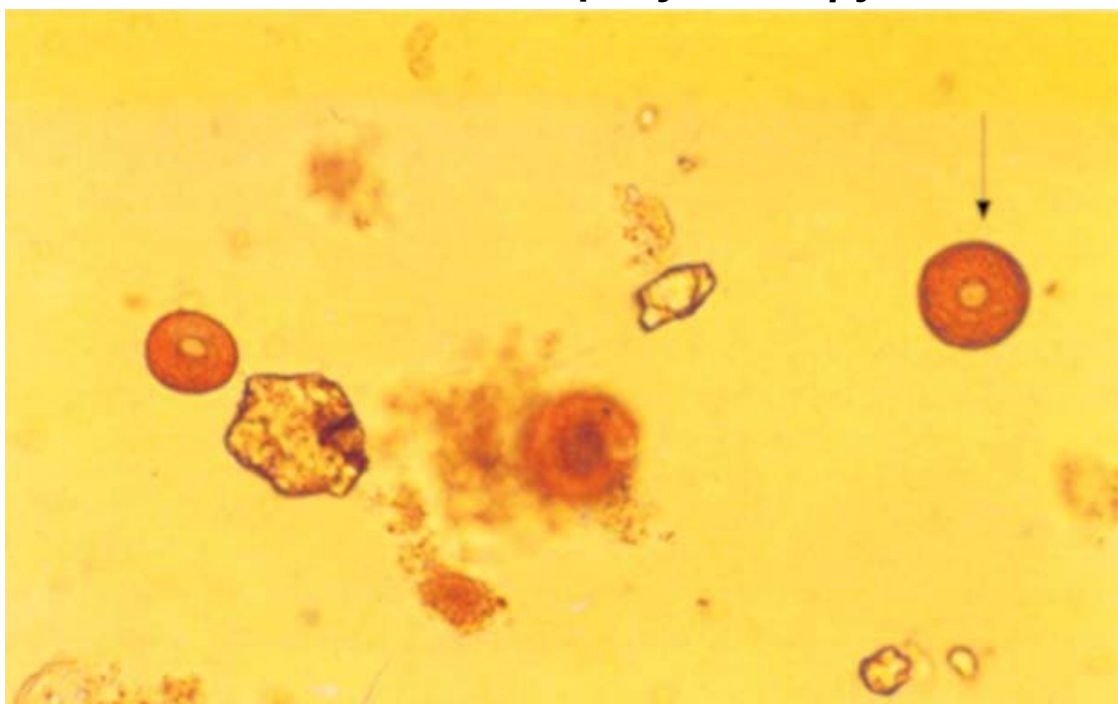


Рис. 15.16. Раковина амеба *Arcella vulgaris*

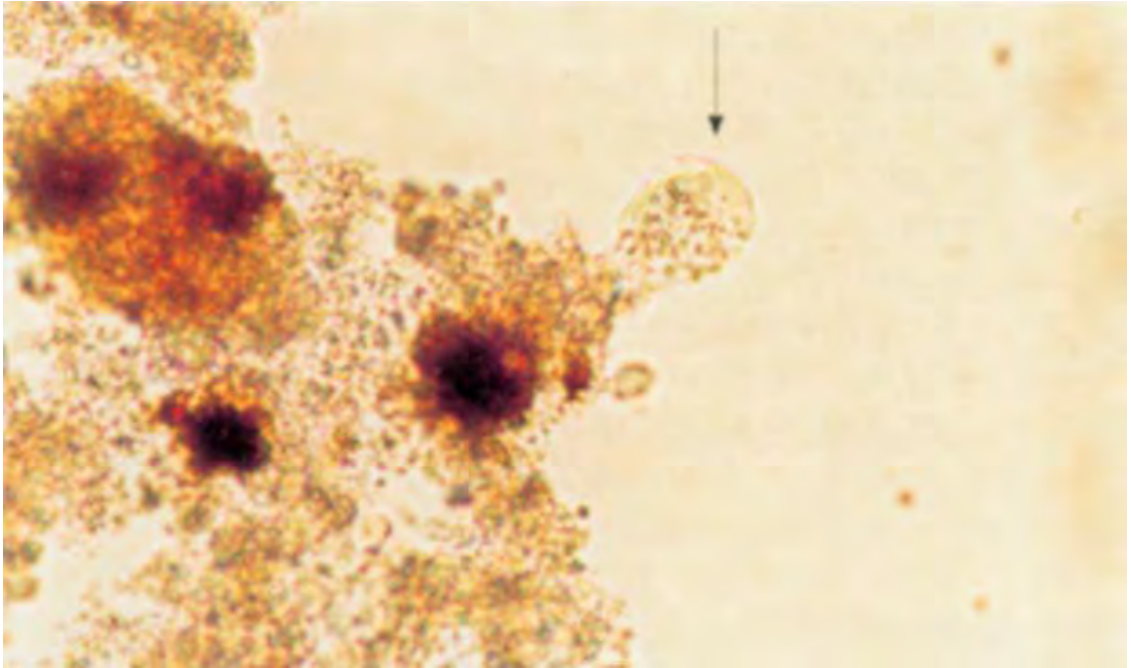


Рис. 15.17. Раковина амеба *Paraphagus hyalinum*

Залежно від складу стічних вод може бути різний і колір раковинок на різних очисних спорудах, тобто «будівельний матеріал», який застосовується амебами для створення власних раковин.

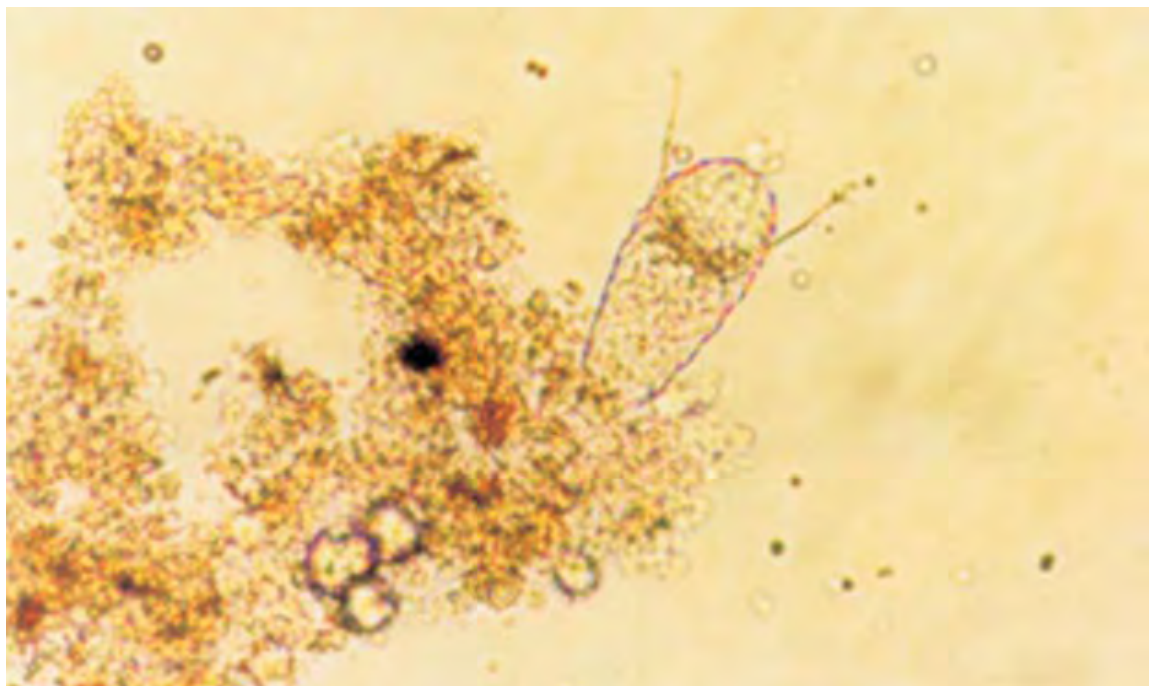


Рис. 15.18. Раковина амеба роду *Euglypha*

Клас **сонечників** найчастіше в активному мулі представлений родом *Actinophrys*. Ці корененіжки мають кулясту форму невеликого розміру, і не мають раковинки. Вони містять численні аскоподії, які розходяться від центру, ніби промені сонця. Сонечники – це хижаки, які харчуються коловертками, джгутиковими та інфузоріями. Можуть масово розвиватися під час несприятливого впливу на пластівці активного мулу будь-яких чинників, а це призводить до їх руйнування, а також надмірного розвитку дрібних джгутиконосців – популярної їжі сонечників.

Безбарвні джгутиконосці складаються з тонкої плазматичної оболонки, мають постійну форму тіла з одним чи більше джгутиками. Це безупинно мигаючі організми, які важко визначити. Їх розмір традиційно становить від 10 до 20 мкм, але не перевищує 50 мкм, існують і поодинокі, і колоніальні форми. Основна їжа джгутиконосців – бактерії, розчинені органічні речовини, дрібні органічні частинки мулу,. Розвиваються вони в пусковий період, при високих навантаженнях, в умовах низького вмісту кисню, під час аварійних скидів, а також перевантажень. За ефективністю, а також швидкістю осмотрофного споживання субстрату джгутиконосці значно поступаються бактеріям (через меншу питому поверхню тіла), але в періоди пошкодження бактеріальних популяцій вони можуть швидко розмножуватися. Ця група у стабільному мулі розвивається набагато слабкіше.

Індикаторне значення **війкових інфузорій** (або *циліат*) (підтип *Ciliata*) визначають за їх способом живлення, а також асоціацією з пластівцями активного мулу. А ступінь асоціювання інфузорій з пластівцями напряду залежить від їх зрілості.

З дрібними диспергованими пластівцями в активному мулі домінують великі вільноплаваючі інфузорії, які, в свою чергу, поїдають вільноживучих бактерій. Під час руйнування

пластівців мулу вільноплаваючі інфузорії найкращі в процвітанні, через їхню стійкість до надмірної каламутності середовища проживання, до нестачі кисню і високого навантаження за органічними речовинами на мул, а великі кількості їжі сприяють для їхнього розвитку та розмноження.

Під час формування пластівців масове домінування належить хижим вільноплаваючим і черевновійчастим інфузоріям, які переміщаються на поверхні пластівців та поїдають бактерії. Наявність в активному мулі черевновійчасті інфузорій при його первинному нарощуванні (в процесі запуску в роботу новозбудованих аеротенків) вказує на те, що пластівці утворилися і можуть застосовуватися у вигляді опор для пересування. Перитрихи прилаштовуються безпосередньо до пластівців власними стеблинками, а сама їх поява пов'язана із закінченням процесу розвитку й утворення пластівців. Призначенням прикріплених інфузорій є зменшення каламутності води, при цьому закінчивши процес очищення, а також з'ївши бактерії, які втратили контакт із пластівцями.

Циліати в активному мулі мають схильність до достатньо кількісних популяційних, родових і видових змін під дією різних умов під час біологічного очищення. Через це їм приділяється особлива увага при оцінці стану очищення.

Більшість індивідуальних видів перитрих – індикатори непохитно різних станів самого процесу очищення. Наявність значної кількості *Vorticella nebulifera* і *Vorticella campanula* звертає увагу на недовантаження мулу, а *Vorticella microstoma*, навпаки, окреслює протилежні умови.

Під час класифікації технологічного процесу очищення суттєвого значення набуває фізіологічний стан війкових інфузорій. Адже інфузорії, як і більша кількість найпростіших, здатні при появі несприятливих умов утворювати навколо власного тіла певну оболонку (інцистуватися), і таким чином деякий час уникати несприятливої дії навколишнього

середовища, або, як мінімум, його зменшувати. Форма і будова цистів найпростіших можуть бути різноманітними, переважно вони кулясті (рис. 15.19). У ході інцистування всі життєві процеси сповільнюються у клітці, а організм переходить до стану анабіозу. Більшість інфузорій мають здатність витримувати повне висихання, і при цьому зберігати життєздатність декілька років.

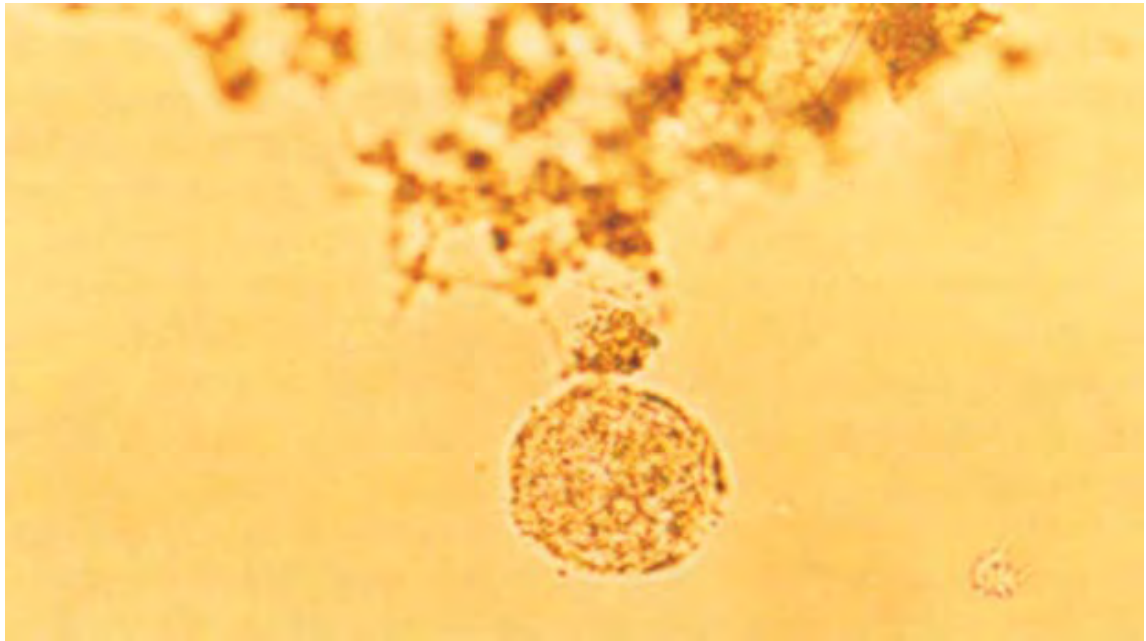


Рис. 15.19. Циста інфузорії кулястої форми із щільною оболонкою

Внаслідок коливання навантаження на активний мул по забруднюючих органічних речовинах відбуваються морфологічні й фізіологічні зміни у прикріплених інфузорій. По мірі зростання навантаження форма тіла інфузорій від витягнутої змінюється на діжковидну і потім до округлої, збільшується чисельність травних вакуолей (рис. 15.20). Під дією токсичних стічних вод від стеблинок відриваються зооїди, подрібнюються, а війковий диск закривається (рис. 15.21).



Рис. 15.20. Морфологічні зміни у перитрих зі збільшенням навантаження на активний мул

Черевновійчасті називають інфузорії з розташуванням певної кількості вій на черевному боці тіла, що слугують їм за ніжки, за допомогою яких вони швидко пересуваються на пластівцях активного мулу (рис. 15.22). Найпоширенішою в активному мулі з оптимально працюючими аеротенками є *Aspidisca costata*, яка має 6 ребер на спині. Через широкий діапазон толерантності до різних факторів середовища, її досить часто спостерігають у мулі всіляких умов очищення. *Aspidisca turrita* (з 3 ребрами) і *Aspidisca lynceus* (взагалі без ребер) – черевновійчасті інфузорії, які можна побачити при зниженні навантажень, під час гарного протікання процесів нітрифікації.

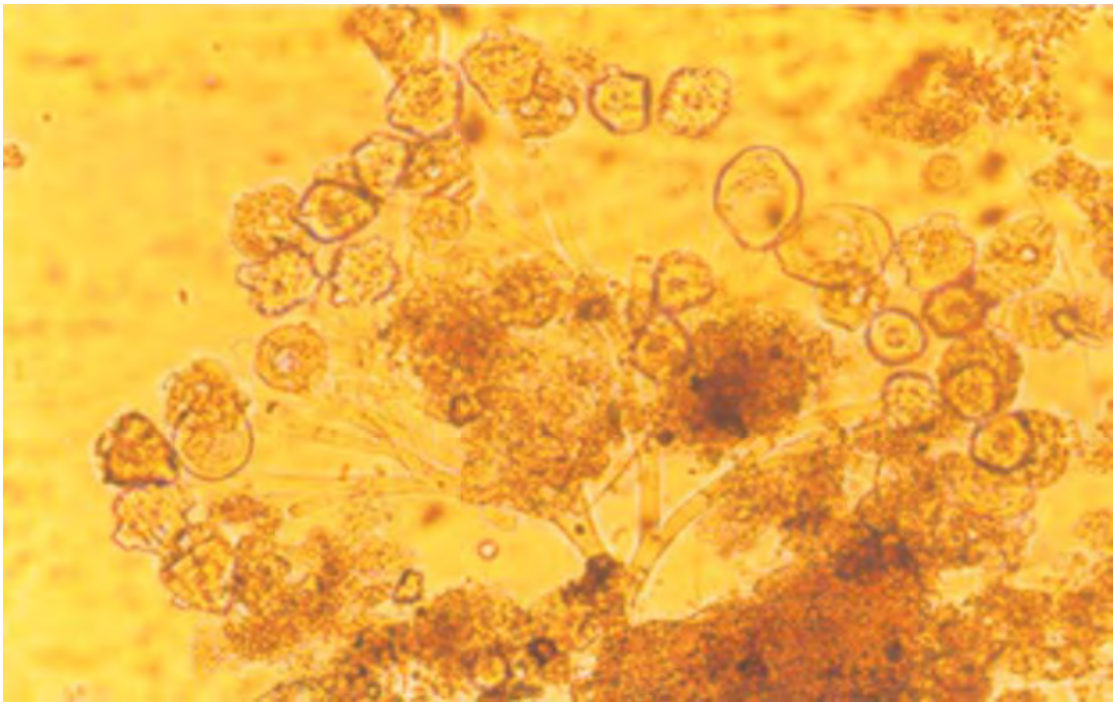


Рис. 15.21. Морфологічні зміни прикріплених інфузорій при впливі токсичних стічних вод



Рис. 15.22. Черевновійчаста інфузорія активного мулу

Коловійчасті інфузорії (перитрихи) причіплюються ніжкою до пластівців активного мулу. Таких причеплених перитрих існує понад 1000 видів. Серед них можуть

зустрічатися і поодинокі (рис. 15.23) і колоніальні форми (рис. 15.24, 15.25). Серед представників цього класу існують рухливі види. Причіплені інфузорії у випадку погіршення аеробних умов або ж при інших несприятливих чинниках переходять у плаваючий стан, для чого відкидають ніжку і формують нижній віночок вій. Такий одиночний рід як *Vorticella* має найрозвиненішу скорочену міонему, під час її скорочення стебло звертається у щільну спіраль. Домінуючий в аеротенках рід *Vorticella*, відрізняється в пластичністю прилаштування до умов середовища, зазвичай, зустрічається у різних органічних навантаженнях та харчується бактеріями й мілким детритом.

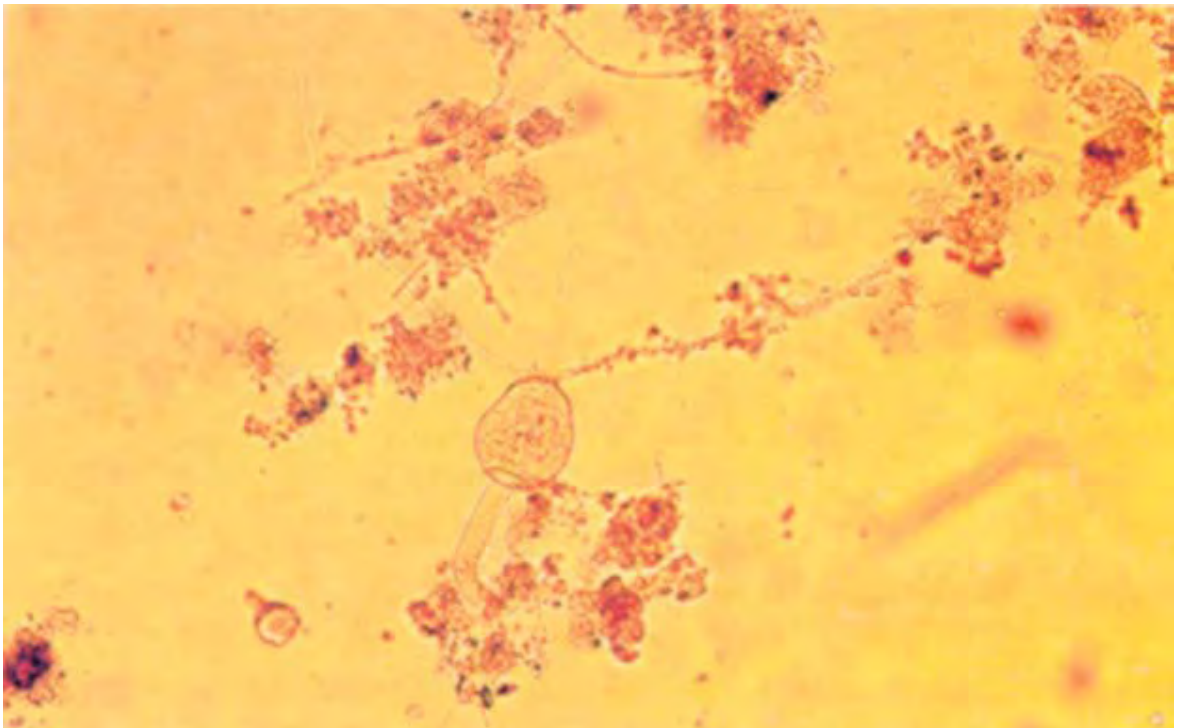


Рис. 15.23. Поодинока форма прикріплених інфузорій

Проте деякі види і екоформи – хороші показники різних ступенів забрудненості органічними речовинами. *Vorticella microstoma* var. *typica* (30 мкм) – грушоподібне тіло, яке зазвичай, зустрічається в очисних спорудах змішаних і побутових вод.



Рис. 15.24. Колоніальні форми коловійчастих інфузорій

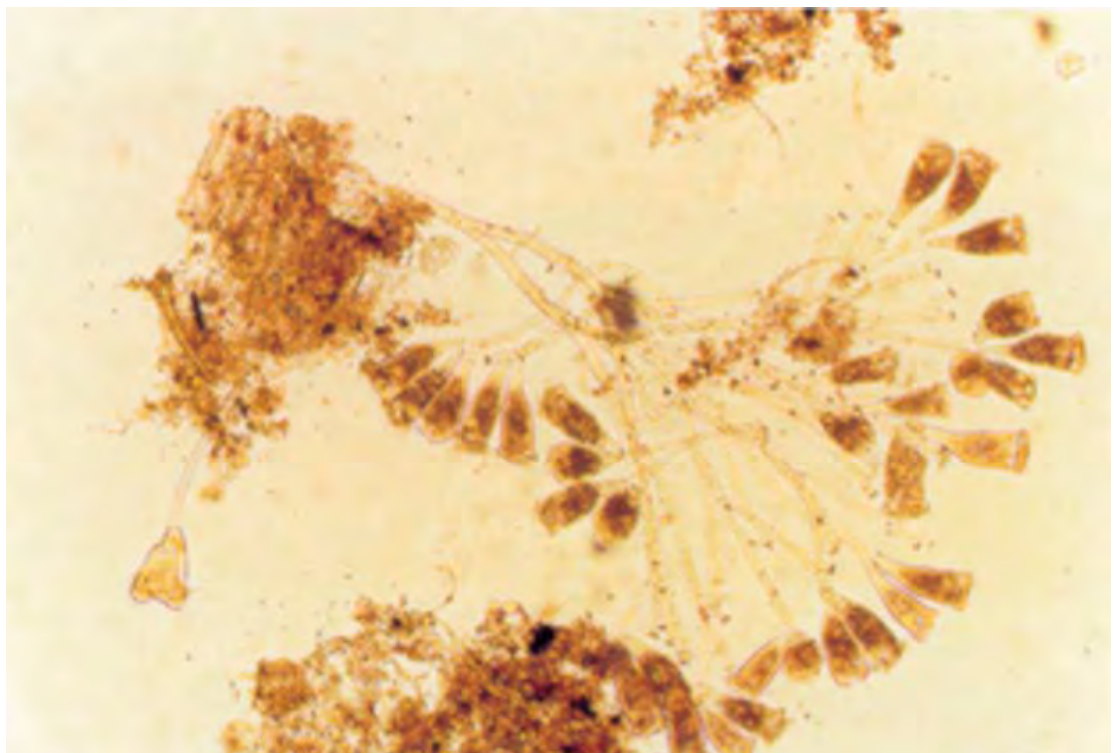


Рис. 15.25. Колоніальні форми прикріплених інфузорій

Vorticella microstoma var. *putrina* (70 мкм) – воронковидне тіло, дещо витягнуте в довжину, притаманне для активного мулу з великим навантаженням. Представники роду *Vorticella microstoma* var. *hyans* (40-60 мкм) мають роздуте тіло, характерні при залежуванні мулу, а також при порушенні аерації. Під *Vorticella convallaria* (60 мкм) – дзвінкоподібне тіло, існує в нормально працюючих аеротенках, при недоліках розчиненого кисню відповідає відривом від стеблинки та формуванням «бродяжок» – вільноплаваючих особин.

Рід *Opercularia* має нескоротні стебла та веретеноподібне тіло зооїдів без перистомального валика, а також закріплений на ніжці диск, який витягається або втягується у перистом (рис. 15.26). Дані колоніальні інфузорії досить поширені в активному мулі.

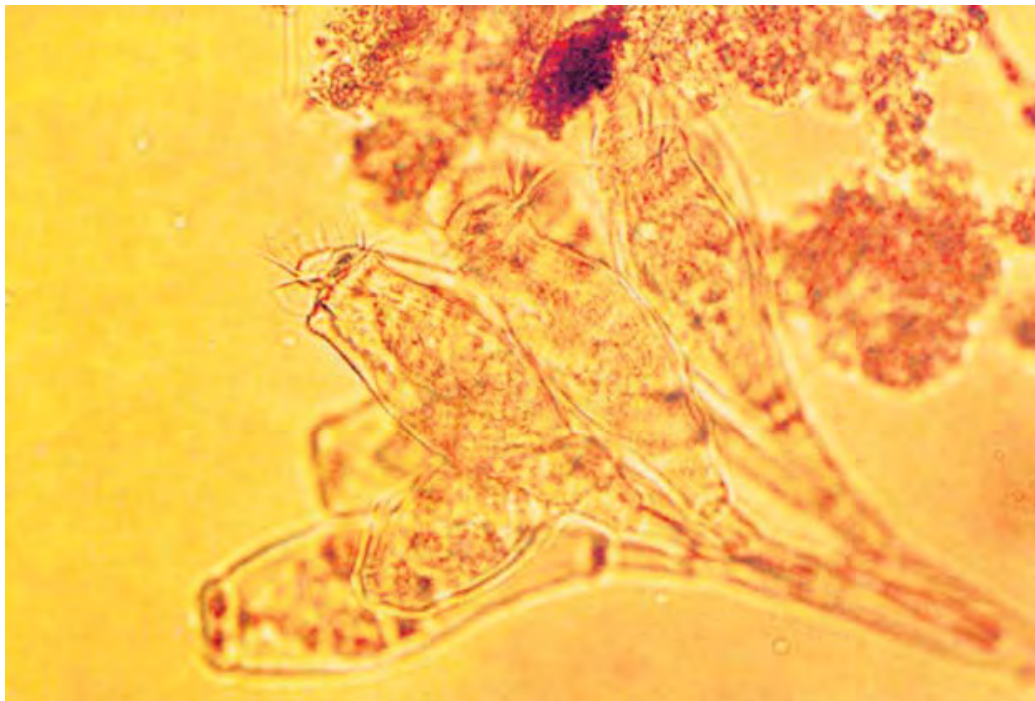


Рис. 15.26. Висунуті з перистому диски у зооїдів роду *Opercularia*

Opercularia coarctata вважають постійним жителем «гарно» дозрілого мулу, зокрема, якщо колонії знаходяться в активному стані з працюючими розкритими війними дисками. Вид *Opercularia minima*, зустрічається рідко, розвивається в

високо навантаженому мулі за неповного біологічного очищення.

Присутність в активному мулі представників виду *Zoothamnium* означає повне окислення забруднюючих речовин, а також нітрифікації. Пологи *Cothurnia* і *Vaginicola* (рис. 15.27) означають недовантажений активний мул, високу якість очищеної води та великий період аерації в аеротенках.

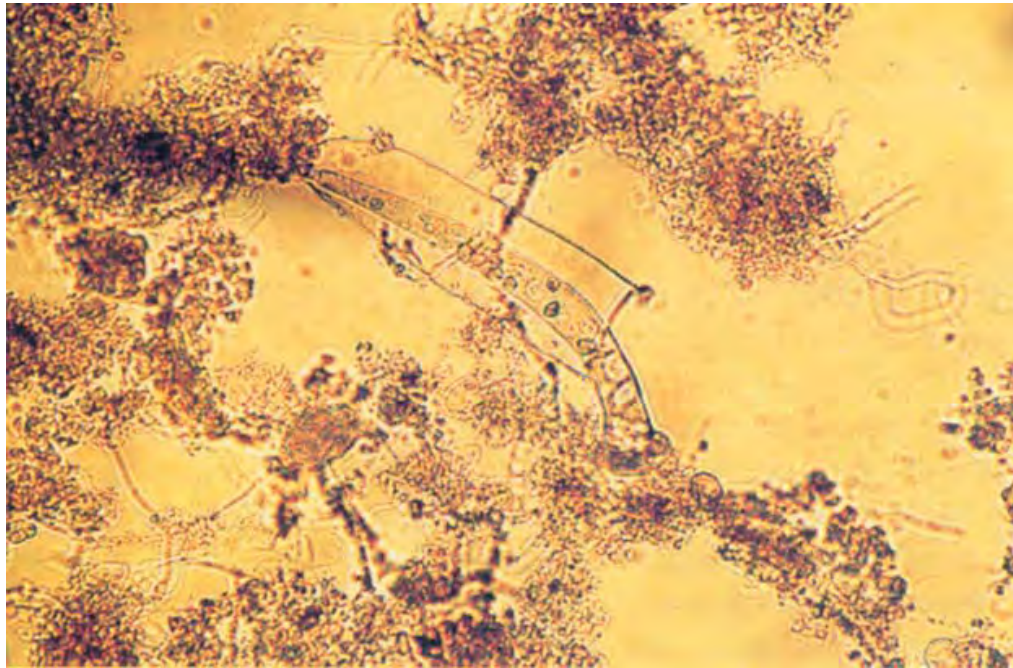


Рис. 15.27. Інфузорія роду *Cothurnia*

Сисні інфузорії (підтип *Suctoria*) теж є індикаторами високої якості очищення. В активному мулі сукторії представлені прикріпленими через нескорочувану стеблинку формами (рис. 15.28).

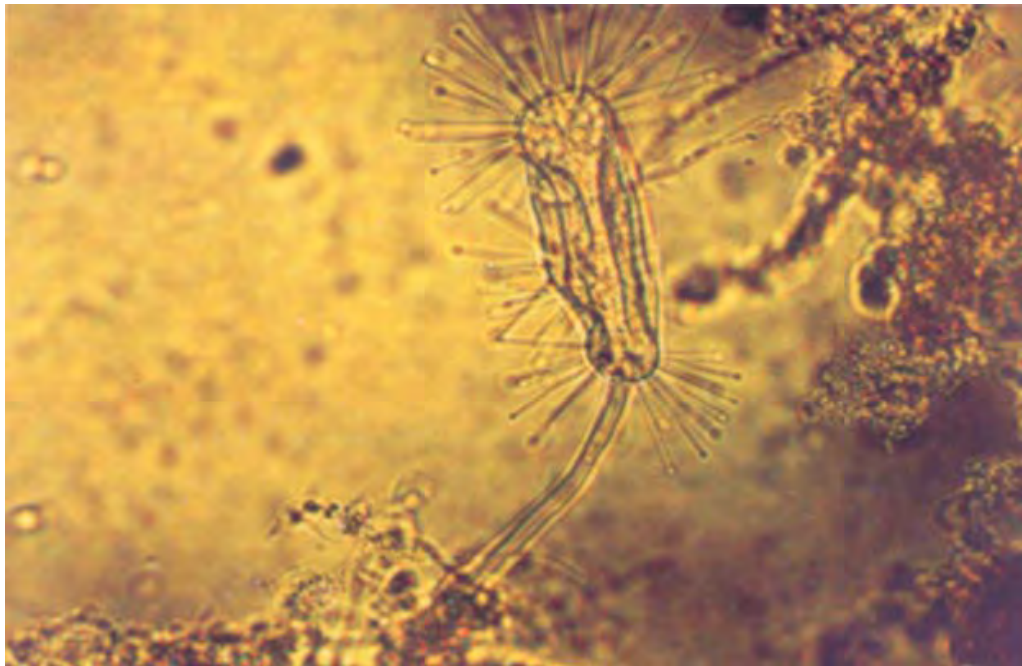


Рис. 15.28. Сисна інфузорія, прикріплена стеблинкою до бавовни активного мулу

На поверхні тіла сисних інфузорій в усі боки направлені смоктальні щупальця, на кінцях яких виокремлюється фермент або ж група ферментів, через які вони прикріплюють жертви, а також розчиняють оболонку і всмоктують їх вміст (рис. 15.29).



Рис. 15.29. Сисна інфузорія засмоктує вміст раковинної амеби

Коловертки (*Rotifera*) (від лат. *Rota* – колесо, *ferere* – нести) – це багатоклітинні організми (від 40 мкм до 2,5 мм). Їх тіло коловерток не сегментоване, проте поділяється на голову, тулуб і ногу, як коли дані відділи не виражені. Окремі види коловерток покрито панциром (рис. 15.30), зазвичай вони розвиваються у низько навантаженому активному мулі, внаслідок чого формується висока якість очищення. Такі безпанцирні коловертки як *Rotaria rotatoria* (рис. 15.31) та *Philodina roseola* є мешканцями мулу традиційних аеротенків, які сприяють повному окисленню забруднюючих речовин.

Для коловерток притамання самостійне плавання за допомогою колообертаючого апарату, який розташований на передньому кінці тіла, та війки якого безперервно мерехтять, залучаючи їжу у формі дрібної суспензії до ротового отвору. Під час скорочення голова втягується у тулуб, який зазвичай, звужується в більш-менш ясно виражену ногу, найчастіше кільчасту ззовні, з присоскою в кінці, або з одним чи декількома пальцями. Коловертки є важко організованими тваринами, із мускулатурою і органами травлення, а також нервовими вузлами і головним мозком.

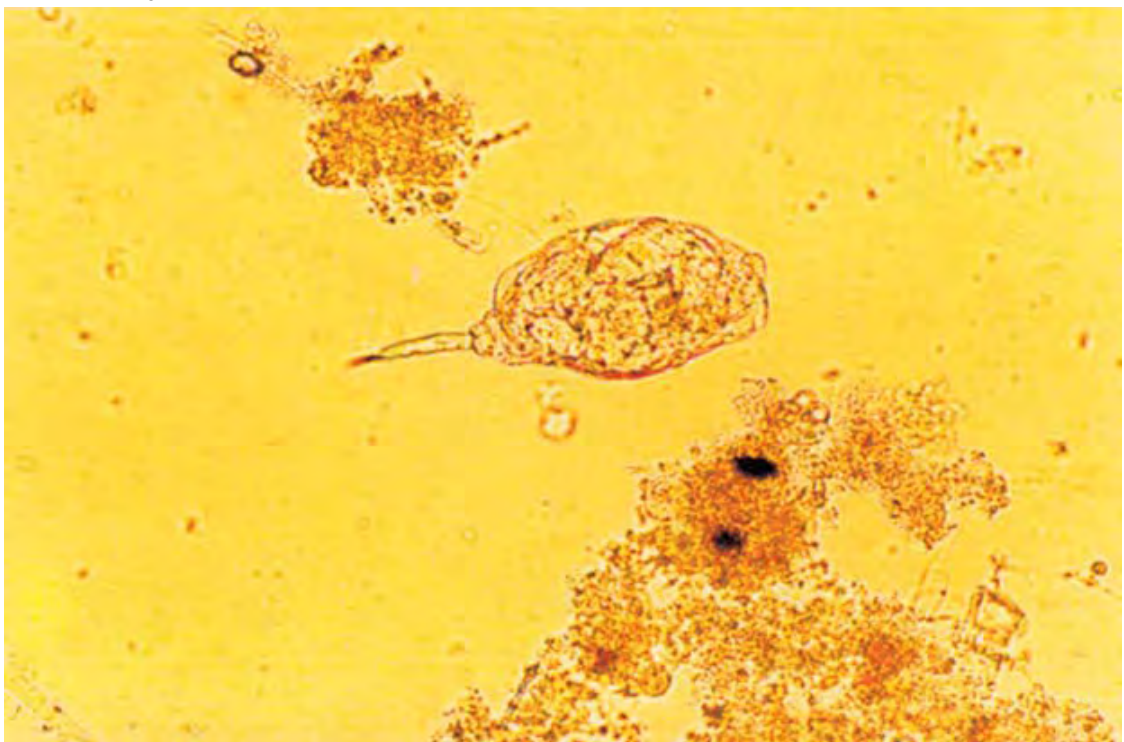


Рис. 15.30. Панцирна коловертка активного мулу

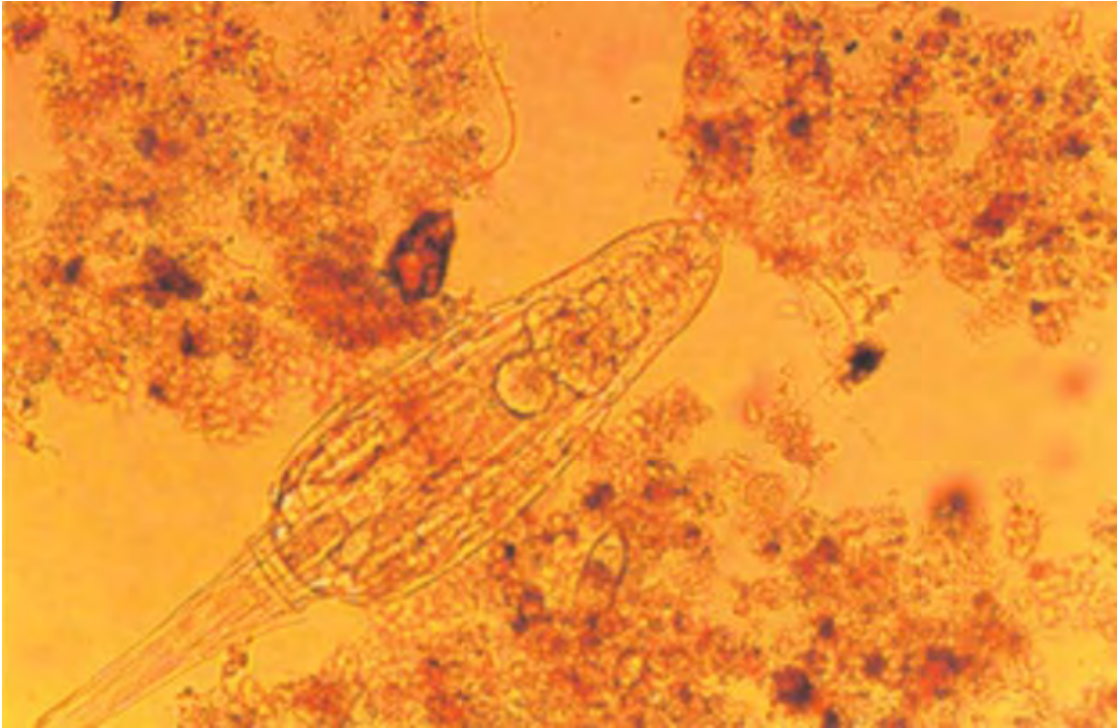


Рис. 15.31. Беспанцирна коловертка активного мулу

Розмножуються ж коловертки і партеногенетичним (незайманим) й статевим шляхом. При гарному харчуванні та оптимальних фізико-хімічних умовах розмноження здійснюється партеногенетичним шляхом, з погіршенням умов самка відкладає яйця, з яких виводяться як самки, так і самці (бувають карликові). Після процесу спарювання самок із самцями відкладаються яйця, які мають здатність переносити несприятливі умови. Також, є ще одна адаптаційна пристосованість до тих умов середовища, які можуть змінюватися в гіршу сторону, – коловертки мають здатність впадати в анабіоз, при цьому не інцистуються, а просто зморщуються і висихають. У висохлому стані вони можуть зберігати життєздатність протягом багато років навіть при значних коливаннях температури.

В активному мулі із **первиннопорожнинних черв'яків** зустрічаються такі круглі черв'яки як нематоди (*Nematoda*) (мал. 32). Відрізняють їх від інших черв'яків за рухом, адже вони не мають поперечної мускулатури, і тому під час руху згинають тіло не змінюючи при цьому своєї товщини. До біоценозу активного мулу можуть входити декілька видів

нематод, які у невеликих кількостях розвиваються у нормально працюючому мулі. Значна їх кількість вказує на залежування, а також погане перемішування мулу й недостатню аерацію, тому що нематоди, зазвичай, обирають застійні зони. Вони пропускають частку мулової маси через власний кишечник, здебільшого не встигаючи перетравлювати її, що в деяких випадках призводить до їх загибелі. Пластівці ж від травної діяльності нематод гарно мінералізуються, збільшуються і при цьому розрихлюються.

Також у складі активного мулу існує безліч **вториннопорожнинних черв'яків** – мікроскопічних малощетинкових черв'яків *Oligochaeta* (рис. 15.33). Це сегментовані черви, із сильно спеціалізованим переднім відділом, а також будовою статевої та травної систем. Статева система в них гермафродитна. Харчуються олігохети активним мулом, так як і нематоди, пропускаючи його через свій кишечник. Серед малощетинкових черв'яків можна зустріти хижаків.

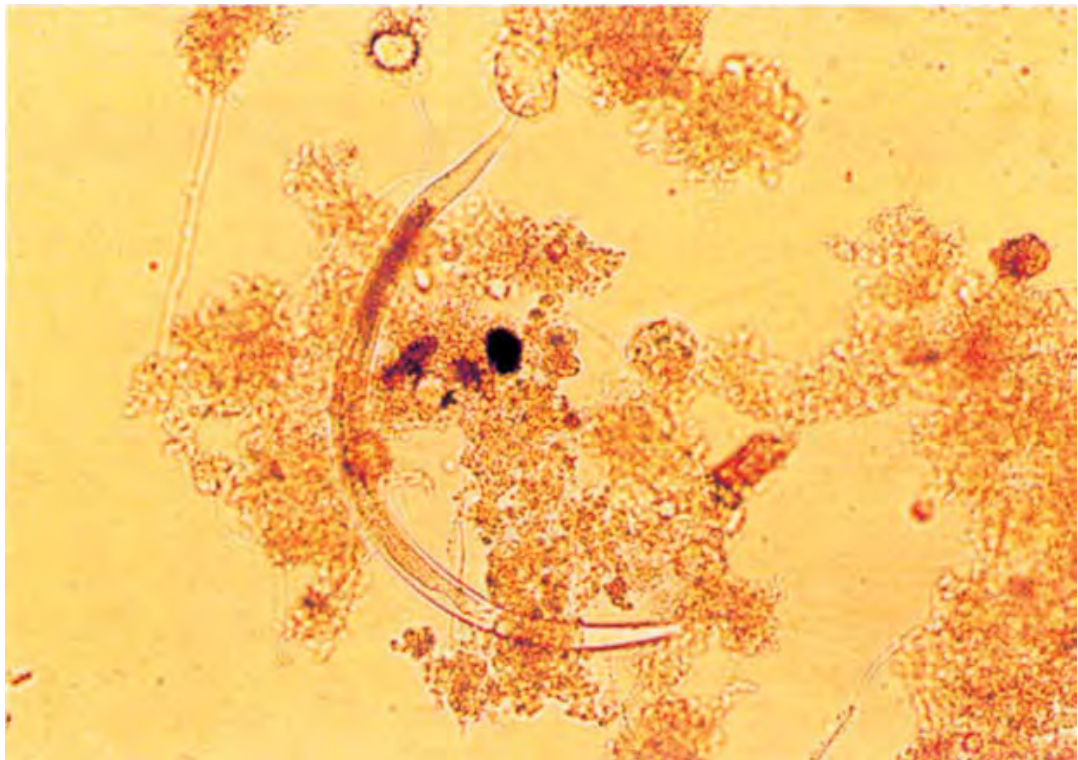


Рис. 15.32. Круглий хробак активного мулу (*Nematoda*)



Рис. 15.33. Малощетинковий черв'як

В біоценозах активного мулу зазвичай розвиваються черви аелозоми, які несуть жирові включення, пофарбовані каротиноїдами. Такі черви мають здатність швидко розмножуватися в активному мулі за допомогою паротомії, іншими словами, відокремлення особин від кінця тіла, який досить швидко доростає до необхідних розмірів. При гарному харчуванні паротомією може відокремлюватися весь ланцюжок черв'яків: три, а то й чотири особини.

Водні кліщі в активному мулі рідко зустрічаються і то в маленьких кількостях. Вони дуже дрібні, проте гарно помітні під мікроскопом завдяки темному забарвленню хітину. На черевному боці добре помітні вісім пар ніг, а на голові є очі й дві пари жвал. Водні кліщі розвиваються у мінералізованому, а інколи і в голодуючому активному мулі. Їх найчастіше можна зустріти у біофільтрах.

Тихоходи (*Tardigrada*) вважаються родичами членистоногих, відрізняються від яких лише відсутністю зовнішнього скелета, а також членистих кінцівок. Їх тіло не

сегментоване, проте чотири пари м'ясистих ніжок, які закінчуються кігтиками, розташовано уздовж всього тіла (рис. 15.34). Через повільне специфічне крокування тихоходів інколи ще називають водним ведмедем. В них не має жорсткого зовнішнього скелета, а тіло покрите нехітиною кутикулою, яку вони скидають в процесі линьки або ж при відкладанні яєць (рис. 15.35). Харчування хиже, вони проколюють жертву двома стилетами, які містяться в ротовій порожнині, а потім висмоктують клітинний вміст із найпростіших, водоростей, коловороток і нематод. Тихоходи є показниками високої якості очищення, ефективної нітрифікації.

Ветвистоусі рачки в окремих випадках у великій кількості розвиваються в аеротенках-відстійниках або ж у вторинних відстійниках недовантажених станцій із тривалішим періодом аерації, а також глибокою нітрифікацією за умови гарної якості очищення. У склад активного мулу вони не входять і не мають індикаторного значення.

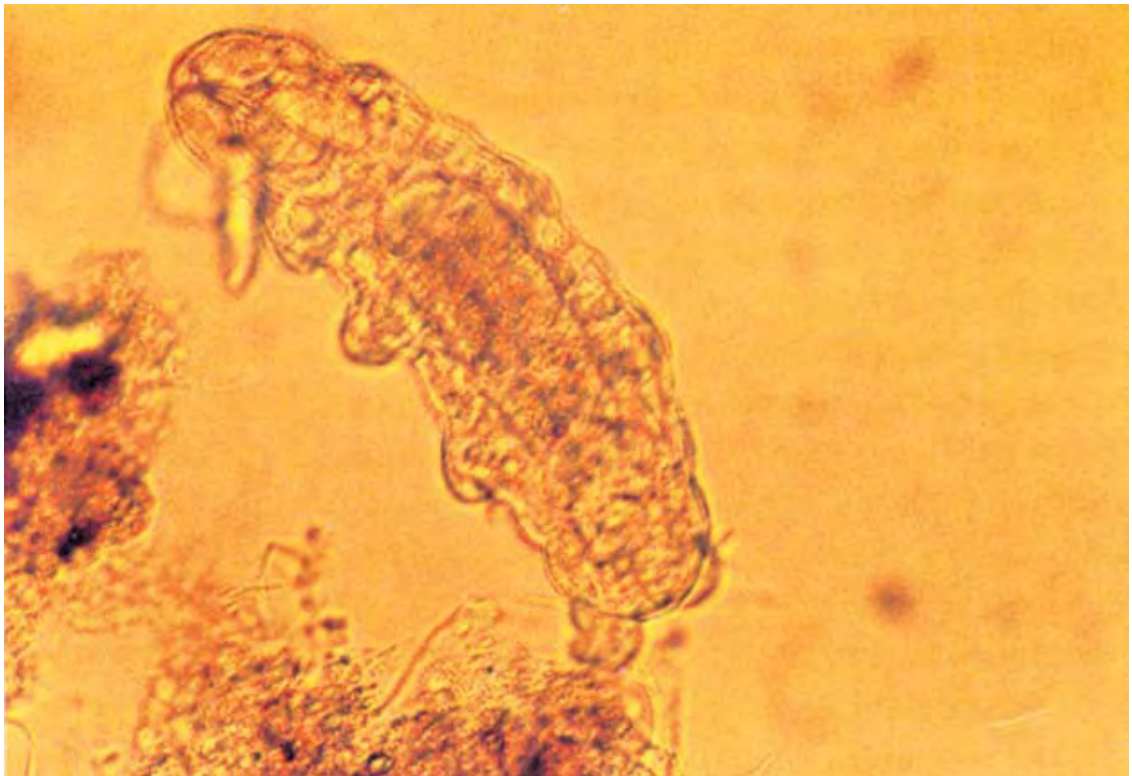


Рис. 15.34. Тихоходка (*Tardigrada*)

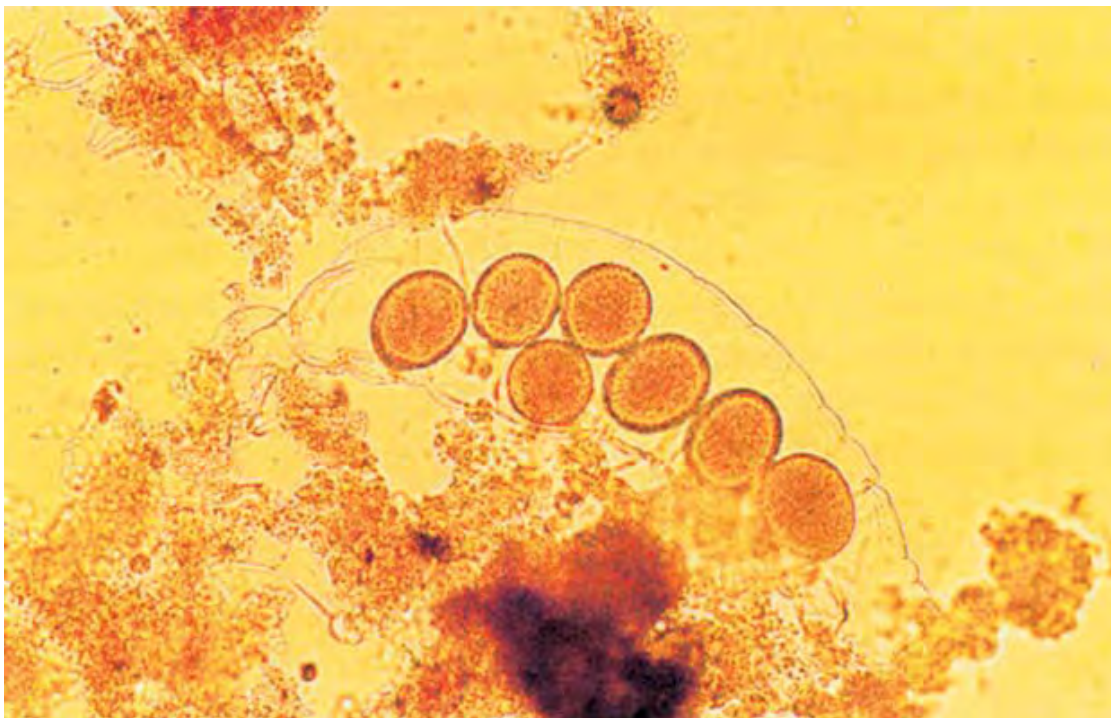


Рис. 15.35. Яйця тихоходки, вкриті її скинутою кутикулою

15.1.3. Чинники, які впливають на функціонування активного мулу

Доза мулу. Традиційно удержується на рівні 2-3 г/см³. Підвищення дози мулу могло посприяти прискоренню процесів окислення, проте виникли б проблеми під час відділення мулу у вторинних відстійниках. При дозі мулу в аеротенках > 3 г/см³ здійснюється зайве його накопичення у муловій зоні вторинних відстійників та загнивання, а також збільшується виніс із очищеною водою.

На розмір дози активного мулу у аеротенках може впливати величина мулового індексу, який окреслює здатність активного мулу у вторинних відстійниках до осадження. **Муловий індекс** – обсяг, який містить 1 г активного мулу (в сухій масі) після завершення 30-хвилинного відстоювання у вимірювальному циліндрі на 1000 см³. Оптимальним значенням мулового індексу є 80-120 см³/г. При муловому індексі <120 мл/г мул дуже добре осідає, при значенні

120-150 см³/г – задовільно, при індексі >150 см³/г – погано. Головною вимогою до мулового індексу є стабільність його значень, яка означає задовільні умови експлуатації споруд, а також життєдіяльності мулу.

При інших рівних умовах чим меншим є муловий індекс, тим більша доза мулу піддержується в аеротенках. Значення мулового індексу, а також рекомендовані дози активного мулу залежно від його величини під час очищення стічних вод певних виробництв, наведено у табл. 15.1.

Варто наголосити, що при збільшенні дози мулу не зберігається необхідна пропорційна залежність між дозою, а також швидкістю споживання забруднень. Насамперед, це пов'язується із значним погіршенням масообміну через збільшення в'язкості.

Таблиця 15.1

Рекомендовані дози активного мулу в залежності від величини індексу мулу під час очищення стічних вод певних виробництв і міських стічних вод

Вид виробництва та стічних вод	Муловий індекс, см³/г	Рекомендована доза активного мулу, г/дм³
Нафтопереробне	70–100	5,0–3,0
Синтетичного каучуку	40–70	6,0–5,0
Штучного волокна	200–250	2,0–1,5
Целюлозно-паперове	150–200	2,5–2,0
Міські стічні води	80–120	4,5–3,0

Турбулентність потоку в аеротенках. З метою поліпшення умов харчування мікроорганізмів потрібно забезпечити посилену турбулентність потоку. Внаслідок перемішування відбувається розпад пластівців активного

мулу на дрібніші, розширюється поверхня контакту їх з навколишнім середовищем, сильніше споживаються забруднення та кисень, виводяться продукти метаболізму, підвищується швидкість очищення. Згідно лабораторних досліджень видно, чим інтенсивніша турбулентність потоку, тим більше змінюється склад активного мулу: стає менше вільнооплаваючих найпростіших та нитчастих форм бактерій, а також збільшується кількість бактеріальних зооглейних скупчень.

Подача повітря. подача повітря має забезпечувати безперервну наявність розчиненого кисню в очищаючій воді не менше 2 мг/дм³. Зниження вмісту кисню до 1 мг/дм³ не дає помітного зменшення швидкості утилізації забруднень. Проте під час відділення мулу від води у вторинних відстійниках втрачається від 1 до 2 мг/дм³ кисню, а це зазвичай призводить до тривалого знаходження мулу в анаеробних умовах.

Також окрім забезпечення киснем аеробних організмів, подача повітря потрібна й для перемішування мулової суміші, хімічного окислення забруднюючих речовин та видалення продуктів метаболізму.

Витрати повітря на очищення 1 м³ стічних вод можуть становити від 3,5 до 15 м³. Для окислення 1 кг органічних сполук, вміст яких визначається величиною БПК, в середньому необхідно біля 30-55 м³ повітря.

Температура. Для аеробних процесів оптимальною температурою є 20-30°C. А біоценоз очисних споруд при цьому, при інших сприятливих умовах, характеризується різноманітнішими і розвиненішими мікроорганізмами.

У випадку, коли температура не відповідає оптимальній, швидкість обмінних процесів у клітині, а також зростання культури є значно нижчими за максимальні для цієї культури значень. У цей же час найнесприятливіший вплив на розвиток культури призводить до різкої зміну температурного режиму.

Вплив збільшення температури посилюється певним зниженням розчинності кисню.

Значення рН. Більша частина бактерій ефективніше розмножуються у середовищі або з нейтральним значенням рН або ж наближеним до нього (рН 6,5-7,5). Так, у кислому середовищі (рН 4,0-6,0) мають здатність розвиватися дріжджі і гриби, а в слаболужному – актиноміцети.

Середовище, у процесі розкладання забруднень, може підкислятися (кислоти) або ж підлужнюватися (аміак) за допомогою продуктів розкладання.

Біогенні елементи, макро- й мікроелементи. Задля оптимального процесу синтезу клітинної речовини, а тому й для результативного процесу очищення у середовищі стічної води, необхідна достатня концентрація саме біогенних елементів, макро- й мікроелементів.

Традиційно потреба в біогенних елементах визначається співвідношенням БПК:N:P, яке має становити 100:5:1. Сюди враховують азот в амонійних солях або ж білковий азот, а також фосфор – у формі розчинних фосфатів. У побутових стічних водах, які попередньо пройшли механічне очищення, а потім йдуть на біологічне, таке співвідношення приблизно становить 100:20:2,5. Дані води доречно очищати разом із виробничими, в яких невеликий вміст сполук фосфору й азоту.

Навантаження за забрудненнями. В більшості випадків значення навантаження вираховують за БПК, а інколи – за індивідуальними забрудненнями у перерахунку на 1 м³ очисних споруд, чи на 1 г сухої біомаси активного мулу або ж на 1 г його безпопельної частини в одиницю часу (зазвичай добу).

За величиною навантаження аераційні системи поділяються на ті, які з високим навантаженням, класичні та з низьким навантаженням.

Високим навантаженням вважається >400 мг БПК_{повн} на 1 г безпопільної речовини активного мулу на добу. У даних спорудах є самий великий приріст мулу та найменший ступінь очищення.

Сам перевантажений активний мул не спроможний справитися з окисленням забруднень, які надходять. В цьому мулі небагато видів найпростіших, за кількістю домінують 2-3 види. Традиційно спостерігається наявність значної кількості безбарвних джгутикових, а також інфузорій чи дрібних амеб. Пластівці мулу темні, включають різні тверді включення.

В таких умовах мають здатність розвиватися нитчасті форми бактерій, пластівці ж мулу розпадаються, у значній кількості наявні бактерії у підвішеному стані, а вода над мулом є каламутною.

Спорудами із класичним навантаженням (150-400 мг БПК_{повн} на 1 г безпопільної речовини активного мулу на добу) забезпечується висока ступінь очищення за БПК, в деяких випадках – часткова нітрифікація. Заселені вони великою кількістю організмів різних груп, а бактерії, зазвичай, містяться в зооглейних скупченнях, пластівці компактні, щільні, мул досить швидко осідає, вода над ним є прозорою.

Приріст мулу менший за максимальний через процеси ендогенного окислення мулу, які проходять досить глибоко.

При низькому навантаженні (<150 мг БПК_{повн} на 1 г безпопільної речовини активного мулу на добу), ступінь очищення в спорудах може коливатися, але найчастіше є високою. При цьому приріст мулу мінімальний, а процес нітрифікації глибоко розвинений, біоценоз мулу передбачає різноманітність видів. Спостерігається плавне зменшення розмірів найпростіших, стають вони прозорими та втрачають травні вакуолі. Інфузорії ж плавно трансформуються в цисти. Також пластівці мулу стають прозорими, а вода над мулом опалесцентує.

Але це може бути лише тоді, коли низькі навантаження супроводжуються допустимим навантаженням за токсикантами, які наявні у стічних водах та можуть накопичуватися в активному мулі внаслідок біосорбції.

Токсичні речовини. Для запобігання придушення токсичними речовинами життєдіяльності активного мулу, встановлюють певні гранично допустимі концентрації (ГДК) індивідуальних токсичних речовин, та виявляють ймовірний вплив суміші речовин, які водночас наявні в очищуючій воді.

Є такі забруднення, які, не впливаючи на процеси біоокислення, діють негативно на діяльність очисних споруд: змінюють розчинність кисню, викликають піноутворення та ін. Для цих з'єднань (ПАР, барвники та ін.) теж встановлюють ГДК.

Не існує будь-якої такої залежності між величинами ГДК і своїм біохімічним окисленням речовини, яку визначають співвідношенням БСК / ХСК.

Існують випадки, коли за відносно високого значенні ГДК, біохімічно не окислюється сама речовина. Наприклад, ГДК для фреону-253 (трифторхлорпропана) становить 100 мг/дм³, а співвідношення БСК/ХСК = 0. Дане з'єднання транзитом переміщається через очисні споруди, при цьому не маючи шкідливої дії на мікробіоту активного мулу.

Дивлячись з іншого боку, певні речовини за надто низького значення ГДК, відзначаються середньою величиною відношення БСК/ХСК. Так, наприклад, ГДК метилфенілкетона становить 0,1 мг/дм³, в той же час для нього відношення БСК/ХСК становить 0,425, тобто за низького вмісту у стічній воді може бути він біологічно окислений.

Приріст мулу. Потужність приросту активного мулу, насамперед, залежить від таких факторів:

- походження субстрату, який окисляється;

- здатності активного мулу самоокислятися, яку визначають величиною навантаження на мул, а також тривалістю аерації;

- седиментаційних особливостей мулу і видалення зважених речовин із вторинних відстійників;

- присутності токсикантів, які мають здатність знижувати приріст, або ж мутагенів – стимуляторів приросту.

Отже, під час очищення стічних вод, які вміщують високі концентрації легкоокисливаних забруднень (стічні, міські води харчової промисловості), приріст мулу є підвищеним, а в процесі очищення промислових стічних вод складного складу, навпаки, – зниженим. Зменшення приросту можна спостерігати на тих спорудах, де у стічних водах, які очищаються, наявні токсичні або ж бактерицидні речовини (тобто фармацевтичні заводи, підприємства з виробництва пестицидів, хімічних реактивів та ін.). При цьому деякі полютанти мають здатність стимулювати приріст мулу. Так, наприклад, фенол – досить токсична речовина. Для водних об'єктів, які мають рибогосподарське значення, його ГДК становить $0,001 \text{ мг/дм}^3$, але в процесі очищення стічних вод, в яких наявний фенол у більших концентраціях (при виготовленні, наприклад, залізобетонних конструкцій – до $0,05 \text{ мг/дм}^3$), він може викликати надмірний приріст активного мулу.

Регенерація активного мулу. Більша частина активного мулу, який відстоюється у вторинному відстійнику, має знову перетікати в аеротенк. Його називають циркуляційним активним мулом. В більшості випадків, у вторинному відстійнику мулу збирається більше, ніж необхідно для самої циркуляції, тому надлишковий мул відправляють на утилізацію.

Необхідною умовою для циркуляційного активного мулу є те, що він має проходити регенерацію, тобто іще додаткову

інтенсивну аерацію за відсутності забруднень, які нові надходять (у регенератор стічна вода не подається).

Сутність системи регенерації – окислення складно-окислювальних органічних сполук, які сорбовані на мулі, а також відновлення його сорбційної здатності й окисних властивостей. Окрім цього, відновлюються блоковані токсикантами ферменти, біологічно інертні токсиканти депонуються у полімерному гелі мулу. У системах з регенератором знижується приріст мулу, а також покращуються його властивості з волого віддачі.

Регенерація потребує більше часу знаходження мулу в системі близько 8-18 й більше годин, а час перебування в аеротенках складає біля 2-6 год.

Регенерація активного мулу передбачається тоді, коли БПК_{повн} стічних вод, які надходять на очищення, значно перевищує 150 мг O₂/дм³, а також за присутності виробничих важкоокисляючих домішок у стічних водах.

Вік активного мулу. Віком активного мулу є середній час знаходження пластівців мулу в системі «аеротенк – вторинний відстійник». Величина віку є обернено пропорційною швидкості приросту мулу. Слід зазначити, що чим більшим є навантаження на мул, тим його приріст більший і більше утворюється надлишкового мулу, який виводиться, а, отже, вік мулу поступово зменшується.

Молоді, швидко зростаючі пластівці мають здатність відразу витягати забруднюючі речовини, і водночас не мають недостатньої здатності до седиментації. В цей же час мул, який добре осідає, зазвичай, має малу активність окислення забруднюючих речовин.

Бактерії, у пусковий етап роботи очисних споруд, перебувають у підвішеному стані, далі злипаються у пластівці, які зростають з віком мулу. У міру того як розвиваються та старіють пластівці, вони здебільшого складаються з мертвих клітин, а також акумульованих

інертних частинок (адже мертві клітини теж мають здатність чистити воду власними ферментами, хоча й недовго і гірше). Отже, у міру старіння пластівці зростають у розмірах, ефективніше сорбують забруднення, краще захищені біополімерного гелем від токсикантів, а також легше відділяються від очищеної води під час відстоювання. Проте у пластівцях, які старіють, знижується відносна кількість активних живих клітин, у процесі збільшення розміру пластівців мулу значно погіршується доступ кисню до деяких бактеріальних клітин, а також утруднюється виведення метаболітів, тобто погіршується процес масообміну клітин із навколишнім середовищем, а тому й знижується швидкість окислення забруднень.

Очисні споруди мають працювати на максимальній концентрації мулу, при якій забезпечувалися б і достатнє постачання пластівців мулу за допомогою розчиненого кисню, і задовільна робота вторинних відстійників.

Споруди з високим навантаженням працюють на неповне очищення з віком мулу тривалістю не більше 2-3 діб. Низькі навантаження на мул притаманні нітрифікації і великому віку мулу (6-12 діб). А вік мулу більший 8 діб може забезпечувати глибоку мінералізацію органічних речовин із майбутньою нітрифікацією.

Слід зазначити, що чим складніший склад стічних вод, тим більший необхідно підтримувати вік мулу з метою забезпечення ефективного окислення забруднюючих речовин. Ось, для біохімічного очищення стічних вод у процесі виробництва синтетичного каучуку необхідним віком мулу є 20-30 діб, а полівінілового спирту – більше 50 діб.

Ступінь рециркуляції мулу. З метою підтримки в аеротенках оптимальної кількості біомаси активного мулу достатнього віку необхідна часткова рециркуляція, тобто повернення біомаси зі відстійника в аеротенк. Маса поворотного мулу, яка вилучається з вторинних відстійників і

відправляється в регенератор, становить від 30 до 70% від кількості стічних вод, які очищаються. Для кожної з очисних споруд даний показник є індивідуальним, а визначається розрахунком як ступінь рециркуляції.

Слід зазначити, що чим нижчою є середня доза мулу та вищий муловий індекс, тим більше мулу необхідно повертати до регенераторів. А отже, при підвищенні питомого навантаження на мул та погіршенні його седиментаційних властивостей до самого спухання мулу, зростає винос мулу з вторинних відстійників, іншими словами втрати мулу збільшуються, тому потрібно в систему повертати максимальний обсяг мулу.

У випадку, коли на спорудах наявний менший відсоток рециркуляції, аніж розрахунковий, у вторинних відстійниках мул переущільнюється і далі буде загнивати, а в аеротенках зростатимуть питомі навантаження через низьку концентрацію мулу. Якщо ж присутній більший відсоток рециркуляції – збільшиться витрата енергії на перекачування саме мулу, а сам мул у вторинних відстійниках буде не до кінця ущільнений. В обох цих випадках підвищиться вміст зважених речовин із вторинних відстійників, а також погіршиться якість очищення.

Окислювальна потужність аеротенків. Обсяг органічних забруднень, які знімаються за одиницю часу масою активного мулу, що міститься в одиниці об'єму аеротенках називають *окислювальною потужністю аеротенків*. А тому, окислювальна потужність є і показником навантаження на активний мул, і показником питомої швидкості окислення, іншими словами потенційною ефективністю розкладання органічних забруднюючих речовин для таких умов.

Окислювальна потужність на міських спорудах біологічного очищення може варіюватися від 0,1 до 1,5 кг БПК/(м³ · добу).

15.2 Теоретичні основи процесу біологічного очищення стічних вод

Вплив концентрації органічних забруднень на швидкість біохімічного окислення. Швидкість зростання біомаси мікроорганізмів визначається за допомогою рівняння Моно:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S},$$

де μ – питома швидкість зростання біомаси, ч⁻¹;

$\mu_{\max}$ – максимальна питома швидкість зростання біомаси, ч⁻¹;

S – концентрація субстрату, мг/дм³;

K_s – константа насичення за субстратом, кількісно рівна такій концентрації субстрату, при якій $\mu = 0,5 \mu_{\max}$, мг/дм³.

Питому швидкість росту біомаси визначають за формулою:

$$\mu = \frac{dX}{d\tau} \frac{1}{X},$$

де X – концентрація біомаси, мг/дм³.

Взаємозв'язок між швидкістю споживання субстрату, а також швидкістю зростання біомаси описується залежністю:

$$\frac{dX}{d\tau} = -Y \frac{dS}{d\tau},$$

де Y – економічний коефіцієнт, який представляє вихід біомаси на одиницю спожитого субстрату, мг/мг.

Беручи до уваги рівняння Моно, швидкість споживання субстрату можна записати так:

$$-\frac{dS}{d\tau} = \frac{1}{Y} \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} X.$$

Дане рівняння застосовується у математичних моделях систем біологічного очищення стічних вод.

Щодо стічних вод воно має такий вигляд:

$$-\frac{dL}{d\tau} = \alpha \frac{\mu_{\max} L}{K_m + L} a,$$

де L – величина БПК_{повн}, яка представляє концентрацію споживаного субстрату S , мг/дм³; α – величина, зворотна економічному коефіцієнту, яка представляє кількість БПК, з якого утворюється 1 г мулу, мг/г; K_m – константа насичення забрудненнями, мг/дм³; a – концентрація безпопельної речовини активного мулу, г/дм³.

Приріст мулу є маленьким, а значення a є постійним.

Після розділення змінних, а також інтегрування отримуємо:

$$\begin{aligned} -\frac{dL(K_m + L)}{L} &= \mu_{\max} a \alpha d\tau, \\ -(K_m \ln L_\tau + L_\tau) &= \mu_{\max} a \alpha \tau + c, \end{aligned}$$

де L_τ – значення БПК_{повн} в момент часу τ , мг/дм³.

На початковий момент часу, коли $\tau = 0$,

$$c = -(K_m \ln L_0 + L_0),$$

де L_0 – початкове значення БПК_{повн}.

Тоді

$$-(K_m \ln L_\tau + L_\tau) = \mu_{\max} a \alpha t - (K_m \ln L_0 + L_0),$$

Звідки

$$\tau = \frac{K_m (\ln L_0 - \ln L_\tau) + (L_0 - L_\tau)}{\alpha \mu_{\max} a} = \frac{L_0 - L_\tau}{\alpha \mu_{\max} a} + \frac{K_m \ln \frac{L_0}{L_\tau}}{\alpha \mu_{\max} a}.$$

Дане рівняння покладене в основу формул для визначення періоду аерації в аеротенках різних конструкцій. Іще додатково вводять коефіцієнти, які враховують дію концентрації розчиненого кисню, зольність мулу, властивості органічних забруднюючих речовин, інгібування продуктами розпаду тощо.

Вплив токсикантів. Окислення забруднень – це сукупність ферментативних реакцій. Наявні в стічній воді токсичні речовини, мають здатність пригнічувати ферментативні реакції через взаємодію з ферментом.

За механізмом дана взаємодія може бути як конкурентною, так і неконкурентною.

Токсикант, у першому випадку, конкурує з субстратом за взаємодію з активним центром ферменту, і внаслідок цього змінюється константа насичення. Рівняння, яке описує кінетику такого процесу, у даному випадку виглядає так:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} L}{K_m (1 + \frac{I}{K_i}) + L},$$

де I – концентрація інгібітора, мг/дм³;

K_i – константа насичення під час інгібування, мг/дм³.

Дане інгібування не так відчутне за високої концентрації субстрату.

У процесі неконкурентного інгібування токсикант вже реагує не з активним центром ферменту, а з іншою його ділянкою. Водночас він не перешкоджає взаємодії субстрату з ферментом, але має здатність заважати розпаду фермент-субстратного комплексу. У такому випадку ступінь

гальмування визначають концентрацією інгібітора, знижується максимальна швидкість, а процес описують рівнянням:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} K_i}{K_i + I} \frac{L}{K_m + L},$$

де $\mu_{\max}$ – максимальна швидкість за відсутністю пригнічення, ч⁻¹;

$$\frac{\mu_{\max} K_i}{K_i + I}$$

– максимальна швидкість за наявності інгібітору, ч⁻¹.

Під час очищення концентрованих стічних вод можна спостерігати «субстратне інгібування». В певних умовах високої концентрації субстрату відбувається взаємодія проміжних продуктів ферментативної реакції із ще однією чи ж декількома молекулами субстрату, внаслідок чого формується комплекс, який не дає кінцеві продукти реакції.

Ступінь інгібування за допомогою субстрату знижують різними методами:

- зменшенням концентрації субстрату, іншими словами концентрації забруднень у випадку очищення стічних вод;
- підвищенням концентрації ферменту, іншими словами дози активного мулу;
- зменшенням величини константи швидкості реакції шляхом тривалої адаптації активного мулу.

Вплив концентрації кисню. Залежність швидкості аеробного процесу від відповідної концентрації розчиненого кисню описується рівнянням:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_K}{K_K + C_K},$$

де C_K – концентрація розчиненого кисню, мг/дм³;

K_K – константа насичення за киснем, мг/дм³.

Подвійне рівняння Моно бере до уваги дію на швидкість аеробного окислення та субстрату, а також кисню:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} L}{K_m + L} \frac{\mu_{\max} C_K}{K_K + C_K}.$$

З даного рівняння видно, що дія концентрації розчиненого кисню саме на швидкість процесу досить відчутна під час відсутності лімітування субстратом. Саме тому максимальне збільшення швидкості окислення забруднень через підвищення концентрації розчиненого кисню можливе лише при неповному очищенню концентрованих стічних вод або ж на початкових стадіях багатоступеневих схем.

Вплив дози мулу. Як зазначалося вище, збільшення дози мулу в аеротенках призупиняється через погіршення його осадження у вторинних відстійниках, а також підвищення енергетичних витрат на аерацію. Водночас дослідження показують, що сама швидкість окислення є прямо пропорційною концентрації безпопільної речовини активного мулу лише в маленькому діапазоні його концентрацій (1-7 г/дм³). Основною причиною зменшення активності окислення забруднень активним мулом в процесі збільшенні його концентрації є інгібуючий вплив продуктів метаболізму. Кінетику процесу у такому випадку описують рівнянням для неконкурентного інгібування, при якому інгібітором є продукти метаболізму мулу:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} K_p}{K_p + P} \frac{L}{K_m + L},$$

де K_p – константа насичення за продуктами метаболізму, мг/дм³;

P – концентрація продуктів метаболізму мулу, мг/дм³.

15.3 Біодеградація забруднень в аеробних умовах

Процес видалення забруднень, які поступають зі стічною водою в аеротенк, розділяють на *три стадії*:

1. Дифузія забруднень з рідкої фази, а також сорбція цих забруднень на поверхні пластівців активного мулу. Швидкість даного процесу визначається за допомогою законів дифузії і напряду залежить від гідродинамічних умов у аеротенках. Сорбція ж забруднень відбувається досить швидко. Уже через пару хвилин після контакту стічної води із мулової сумішшю, значно знижується концентрація забруднень у воді.

2. Надходження речовин у середину клітини. В залежності від виду організмів, а також забруднень, перенесення речовин реалізується за допомогою дифузії, фагоцитозу або активного транспорту. Макромолекули тут розщеплюються на дрібніші фрагменти екзоферментами, які секретуються клітинами. Крім цього тверді частинки забруднень сорбуються на поверхні пластівців мулу, а вже потім або споживаються найпростішими, або ж, якщо це органічні речовини, розщеплюються екзоферментами.

3. Катаболізм (розщеплення) забруднюючих речовин до простих сполук. Він характеризується виділенням енергії, а також утворенням відновлювальних еквівалентів (електронів, атомів водню, гідрид-іонів). Слід зазначити, що і енергія, і відновні еквіваленти застосовуються під час біосинтезу (анаболізму), тобто здійснюється приріст активного мулу.

Катаболізм вуглеводів. У стічних водах можуть знаходитися як моно-, так і полісахариди.

Більшість мікроорганізмів здатні утилізувати моносахариди, причому гексози значно легше засвоюються, ніж пентози. З гексоз найлегше утилізується глюкоза, а галактоза засвоюється не всіма мікроорганізмами. З пентоз найкраще засвоюється ксилоза.

Головними шляхами перетворення моносахаридів є пентозофосфатний шлях, гліколіз, а також шлях Ентнера – Дудорова.

Полі- і олігосахариди розщеплюються такими мікроорганізмами, які мають відповідні для цього гідролітичні ферменти.

Амілазу, яка має здатність каталізувати розщеплення крохмалю, синтезують більшість бактерій і грибів.

В аеробних умовах целюлоза та геміцелюлози розщеплюються саме бактеріями і грибами. Основна роль серед бактерій належить ковзаючим бактеріям, які переміщаються через нерівномірне виділення слизу поверхнею клітин. Ними є представники родів *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Sorangium*, *Sporocytophaga*, міксобактерії тощо. Одні з них продукують в навколишнє середовище целюлази, а інші виконують розщеплення целюлози лише в особистому контакті з нею. Ефективно розкладають клітковину гриби *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Fusarium spp.*, при цьому виділяючи в навколишнє середовище ферменти.

Активніше розщеплюються геміцелюлози, ніж целюлоза. Мікроорганізми, які руйнують целюлозу, мають місце на очисних спорудах деревообробних та целюлозно-паперових підприємств.

Пектинові речовини розщеплюються бактеріями, які можуть утворювати пектиназу: *Clostridium felsineum*, *Bacillus polymyxa* тощо.

Катаболізм жирів. Багато мікроорганізмів мають здатність розщеплювати жири. Жири, під впливом ліпаз, гідролізуються до гліцерину, а також жирних кислот. Далі гліцерин окислюється до піровиноградної кислоти і поступає до циклу Кребса. Жирні кислоти піддають β-окисленню з поступовим відщепленням двохвуглеводного фрагмента – ацетил-CoA. Постійно наявним в активному мулі є активний мінералізатор жирів *Pseudomonas fluorescens*. Окрім цього, в

розкладанні жирів беруть участь *Achromobacter lipolyticum*, *Pseudomonas liguefaciens*, *Bacillus fluorescens*, а також інші гриби і бактерії.

Катаболізм вуглеводнів. Зазвичай розкладання аліфатичних вуглеводнів бере початок з окислення кінцевої метильної групи у так звану первинну спиртову, і проходить лише за наявності молекулярного кисню. Для реалізації даної стадії мікроорганізмам необхідно мати ферменти оксигенази. Потім спирти окислюються до жирних кислот.

А от метан окислюється особливою групою мікроорганізмів, які не застосовують інші органічні сполуки, окрім метанолу. Їх представниками є роди *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylococcus*.

Етан, бутан, пропан окислюються легше метану, а найважче окислюються алкани з кількістю вуглецевих атомів від 5 до 10. За тим як подовжується ланцюг зростає й кількість мікроорганізмів, які можуть засвоювати відповідне з'єднання: це бактерії *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, а також дріжджі роду *Candida*. Також, у багатьох випадках, доступні мікроорганізмам розгалужені похідні аліфатичних вуглеводнів. В процесі заміщення атомів водню метильних груп суттєве має значення кількість даних груп, а також їх розміщення у ланцюгу. Алкани з парною кількістю заступників розкладаються дещо гірше, ніж з непарною. А заміщення водню групою довшою, за метильну значно підвищує витримку до мікробіологічного впливу.

Значна кількість ароматичних сполук, які на першому етапі можуть перетворюватися в катехол або ж протокатехову кислоту, слугує субстратом для подальших реакцій окисного розщеплення. Ферменти, які мають здатність каталізувати розщеплення ароматичного кільця, є індукцібельними, іншими словами синтезуються клітиною тільки в процесі зростання на середовищах з ароматичними сполуками. Водночас

поліциклічні ароматичні сполуки (фенантрен, антрацен, нафталін) є не такими токсичними і підпадають під вплив більшої кількості мікроорганізмів, ніж моноароматичні. Окисляти ж ароматичні вуглеводні можуть представники родів *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Penicillium*, *Aspergillus* тощо.

До фенолзаміщених аліфатичних вуглеводнів відносять більшість пестицидів і детергентів. Деякі з них можуть застосовуватися штамами мікобактерій, мікрококів псевдомонад, а інші – досить стійкі до мікробіологічного впливу, у ґрунті та воді можуть зберігатися протягом багатьох років. Важко піддаються біологічному окисленню й ароматичні сполуки, які містять у кільці нітрогрупи і галогени.

Лігнін – сама стійка частина рослинної тканини. Він розкладається чистими культурами мікроорганізмів дуже повільно, це може тривати декілька місяців, а може й років. Значно швидше споживають лігнін консорціями мікроорганізмів. Відомо, що в аеротенках, які очищають стічні води від виробництва деревно-волокнистих плит, розклад лігніну завершується через 3-5 діб.

Перетворення сполук азоту.

Амоніфікація. Білки розщеплюються протеазами на певні пептидні ланцюжки різної довжини, а також окремі амінокислоти. Так, низькомолекулярні пептиди й амінокислоти мають здатність легко піддаватися окислювальному або ж гідролітичному дезамінуванню під впливом окси- або ж дегідрогеназ. Серед більш активних амоніфікаторів вважаються *Proteus vulgaris*, різні види *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*.

Нуклеїнові кислоти застосовуються дещо меншою кількістю видів бактерій, ніж білки (*Nocardia*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*). Окислення розпочинається з їхнього розщеплення під впливом нуклеаз на окремі нуклеотиди, які

далі через проміжне утворення сечовини, а також органічних кислот мінералізуються до діоксиду вуглецю, аміаку та води.

Сечовина розкладається грибами і бактеріями, що мають фермент уреазу. Особливі уробактерії *Sarcina urea* і *Micrococcus urea* переносять високу лужність середовища, а також переробляють значну кількість сечовини. Сечова кислота гідролізується до сечовини, а потім повністю мінералізується.

Споживання відновлених сполук азоту. Більша кількість мікроорганізмів можуть засвоювати відновлені форми азоту: солі амонію та аміак.

Під час асиміляційного процесу такий азот приєднується до складу аміногруп амінокислот, а потім – і в інші азотовмісні сполуки клітини.

А до дисиміляційного процесу (нітрифікації) мають здатність лише деякі мікроорганізми – нітріфікатори. Першою групою нітрифікаторів (*Nitrosospira*, *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus*, *Nitrosococcus*) окисляється аміак до нітритів, другою (*Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*) – нітрити до нітратів. Перша стадія (окислення аміаку) лімітує загальну швидкість реакції.

Більша частина нітрифікуючих бактерій – це облигатні автотрофи, зростання яких пригнічується за наявності органічних речовин. Деякі нітрифікатори можуть засвоювати органічні сполуки, але через надто низьку швидкість зростання вони не мають змоги конкурувати із гетеротрофами за кисень і субстрат. Тому, поки наявні органічні речовини у стічній воді, аміак асимілюється гетеротрофами в самих процесах конструктивного обміну. Вже після того як органічні речовини мінералізуються, формуються сприятливі умови для роботи першої групи нітрифікаторів. При цьому надлишок аміаку заважає розвитку представників другої групи, який настає лише після закінчення окислення надлишку аміаку.

Цей аспект дозволяє застосовувати нітрифікуючі бактерії як індикатори процесу очищення. Їх наявність у воді, яка очищується, вказує на мінералізацію більшої частини органічних речовин.

Нітрифікатори є досить чутливими до умов навколишнього середовища: значення рН, температури, концентрації кисню, а також присутності токсичних речовин. Нітрифікуючі бактерії, як і всі інші види, досить погано переносять перепади температури. Для них оптимальне значення рН коливається у вузькому інтервалі: біля 8-9. Вплив рН, можливо, пов'язаний з інгібуючою дією субстратів, у зв'язку з тим, що недисоційований аміак, а також азотиста кислота мають здатність пригнічувати окислення як аміаку, так і нітриту. Нітрифікатори є більш чутливими до нестачі кисню, ніж гетеротрофні мікроорганізми. Процес, високими концентраціями кисню, не інгібується, та має здатність протікати і під час застосування чистого кисню. Зазвичай, нітрифікуючі бактерії не досить чутливі до впливу токсичних речовин, ніж всі інші мікроорганізми активного мулу, проте існує думка щодо підвищеної їх чутливості.

Нітратредукція. В процесі асиміляційної нітратредукції нітрати і нітрити відновлюються до амонійного азоту, який наявний у складі амінокислот. Цей процес здійснюють більшість бактерій, водорості та деякі гриби.

Під час дисиміляційного відновлення, нітрат поетапно перетворюється у нітрит, потім в оксид азоту (II), далі в оксид азоту (I) і вкінці в молекулярний азот. Основна кількість денітрифікуючих бактерій є факультативними анаеробами. Ними є бактерії родів *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Spirillum*, *Paracoccus*, *Thiobacillus*, *Alcaligenes*. За достатнього обсягу кисню у середовищі, вони можуть окислювати органічні сполуки як прості аероби, а при нестачі кисню як акцептори електронів застосовують нітрати та нітрити. При цьому окислюватися можуть органічні кислоти, вуглеводи, спирти,

амінокислоти тощо. У випадку, коли доступних з'єднань денітрифікаторам замало, вони мінералізуються до води і діоксиду вуглецю, в другому випадку – можуть накопичуватися продукти неповного окислення. Навіть при активній аерації, в аеротенках постійно є зони з недостатнім вмістом кисню, тут має місце денітрифікація. Водночас в очищеній воді нітрати та нітрити містяться у концентраціях, які заважають випусканню води у водойму. Сьогодні більшого поширення набуває відновлювання нітратів та нітритів у спеціальних спорудах, де створюються відповідні умови для денітрифікації.

Фіксація молекулярного азоту. Молекулярний азот можуть засвоювати симбіотичні бактерії *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, вільнопроживаючі *Azotobacter*, *Clostridium*, ціанобактерії, а також деякі інші. Бактерії *Azotobacter* наявні у водоймах, мають здатність засвоювати важкоокисні з'єднання, водночас збагачуючи середовище вітамінами і азотом. Були спроби їх застосування для очищення стічних вод гідролізного і нафтопереробного виробництва, проте через їх невисоку швидкість зростання, вони видаляються іншими мікроорганізмами з очисних споруд.

Перетворення сполук сірки.

У стічних водах окремих підприємств (целюлозно-паперових здебільшого) містяться відновлені сполуки сірки: меркаптани, сірководень, диметилсульфід тощо. В аеротенках окислювати дані сполуки мають здатність сіркобактерії і тіонові бактерії.

Велика кількість тіонових бактерій можуть окислювати відновлені сполуки сірки до сульфатів, застосовуючи молекулярний кисень. Це бактерії *Sulfolobus*, *Thiomicrospira*, *Thiobacillus*. В аеробних умовах факультативні анаероби *Thiobacillus denitrificans* використовують кисень, а якщо його немає – кисень нітратів, відновлюючи при цьому їх до молекулярного азоту. Одні тіонові бактерії – облігатні

хемоавтотрофи (*T. Thioparus*, *Thiobacillus denitrificans*), а інші (*Sulfolobus*) можуть застосовувати органічні сполуки у якості джерела вуглецю та енергії.

Групу сіркобактерій (*Leucothrix*, *Thiothrix*, *Beggiatoa*) об'єднує така властивість як відкладання крапель сірки всередині клітин або ж на їх поверхні, що є показником ступеня очищення води. Так, сіркобактерії є постійними жителями очисних споруд.

15.4. Технологічна схема механобіологічного очищення міських стічних вод

Складною техніко-економічною задачею є розробка технологічної схеми очищення стічних вод.

На вибір способів очищення, а також визначення складу споруд впливають ряд чинників:

- витрата і вміст забруднень стічних вод;
- потрібний рівень очищення, який визначають обсягом води, що скидається, а також потужністю водойми;
- характер ґрунтів, рельєф місцевості, енергетичні витрати тощо.

У процесі формування технологічної схеми мають бути вирішені такі *завдання*:

- 1) максимально видалити забруднюючі речовини до рівня, який відповідає умовам повторного застосування води для технологічних потреб;
- 2) звести до мінімуму негативний вплив очисних споруд на навколишнє середовище;
- 3) забезпечити максимальну ефективність застосування головних фондів очисних споруд.

У селищах міського типу, місце розташування яких на багатоводних річках, при витраті стічних вод до 10 тис. м³/добу необхідна ефективність досягається лише спорудами механічного очищення.

У випадку витрат стічних вод 10-20 тис. м³/добу після споруд механічного очищення застосовують біофільтри, від 50 тис. до 2-3 млн. м³/добу – вже аеротенки.

Тоді, коли дані споруди біологічного очищення не можуть забезпечити необхідний ступінь очищення стічних вод, використовують глибоке очищення (доочищення).

Після завершення механобіологічного очищення міських стічних вод проводиться їхнє знезараження.

Загальну схему міської очисної станції з біологічним очищенням стічних вод в аеротенках зображено на Рис. 15.36.

Стічні води поступають у приймальну камеру 1, призначення якої – гасіння швидкості потоку рідини, а також сполучення трубопроводів із відкритим лотком. Проводиться механічне очищення стічних вод на решітках 2, у пісковловлювачі 3, а також первинних відстійниках 4.

Освітлена стічна вода у первинних відстійниках надходить до аеротенку 5. Повітря, в аеротенк, подається повітродувками, які встановлені в машинному приміщенні. В аеротенках відбувається сорбція й окислення забруднень, а також спостерігається приріст активного мулу. Мулова суміш з аеротенків спрямовується у вторинні відстійники 6, там осідає активний мул, а головна його маса повертається до аеротенка (циркуляційний активний мул).

Очищена стічна вода надходить у контактний резервуар 7 з метою знезараження і далі спрямовується у водойму.

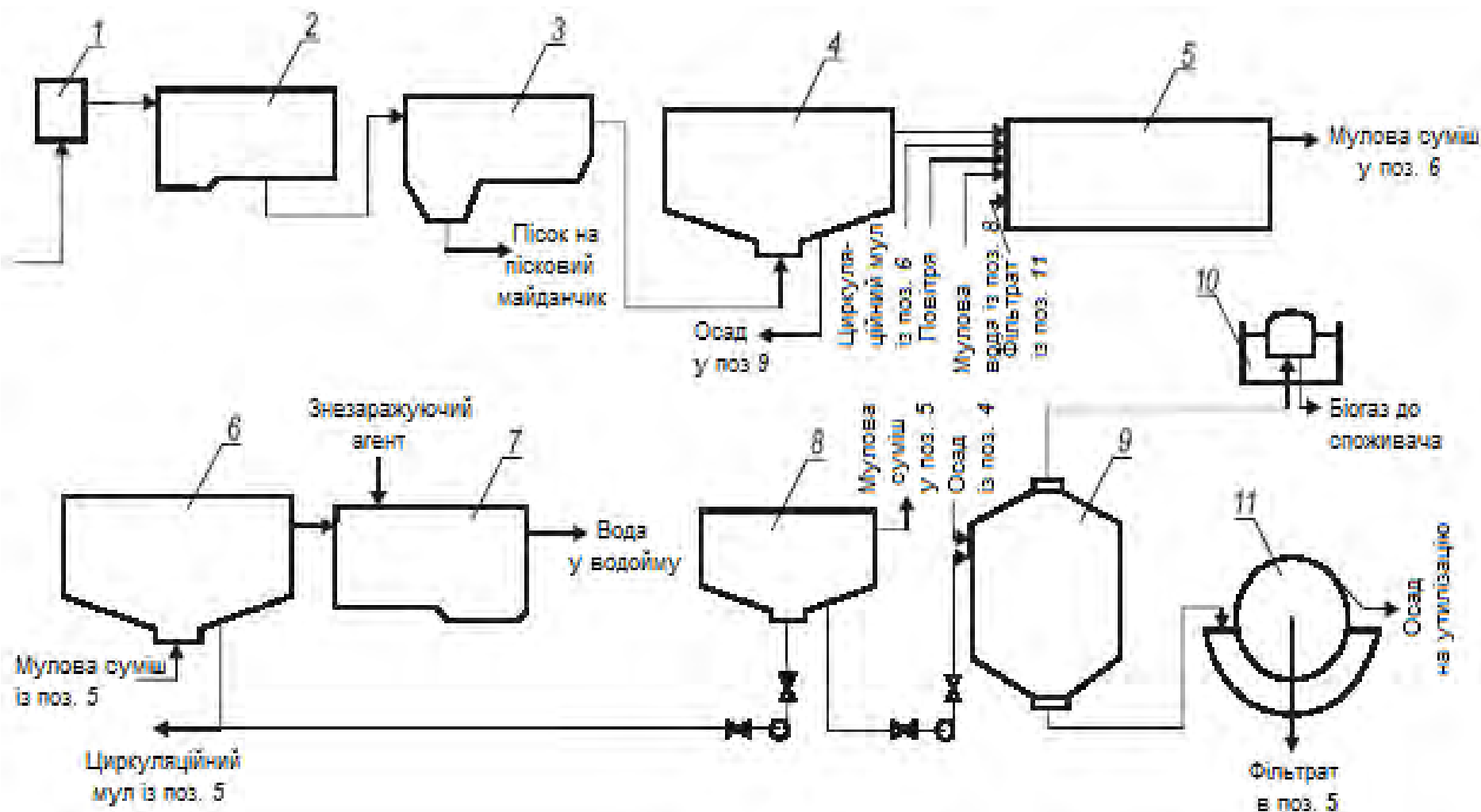


Рис. 15.36. Технологічна схема механобіологічного очищення міських стічних вод:

1 – приймальна камера; 2 – решітка-дробірка; 3 – пісковловлювач; 4 – первинний відстійник; 5 – аеротенк; 6 – вторинний відстійник; 7 – контактна камера; 8 – мулоущільнювач; 9 – метантенк; 10 – газгольдер; 11 – вакуум-фільтр

В мулоущільнювачі 8 ущільнюється надлишковий активний мул, а потім поступає для зброджування в метантенк 9. До нього ж надходить осад із первинних відстійників. Утворений під час бродіння біогаз накопичується у газгольдері 10, а осад зневоднюється на вакуум-фільтрі 11 й далі спрямовується на утилізацію. Фільтрат з вакуум-фільтра та мулова вода з мулоущільнювача подаються в аеротенки для очищення.

15.5. Особливості очищення виробничих стічних вод

Як вже зазначалося, специфікою виробничих стічних вод є складний та непостійний склад, можлива наявність токсичних компонентів, а також нестабільність основних параметрів: значення рН, температури, витрат. Все це дестабілізує технологічний режим діяльності очисних споруд, заважає адаптації активного мулу до самих забруднюючих речовин. В даному випадку варто використовувати технологічну схему очисних споруд із наперед усередненням стічних вод. Маса усереднювача розраховується з метою вирівнювання концентрації забруднюючих речовин, а також регулювання витрати стічної води.

З метою інтенсифікації осадження зважених речовин у первинних відстійниках, а також насичення стічної води киснем проводиться попередня аерація. За попередніх аераторів застосовують водопровідні канали або ж спеціальні ємності – преаератори. Результативність попередньої аерації може підвищуватися, в тому випадку, коли в преаератор надходить надлишковий активний мул, і краще регенерований. При цьому в преаераторах, крім фізико-хімічних процесів (сорбція, коагулювання, флокуляція), протікають біосорбція, а також окислення певної частини органічних речовин, які легко окисляються. Тривалість попередньої аерації – 10-20 хв.

У процесі надходження на споруди концентрованих стічних вод ($\text{БПК}_{\text{повн}} > 1000 \text{ мг О}_2/\text{дм}^3$) варто використовувати двоступеневе очищення. На першому ступені при цьому використовують аеротенк-змішувач, який має здатність швидко знімати більшу кількість забруднень. Завдяки швидкому розведенню стічної води зменшується негативний вплив на активний мул за присутності токсичних сполук в стоці. Другий ступінь передбачає встановлення аеротенка-витіснювача, який забезпечить високу глибину очищення. Внаслідок автоселекції на кожному із ступенів утворюється специфічна мікробіота. Мікроорганізми, в аеротенках першого ступеня, мають високу швидкість зростання та мають здатність споживати субстрат, який легко окисляється, а в аеротенках другого ступеня – виконують доокислення важкоокислювальних з'єднань.

Схему двоступеневого біологічного очищення концентрованих виробничих стічних вод зображено на Рис. 15.37.

Модифікації двоступеневого очищення можуть бути різні:

1. Відводиться надлишковий активний мул і першого і другого ступеня окремо. Так, активний мул першого ступеня високонавантажений, його приріст великий, а він потребує подальшої обробки. Другого ступеня – дуже мінералізований, тому має потребу лише у зневодненні.

2. Надлишковий активний мул другого ступеня спрямовують до аеротенка-змішувача першого ступеня. В даному випадку покращується окислювальна діяльність всієї системи загалом, проте збільшується загальна маса надлишкового активного мулу, який досить важко піддається обробці.

3. Надлишковий активний мул першого ступеня направляється в аеротенк другого ступеня, в якому відбувається його мінералізація, а це означає, що знижуються витрати на обробку. Проте через те, що мул другого ступеня

забруднений мулом першого ступеня, зменшуються його адаптаційні здатності й глибина очищення.

Спільним недоліком багатоступеневих схем є потреба в устаткуванні проміжних вторинних відстійників, а також пов'язаної з ними системи розподільчих лотків. Внаслідок цього збільшується загальний обсяг споруд, а також підвищуються гідравлічні втрати напору в процесі проходження рідини по спорудах, а це передбачає зростання витрат на перекачування циркуляційного мулу.

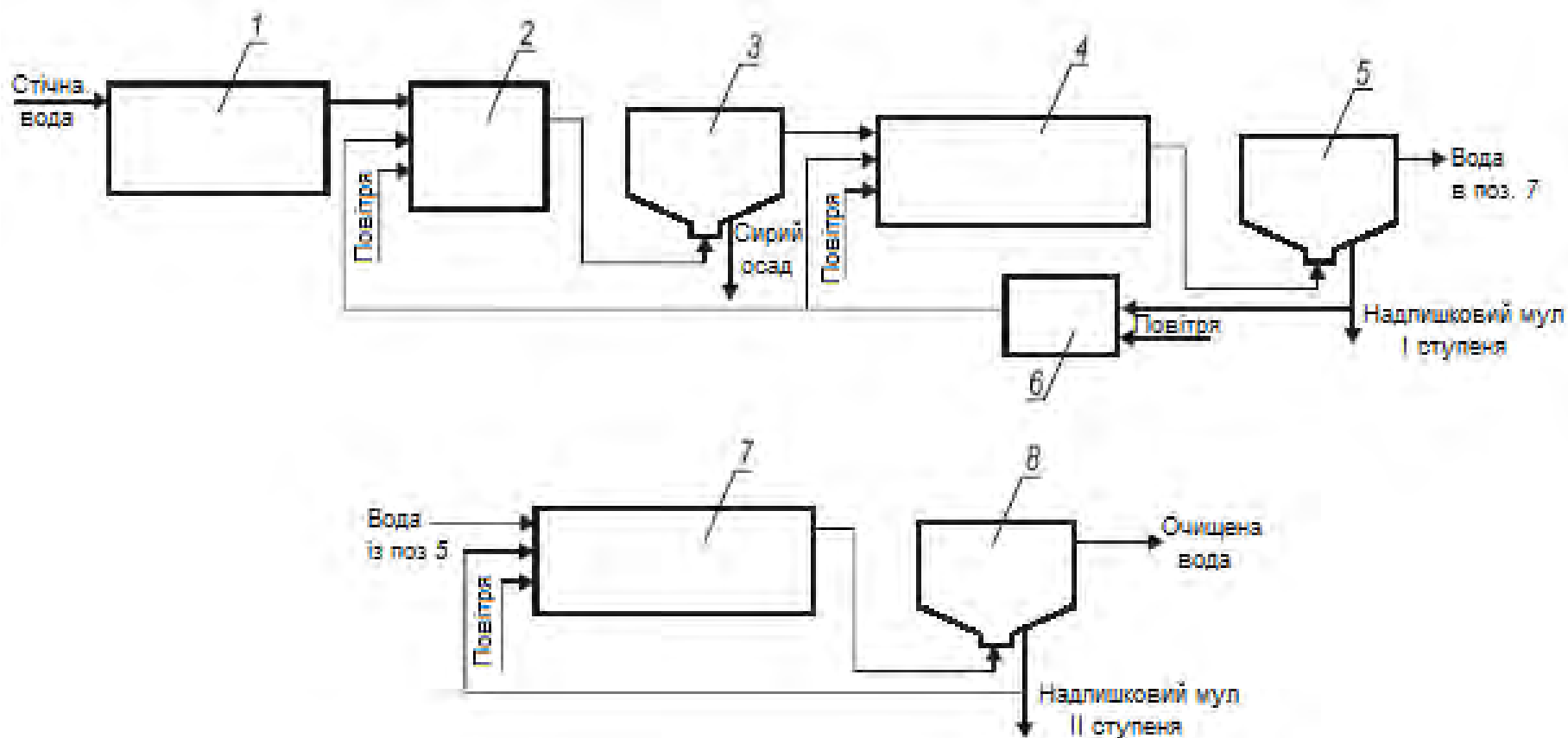


Рис. 15.37. Схема двоступеневої біологічної очистки концентрованих виробничих стічних вод:

1 – усереднювач; 2 – преаератор; 3 – первинний відстійник; 4 - аеротенк-змішувач; 5 – вторинний відстійник I ступеня; 6 – регенератор; 7 – аеротенк-витісняч; 8 – вторинний відстійник II ступеня

15.6. Очищення стічних вод із застосуванням кисню

Суттєвий вплив на потужність біохімічних процесів у аеротенках має концентрація розчиненого кисню. Разом з тим кисень досить погано розчиняється у воді, а при 20°C його розчинність складає біля 9 мг/дм³. За законом Генрі, розчинність прямо пропорційна парціальному тиску кисню у газовій фазі, а тому в аеротенках концентрація розчиненого кисню може бути завищеною до 10-12 мг/дм³ під час використання технічного кисню. В такому випадку доза мулу може триматися на рівні 8-12 г/дм³.

Біологічне очищення із використанням кисню досить активно розробляється в більшості розвинених країн світу. Аеротенки, в яких аерація мулової суміші реалізовується за допомогою кисню, називають оксітенками. З метою підвищення ефективності застосування кисню використовують герметичні конструкції оксітенків, а також передбачають циркуляцію газу через сам шар рідини.

Так, окислювальна потужність оксітенків у 5-10 разів є вищою, ніж у аеротенків, також у них менший приріст активного мулу, але при цьому активний мул має ефективніші седиментаційні властивості й легше зневоднюється.

Оксітенки можуть використовуватися як самостійні споруди, так і в якості першого ступеня в процесі багатоступінчастого біологічного очищення, коли БПК_{повн} стічної води значно вище 1000 мг O₂/дм³.

Важливий недолік оксітенків – необхідність одержання технічного кисню, а також пов'язані з ним витрати. Найдоцільним є застосування оксітенків у галузях, в яких є резерв кисню: виробництво синтетичного каучуку, чорна металургія, азотна промисловість тощо.

Економічна ефективність використання кисню зростає по мірі збільшення пропускної спроможності відповідних споруд.

Розрахунки вказують на те, що будівництво кисневих цехів є доцільним для станцій продуктивністю > 650 тис. м³/добу.

Очищення стічних вод у біофільтрах

Класифікація біофільтрів. Біофільтр – спорудження прямокутної або круглої форми, яке заповнене великою зернистою насадкою (завантаженням) 2, на якій розвиваються мікроорганізми, формуючи плівку (біоплівку) (рис. 15.38). Матеріал самого завантаження має бути витривалий до руйнування, і водночас нешкідливим для мікроорганізмів.

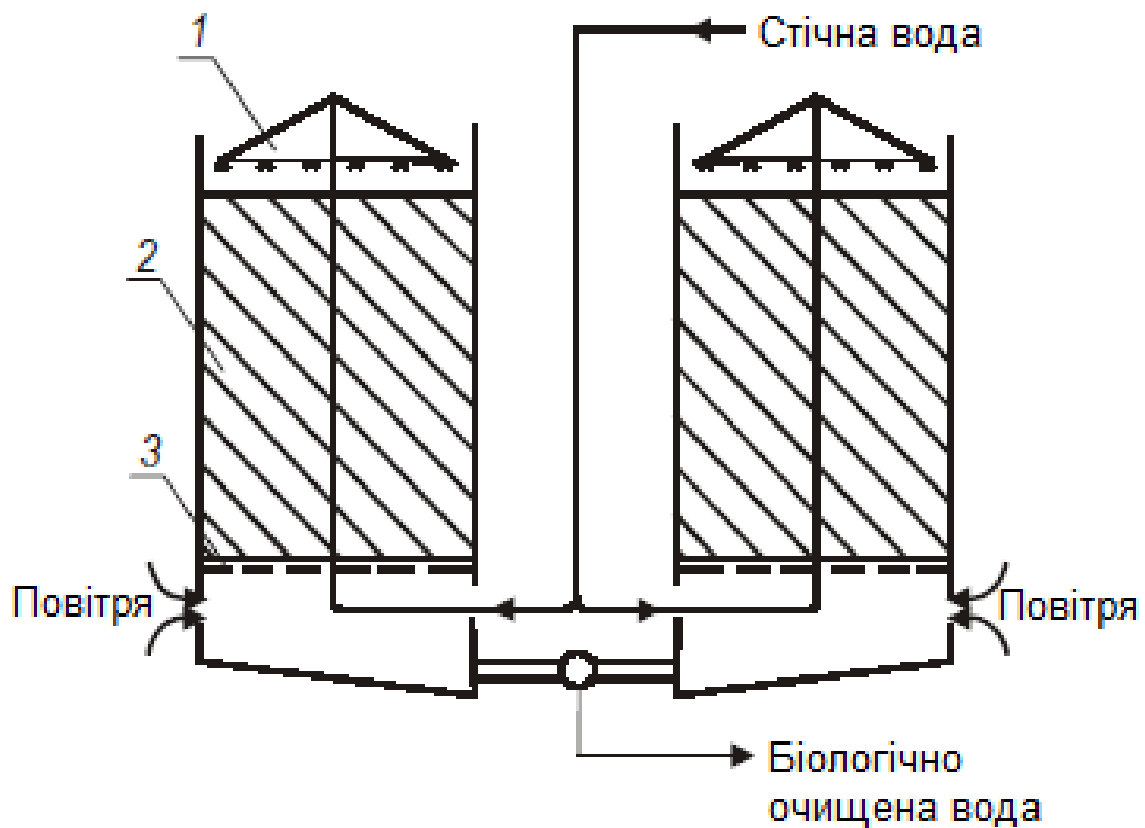


Рис. 15.38. Біофільтр для очищення стічної води:

1 – пристрій для розподілу стічної води; 2 – шар завантаження; 3 – дренажне дно

Водорозподільний пристрій 1 дбає про рівномірне зрошення поверхні завантаження біофільтра стічною водою, дренажний пристрій 3 забезпечує вилучення очищеної стічної води. Для аерації, знизу подається безперебійний потік повітря. Вентиляцію можна робити примусово, але як показує

практика, зазвичай різниці температур завантаження фільтра, навколишнього повітря та стічної води є достатніми, щоб забезпечити зміну повітря, а також задовільну аерацію води.

Під час контакту стічної води із біоплівкою, здійснюється поверхнею цієї біоплівки сорбція органічних забруднень, у період паузи між зрошеннями окислюються сорбовані забруднення, а також відновлюється сорбційна активність біоплівки. Далі у біофільтрі здійснюється безперервний приріст та відмирання біоплівки. Вже відмерла плівка виноситься разом із проточною водою, а далі осідає у вторинних відстійниках.

Біофільтри, в залежності від виду завантажувального матеріалу, можуть бути з об'ємним і площинним завантаженням.

За об'ємне завантаження використовують гальку, щебінь, керамзит, гравій та інші пористі матеріали, їх питома поверхня складає $50-80 \text{ м}^2/\text{м}^3$. Біофільтри, в залежності від масивності фракцій завантажувального матеріалу із об'ємним завантаженням підрозділяються на *види*:

- краплинні із розміром фракцій 20-30 мм, а також висотою шару завантаження 1-2 м;
- високонавантажувані, з масивністю завантажувального матеріалу 40-60 мм, а висоту шару завантаження 2-4 м;
- баштові з розміром завантажувального матеріалу 60-80 мм, а також висотою шару завантаження 8-16 м.

Вперше краплинні біофільтри з'явилися в 1893 р. у Великобританії. Стічна вода у таких біофільтрах подається у вигляді крапель або ж струменів. Краплинні біофільтри рекомендується використовувати при витраті стічних вод не більше $1000 \text{ м}^3/\text{добу}$, при цьому гідравлічне навантаження має становити $3 \text{ м}^3/(\text{м}^2 \cdot \text{добу})$. Недоліком цих біофільтрів є їхнє замулювання, тобто розростання біоплівки, у випадку, коли навантаження за органічними забрудненнями більше за допустиме.

Високонавантажувані біофільтри ж виникли на початку ХХ ст. Через великі фракції завантажувального матеріалу, у них навантаження за водою на декілька разів вище, ніж в крапельних біофільтрах та складає $10-30 \text{ м}^3/(\text{м}^2 \cdot \text{добу})$. Високонавантажуваним фільтрам не мають схильності до замулювання. Стічна вода, яка тече з високою швидкістю, весь час виносить і важкоокислювальні нерозчинні домішки і відмираючу біоплівку. У даних біофільтрах, на відміну від крапельних, ефективніші умови аерації, а також вища окислювальна потужність.

Для спорудження баштових біофільтрів потрібний відповідний сприятливий рельєф місцевості. Тому широкого поширення вони так і не одержали.

Біофільтри з площинним завантаженням поділяють на *види*:

1) із жорстким засипним завантаженням (металевим, пластмасовим, керамічним). В залежності від матеріалу щільність завантаження складає $100-600 \text{ кг/м}^3$, висота шару завантаження 1-6 м, пористість 70-90%;

2) із жорстким блоковим завантаженням (плоскі і гофровані листи або ж просторові елементи з пластмаси). Тут щільність завантаження становить $40-100 \text{ кг/м}^3$, висота шару завантаження 2-16 м, пористість 90-97%;

3) із м'яким або рулонним завантаженням (пластмасові плівки, металеві сітки, синтетичні тканини, які закріплюються на каркасах або ж укладаються у формі рулонів). Щільність цього завантаження $5-60 \text{ кг/м}^3$, висота шару завантаження 3-8 м, пористість 94-99%.

Завдяки високій пористості площинних завантажувальних матеріалів можна відмовитися від примусової вентиляції, а також заощадити значний обсяг електроенергії. Так, питома поверхня площинних завантажувальних матеріалів складає $80-450 \text{ м}^2/\text{м}^3$, що є значно вищою, ніж в об'ємних. Проте навіть за однакової

питомої поверхні, завдяки відсутності мертвих зон, які формуються під час зіткнення фракцій об'ємного завантажувального матеріалу, активна поверхня площинних завантажувальних матеріалів є значно більшою.

Окислювальна потужність біофільтрів складає 400-580 г БПК_{повн} / (м³·добу).

Формування біоплівки на поверхні завантаження.

поняттям «біоплівка» позначається слизовий матрикс на поверхні носія, який має у своєму складі здебільшого полісахариди, які тримають у рамках єдиної структури клітини мікроорганізмів. Так, на швидкість утворення біоплівки, міцність прикріплення мікроорганізмів, а також їхню активність у біоплівці впливає ряд *факторів*:

- *фактори середовища* (склад і концентрація забруднень, рН, гідродинамічний режим, температура). Концентрація органічних речовин має вплив на швидкість утворення біоплівки. Згідно досліджень, формування біоплівки здійснюється тим швидше, чим нижчою є концентрація забруднень у стічній воді, а також чим різноманітнішим є склад розчиненої частини даних забруднень. Сам склад органічної частини забруднень окреслює видовий склад мікроорганізмів, а також співвідношення між деякими групами. Залежно від того, який мінеральний склад стічної води, мають здатність змінюватися властивості поверхні насадки (як приклад, внаслідок адсорбції катіонів);

- *властивості матеріалу завантаження* (питома площа, структура поверхні, конфігурація і розміри пір, пористість та ін.). Заселення мікроорганізмів на пористих, шерехатих поверхнях здійснюється у декілька разів швидше, ніж на гладких, з яких ці мікроорганізми просто змиваються потоком рідини;

- *властивості мікроорганізмів* (поверхневі характеристики клітин – заряд, гідрофобність, здатність

продукувати полімери тощо). У свою чергу, властивості мікроорганізмів, визначаються факторами середовища.

Мікробіологічний склад біоплівки. Питанню вивчення складу біоплівки, на жаль, не приділялося належної уваги.

У біофільтрах, порівнянно з аеротенками, концентрація мікроорганізмів вище в понад 10 разів й складає від 10 до 60 г безпопільної речовини біомаси на 1 дм³.

В процесі культивування мікроорганізмів, ізольованих з біоплівки, в умовах аерації, у рідкому середовищі утворюються пластівці, які дещо нагадують активний мул. Ця обставина свідчить про ідентичність мікробіоти під час очищення стічної води ідентичного складу в аеротенках, а також у біофільтрі. Водночас згідно досліджень, біоценоз аеротенків й біофільтрів відзначається різним кількісним співвідношенням деяких груп мікроорганізмів. Обсяг анаеробних мікроорганізмів у біоплівці біофільтра набагато вищий, ніж в аеротенках й може становити до 25% від загальної кількості мікроорганізмів. У складі біоплівки може становити до 30% вміст грибів. Переважають гриби *Geotrichum*, *Fusarium*, *Sporotrichum*, *Trichoderma*, *Penicillium* тощо. Водночас можна спостерігати сезонні коливання складу біоплівки, наприклад, влітку домінують зооглейні скупчення бактерій, а в осінньо-зимовий період – гриби.

Доведено, що склад мікробіоти біоплівки суттєво змінюється залежно від глибини біофільтра. У верхній частині біофільтра, розвиваються бактерії, які утворюють зооглеї. Найбільші кількості і різноманітність мікроорганізмів можна виявити на глибині 0,25-0,50 м. Домінують тут бактерії, які окислюють органічні сполуки, а також нітрифікуючі бактерії. Вже глибше з'являються денітрифікатори, а далі на глибині більше 1 м загальна маса мікроорганізмів невелика, причому їх більша частина – анаероби. Також змінюється родовий склад грибів за висотою біоплівки, наприклад, *Fusarium* ліпше розвиваються у верхній частині, а *Geotrichum* – у глибині

біофільтра. Розвиватися грибам заважають підвищені концентрації іонів Zn^{2+} , тому рекомендується застосовувати розчини солей цинку для придушення дуже бурхливого розвитку грибів.

Застосування біофільтрів. Біофільтри застосовують з метою очищення стічних вод різних виробництв: нафтопереробної, хімічної, целюлозно-паперової, харчової промисловості тощо. На біофільтрах можна досягати повного біологічного очищення стічної води, але значення БПК_{повн} якої не перевищує 220 мг/дм³ для крапельних фільтрів і 300 мг/дм³ для високонавантажуваних.

Основними факторами стабільної діяльності біофільтра є рівномірне зрошення поверхні його стічною водою, а також необхідне надходження кисню повітря.

Водорозподільні пристрої бувають рухомими й нерухомими, проміжок між зрошеннями не має переважати 5-8 хв.

Обігрівання біофільтрів здійснюється стічною водою і за рахунок тепла, яке виділяється внаслідок окислення забруднень. Коли температура стічної води, яка надходить, в шарі завантаження біофільтра знижується нижче 10°C, є ймовірність порушення процесу нітрифікації, який відновити дуже складно. З метою попередження у зимовий період переохолодження біофільтрів використовують такі заходи: споруджують купольні перекриття над фільтрами, встановлюють протиповітряний захист, забезпечують рівномірний приток стічних вод.

Існує природна і штучна вентиляція. Штучна вентиляція зазвичай застосовується у високонавантажених біофільтрах (аерофільтрах). Штучну вентиляцію для всіх інших типів біофільтрів можуть використовувати лише для забезпечення всередині приміщення необхідного повітрообміну, в якому встановлений біофільтр, або ж для піддержання необхідної температури.

При збереженні продувки повітрям перерви в зрошенні аерофільтрів зазвичай супроводжуються підвищенням температури у тілі фільтра до 50-60°C, а також появою неприємного запаху, який пов'язаний із розкладанням відмираючої біоплівки.

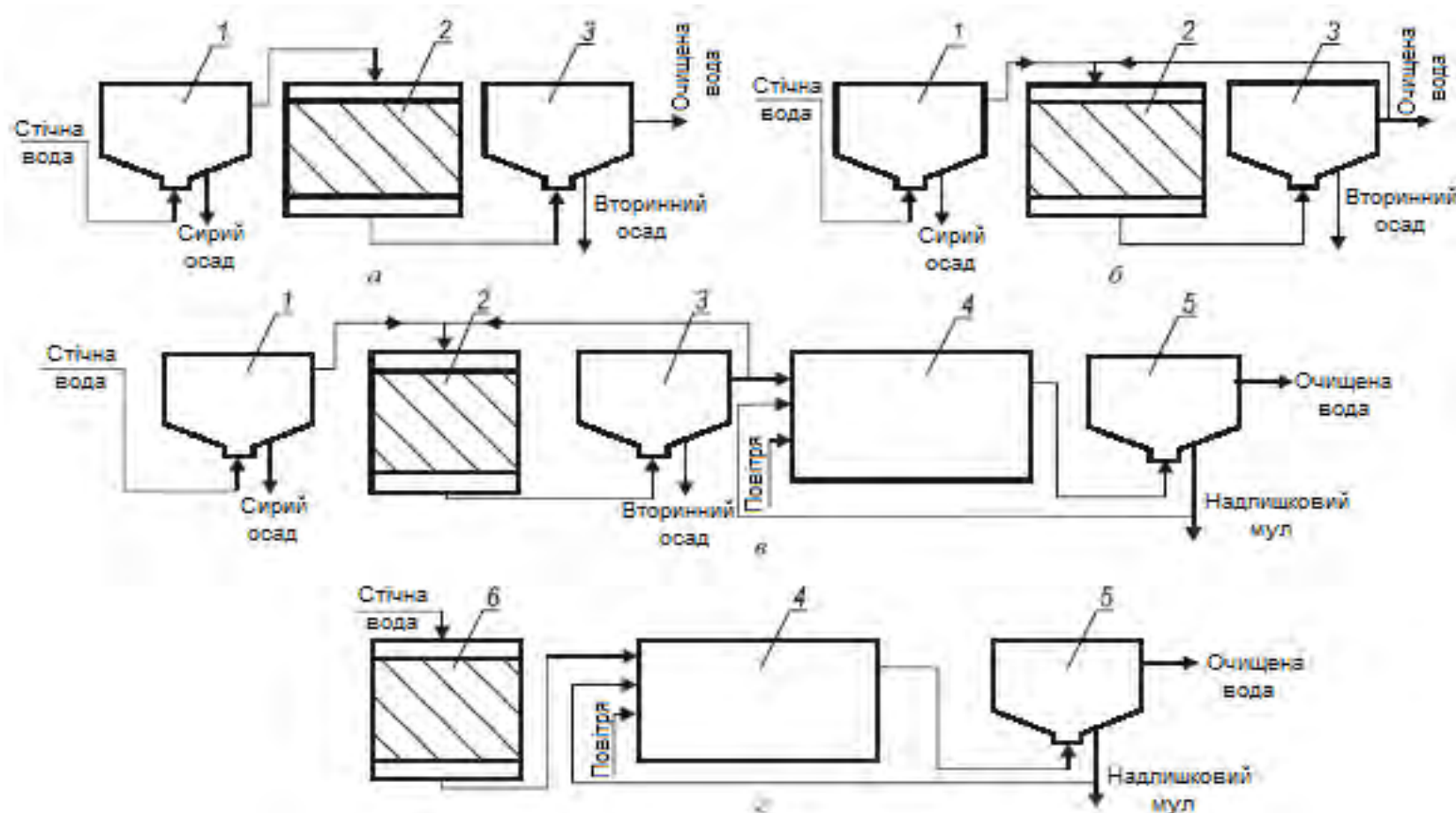
В залежності від рівня забрудненості стічних вод, а також типу біофільтрів й інших факторів можуть застосовуватися різні варіанти технологічних схем (мал. 39).

Звичайна технологічна схема очищення стічних вод способом біофільтрації складається із первинного відстійника для вилучення зважених часток, біофільтра й вторинного відстійника (рис. 15.39, а).

В процесі очищення більш забрудненішої води треба передбачати її рециркуляцію. А для цього необхідно відібрати частину біологічно очищеної стічної води після вторинного відстійника й змішати з потоком, який надходить на біофільтр (рис. 39, б). Разом з цим досягається розбавлення води, а також підвищується ефективність самого очищення. Водночас збільшується навантаження на відстійники та біофільтр, а також підвищуються енергетичні витрати на перекачування води.

Очищення стічних вод із високою концентрацією забруднень, які містять забруднення, що важко очищаються, буває двоступеневим. Тут на першому ступені застосовують біофільтр, а на другому буває як біофільтр, так й інша споруда біологічного очищення, наприклад, аеротенк (рис. 39, в).

В останні роки використовують одно- та двоступеневі схеми біологічного очищення із застосування на першому ступені біофільтрів з площинним завантаженням, на які подається стічна вода відразу після пісковловлювачів без первинного відстоювання (рис. 39, г).



а – одноступенева; б – одноступенева з рециркуляцією; в – двоступенева (I ступінь – біофільтр з об'ємним завантаженням; II ступінь – аеротенк); г – без первинного відстійника:

1 – первинний відстійник; 2 – біофільтр з об'ємним завантаженням; 3 – вторинний відстійник; 4 – аеротенк; 5 – третинний відстійник; 6 – біофільтр з плоским завантаженням

Рис. 15.39. Схеми очищення стічних вод у біофільтрах:

ЛІТЕРАТУРА

1. Андреюк Е.И., Иутинская Г.А., Дульгеров А.Н. Почвенные микроорганизмы и интенсивное землепользование. Киев: Наук. думка, 1988. 192 с.
2. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Яворська Г.В., Білінська І.С., Борсукевич Б.М. Практикум з мікробіології: підручник. Львів: ЛНУ ім. Франка, 2014. 436 с.
3. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Білінська І.С. Мікробіологія: практикум, тести. ЛНУ ім. Франка, 2009. 360 с.
4. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. М.:Академия, 2005. 608 с.
5. Руденко С.С., Костишин С.С., Морозова Т.В. Загальна екологія. Урбоекосистеми: навч. посіб. Чернівці: Книги ХХІ, 2008. 342 с.
6. Сеги Й. Методы почвенной микробиологии. М.:Мир, 1983. 296 с.
7. Теппер Е.З., Школьников В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Агропромиздат, 1987. 239 с.
8. Федак Л.І. Бактерії роду *Azotobacter* в антропогенно трансформованих ґрунтах зони лісостепу України // Агроекологічний журнал. – 2-8. – Спецвип. (червень). – С.240-242.
9. Трусов В.И., Гармашов Л.В. Структура микробного ценоза агрогенных почв и естественных экосистем // Плодородие. – 2011. - №1. - С. 34-35.
10. Иутинская Г.А., Патыка В.Ф. Биология почв: проблемы и перспективы// Агрохімія і ґрунтознавство: міжвідом. темат. збірник. – Х., 2010. – Спецвипуск, кн. 1. – С. 45-55.
11. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Сельскохозяйственная микробиология как основа устойчивого агропроизводства: фундаментальные и прикладные

- аспекты // Сельскохозяйственная биология. Сер. Биология растений. – 2011. - №3. – С.3-9.
12. Пухова Н.Ю., Верховцева Н.В., Ларина Г.Е. Структура микробного сообщества чернозема выщелоченного в зависимости от антропогенной нагрузки // Проблемы агрохимии и экологии. – 2011. - № 4. – С. 42-47.
13. [Habig J.](#), [Hassen A.I.](#), [Swart A.](#) Application of Microbiology in Conservation Agriculture. In book: [Conservation Agriculture](#) - Editors: M. Farooq, K.H.M. Siddique - Chapter: 19 Publisher: Springer International Publishing, Switzerland. 2015. - p. 525-557.
14. Курдиш І.К. Роль мікроорганізмів у відтворенні родючості ґрунтів // Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвід. темат. наук. зб. — Чернігів, 2009. — Вип. 9. — С. 7-32.
15. Yakovchenko V., Sikora L.J., Kaufman D.D. A biologically based indicator of soil quality // Biology and Fertility of Soils, 1996. - vol. 21, p. 245–251.
16. Волкогон В.В. Сільськогосподарська мікробіологія в Україні: здобутки, проблеми, перспективи Вісник аграрної науки 2018, №11. – С. 20-28.
17. Ашихмина Т.Я., Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Широких И.Г., Широких А.А., Фокина А.И., Скугорева С.Г., Горностаева Е.А., Соловьёва Е.С., Товстик Е.В., Огородникова С.Ю., Зыкова Ю.Н. Микроорганизмы как агенты биомониторинга и биоремедиации загрязненных почв, под общ. ред. Т.Я. Ашихминой, Л.И. Домрачевой. – Киров: Науч. изд-во ВятГУ, 2018. – 254 с.
18. Jianping Su, Yanqing Wu, Xiaojun Ma, Gaosen Zhang, Huyuan Feng, Yinghua Zhang Soil microbial counts and identification of culturable bacteria in an extreme by arid zone Folia Microbiol (Praha). 2004; 49(4):423-429.
19. Lee J., Kim H-S., Jo H.Y., Kwon M.J. (2021) Revisiting soil bacterial counting methods: Optimal soil storage and pretreatment methods and comparison of culture-dependent

and -independent methods. PLoS ONE 16(2): e0246142.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246142>.

20. Вознюк С. В. Порівняльний аналіз методів виділення ДНК з ґрунту для дослідження ризосферних мікробіоценозів / С. В. Вознюк, Л. В. Титова, Г. О. Іутинська // Мікробіологічний журнал. - 2014. - Т. 76, № 4. - С. 2-8.
21. Nielsen M.N., Winding A. Microorganisms as Indicators of Soil Health. 2002. - National Environmental Research Institute, Denmark. Technical Report No. 388, - p. 84.
22. Chennappa G., Udaykumar N., Vidya M., Nagaraja H., Amaresh Y.S., Sreenivasa M.Y. *Azotobacter* - A Natural Resource for Bioremediation of Toxic Pesticides in Soil Ecosystems New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering Microbial Biotechnology in Agro-Environmental Sustainability. Chapter 19 - 2019, P. 267-279.
23. Кондакова Г.В. Биоиндикация. Микробиологические показатели. ЯрГУ. 2007. 136 с.
24. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Сельскохозяйственная микробиология, 2018. 205 с.
25. Курдиш І.К. Вплив біогенних і абіогенних факторів на ефективність інтродукції мікроорганізмів в агроєкосистеми // Мікробіологія і біотехнологія.- 2009.- №1. – С. 22-33.
26. Козар С.Ф. Вплив комплексної бактеризації на продуктивність сої // Вісник аграрної науки. – 2,15. - № 5. – С. 49-52.
27. Волкогон В.В. Мікробіологічні аспекти оптимізації азотного удобрення сільськогосподарських культур / К.:Аграр. Наука: 2007. 144 с.
28. Лукашук В.П. Роль біологічного азоту в сучасному землеробстві // Роль біологічного землеробства у виробництві конкурентоспроможної

сільськогосподарської продукції: матеріали наук.-практ. конф. Молодих учених і спец., Чабани, 8-9 грудня 2008 р. С. 18-20,

29. Козар С.Ф. Оптимізація середовища для сумісного культивування *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2014. – Вип. 19. – С. 27-32.
30. Патыка В.Ф., Наумов Г.Ф., Подоба Л.В., Николаенко А.Н., Поташева Л.Н., Ельникова В.А., Гриник И.В. Агроэкологическая роль азотфиксирующих микроорганизмов в аллелопатии высших растений/ Под ред. акад УААН В.Ф. Патыки, Киев, 2004. – 318 с.
31. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник 2-е вид., доп. і перероб. К.: НУХТ, 2010. 632 с.
32. Патики В.П., Мельничук Т.М., Шерстобоев М.К., Татарин Л.М., Зубачев С.Р., Калініченко А.В., Халимоник С.П., Шкатула Ю.М., Кириленко Л.В., Пархоменко Т.Ю., Каменєва І.О. Біотехнологія ризосфери овочевих рослин/ за ред. В.П. Патики. Вінниця «ПП «ТД Едельвейс і К» - 2015. – 266 с.
33. Compant S., Duffy B., Nowak J., Cle´ment C., Barka E.A. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects \ App. and envir. microb., Sept. 2005, Vol. 71, No. 9. - p. 4951–4959.
34. Bhattacharyya P.N., Jha D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture World J Microbiol Biotechnol (2012) 28, - p.1327–1350.
35. Souza R. de, Ambrosini A., Passaglia L.M.P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils / Genetics and Molecular Biology, 38, 4, (2015), P. 401-419.
36. Bernard R. Glick Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications Volume 2012, Article ID 963401, 15 pages. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>

37. Bashan Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture \ Biotechnology Advances, 1998. - Vol. 16, No. 4, pp. 729-770.
38. Bhardwaj D., Ansari M.W., Sahoo R.K., Tuteja N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity Bhardwaj et al. Microbial Cell Factories 2014, 13:66.
<http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/66>
39. Passricha I.N., Saifi S.K., KSikka V., Tuteja N. Multilegume biofertilizer: a dream Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture 2020, P. 35-45.
40. Maćik M., Gryta A., Frąc M. Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms Advances in Agronomy Volume 162, 2020, P. 31-87.
41. Parray J.A., Shameem N. Molecular mechanism of plant-microbe interactions Sustainable Agriculture Advances in Plant Metabolome and Microbiome 2020, - P. 85-136.
42. Flores-Félix J.D., Menéndez E., Rivas R., Velázquez Ma de la E. Future Perspective in Organic Farming Fertilization: Management and Product Organic Farming Global Perspectives and Methods Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, - 2019, P. 269-315.
43. Мельничук М.Д. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник / М.Д. Мельничук, О.Л. Кляченко, В.В. Бородай, Ю.В. Коломієць. Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. 252 с.
44. Кириченко О.В. Нітрогеназна активність соєоризобіальних симбіозів за комплексної інокуляції насіння / О. В. Кириченко // Мікробіологічний журнал. - 2018. - Т. 80, № 6. - С. 79-93. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/MicroBiol_2018_80_6_8

45. Pathak R., Singh S.K., Gehlot P. Diversity, nitrogen fixation, and biotechnology of rhizobia from aridzone plants. In Rhizobium biology and biotechnology, Cham, Switzerland: Springer (2017). – P. 61–81.
46. Alemneh, A.A., Zhou, Y., Ryder, M.H., Denton, M.D. Mechanisms in plant growth-promoting rhizobacteria that enhance legume – rhizobial symbioses. J. Appl. Microbiol. 129, - (2020). – P. 1133–1156.
<https://doi.org/10.1111/jam.14754>.
47. Andrews, M.E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. International Journal of Molecular Sciences. Vol.18, №4, (2017). - P. 705-711.
48. Jaiswal, S.K, Mohammed M., Ibny F.Y., land Dakora F.D. (2021). Rhizobia as a Source of Plant Growth-Promoting Molecules: Potential Applications and Possible Operational Mechanisms. Front. Sustain. Food Syst. 4:619676.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.619676>.
49. Глянько А.К. Бобово-ризобіальний симбіоз: деякі сучасні знання / А.К. Глянько, А.А. Іщенко, Н.В. Філінова // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія : Біологія. - 2017. - Вип. 3. - С. 6-22. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vkhnau_biol_2017_3_3.
50. Гурьев Г.П. Влияние препаратов клубеньковых бактерий и комплексного микробного удобрения (КМУ) на симбиотическую азотфиксацию и урожай гороха / Г.П. Гурьев // Научно–производственный журнал «Зернобобовые и крупяные культуры». – No1(21). – 2017. – С. 15-18.
51. Shaikh S.S., Sayyed R. Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Their Formulation in Biocontrol of Plant Diseases / Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets. – 2015. – P. 337-351.

52. Laslo É., György É., Mara G., Tamás É., Ábrahám B., Lányi S. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants / *Crop Protection* 40 (2012) P. 43-48.
53. Raaijmakers J.M., Paulitz T.C., Steinberg C., Alabouvette C., Moënne-Loccoz Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms // *Plant and Soil*. - vol. 321, 2009. - p. 341–361.
54. Whipps J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // *Journal of Experimental Botany*, Vol. 52, Roots Special Issue, - 2001. - p. 487-511.
55. Goldman E., Green L. Практичний довідник з мікробіології (2-е изд.). 2008. CRC Press.
56. Гадзало Я.М., Патика М.В., Заришняк А.С., Патика Т.І. Агроекологічна інженерія в біоконтролі ризосфери рослин та формуванні здоров'я ґрунту *Мікробіол. журн.*, 2017, Т. 79, № 4, с.88-109.
57. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Яворська Г.В., Білінська І.С., Борсукевич Б.М. Практикум з мікробіології: підручник. Львів: ЛНУ ім. Франка, 2014. 436 с.
58. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Білінська І.С. Мікробіологія: практикум, тести. ЛНУ ім. Франка, 2009. 360 с.
59. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.
60. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник 2-е вид., доп. і перероб. К.: НУХТ, 2010. 632 с.
61. Шевелуха В. С. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник /
62. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин Е.С. и др. – М.: Высш. шк., 2003. – 469 с.
63. Бірюков В.В. Основи промислової біотехнології / В.В. Бірюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с.

64. Бекер М.Е. Биотехнология / М.Е. Бекер, Г.К. Лиепиньш, Е.П. Райпулис. – М.: Агропромиздат, 1990. – 334 с.
65. Алмагамбетов К. Х. Биотехнология микроорганизмов / К. Х. Алмагамбетов. Астана, 2008. 244 с.
66. Безбородов А. М. Биотехнология продуктов микробного синтеза: Ферментативный катализ, как альтернатива органического синтеза / А.М. Безбородов. М. : Агропромиздат, 1991. 238 с.
67. Биотехнология сельскохозяйственных растений. М.: Агропромиздат, 1987.
68. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии: Учеб. Пособие для вузов. М.: Колосс, 2004. 296 с.
69. Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під общ. ред. В.Г. Герасименка. К.: Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.
70. Бондар І.В. Промислова мікробіологія. Харчова і агробіотехнологія / І. В. Бондар, В.М. Гуляєв. Дніпропетровськ.: В-во ДДТУ, 2004. 280 с.
71. Буценко Л. М. Біотехнологічні методи захисту рослин : конспект лекцій для студ. спец. 8.05140105 «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» ден. та заоч. форм навчання / Л. М. Буценко. К.: НУХТ, 2013. 95 с.
72. Буценко Л. М. Технології біопрепаратів для ветеринарії і сільського господарства : конспект лекцій для студ. спец. 7.05140101 «Промислова біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / Л. М. Буценко, А. Д. Конон. К.: НУХТ, 2014. 106 с.
73. Варфоломеев С.Д., Калюжный С.В. Биотехнология: Кинетические основы микробиологических процессов. М.: Высш. шк., 1990. 296 с.
74. Глазко В.И., Глазко Г.В. Русско-англо-украинский толковый словарь по прикладной генетике, ДНК-технологии и биоинформатике. К.: Нора-принт, 2000. 464 с.

- 75.Голубовская Э.К. Биологические основы очистки воды. М.:Высш. шк., 1978. 271 с.
- 76.Гончаренко Г.Г. Основы генетической инженерии. Мн.: Высшая школа, 2005.
- 77.Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат, 1987. 335 с.
- 78.Гриневич А. Г., Босенко А. М. Техническая микробиология. Мн.: Высшая школа, 1986.
- 79.Егорова Т.А. Основы биотехнологии: учеб. пособие. М.: Изд. центр «Академия», 2006. 208 с.
- 80.Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии: Учеб. Пособие для высш. пед. учеб. заведений. М.: Издательский центр "Академия", 2003.
- 81.Ждан-Пушкина С.М. Основы роста культур микроорганизмов. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1983. 188 с.
- 82.Загоскина Н.В. Биотехнология: теория и практика. М.: Оникс, 2009. 496 с.
- 83.Картель Н.А. Биоинженерия: методы и возможности. Мн.:Ураджай, 1989. 143 с.
- 84.Курта С.А., Лучкевич Є.Р., Матківський М.П. Хімія органічних сполук. Підручник для вищих навчальних закладів. Івано-Франківськ: Прик. нац. ун-т ім. В. Стефаника, 2013. 599 с.
- 85.Манаков М.Н., Победимский Д.Г. Теоретические основы микробиологических производств. М.: Агропромиздат, 1990. 272 с.
- 86.Мельничук М.Д. Біотехнологія рослин: Підручник / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. К.: Поліграфконсалтинг, 2003. 520 с.
- 87.Мельничук М.Д., Новак Т.В., Левенко Б.О. Основи біотехнології рослин: Підручник. К.: Вища шк., 2000 . 248 с.

88. Микробные ферментные препараты (технология и оборудование). К.А. Калунянц, Л.И. Голгер. М.: Пищевая промышленность, 1979. 303 с.
89. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов В.Б. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. 264 с.
90. Муромцев Г.С. Основы сельскохозяйственной биотехнологий / Г.С. Муромцев, Р.Г. Бутенко и др. М.: Наука, 1990. 520 с.
91. Пирог Т.П. Загальна біотехнологія: Підручник / Т.П. Пирог, О.А. Ігнатова. К.: НУХТ, 2008. 485 с.
92. Сазыкин Ю.О. Биотехнология: учеб. пособие. М.: Изд. центр «Академия», 2006. 256 с.
93. Сельскохозяйственная биотехнология / Под ред. В.С. Шевелухи. М.: Высшая школа, 1998. 416 с.
94. Сельскохозяйственная биотехнология : учебник / [В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. З. Кочиева и др.]. 3-е изд., перераб. и доп. М. : Высш.шк., 2008. 710 с.
95. Сельскохозяйственная биотехнология: Учебник / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.С. Воронин и др. М.: Высш. шк., 2003. 469 с.
96. Сидоров В.А. Біотехнологія рослин. К.: Наукова думка, 1990.
97. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новиков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування виробництв: Навч. посібник. У 3 ч. Ферментація. Львів: В-во Національного університету «Львівська політехніка», 2004. 240 с.
98. Экологическая биотехнология: Пер. с англ. / Под. ред. К.Ф.Форстера, Д.А.Дж. Вейза. Л.: Химия, 1990. 384 с.

- 99.Юлевич О.І. Біотехнологія : навчальний посібник / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль. Миколаїв : Миколаївський ДАУ, 2011. 380 с.
100. Griffiths A.J., Gelbart W.M., Miller J.H. et al. An introduction to genetic analysis. Freeman and company. New York. 2000. 730 p.
101. Hartwell L., Hood L., Goldberg M. et al. Genetics: from genes to genomes. McGraw Hill: Higher education. New York. 2004. 880 p.
102. Nicholl D. An introduction to genetic engineering. / Second edition –Cambridge University press. 2002. 292 p.

ДОДАТКИ

Мікроорганізми для ґрунту

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
1	Агрінос А	ТОВ «Агрінос Україна»	Azotobacter vinelandii та Clostridium pasteurianum	Біопрепарат для фіксації атмосферного азоту, мобілізації макро- та мікроелементів. Зернові, олійні, технічні, овочеві, плодово-ягідні, декоративні та інші культури.
2	АгроМар D	ПП «Агро- Адмірал»	Сапрофітні гриби роду Trichoderma, та бактерії роду Bacillus.	Прискорення розкладання рослинних решток, оздоровлення ґрунту, пригнічення ґрунтових патогенів, попередження деградації ґрунту.
3	Азогран	ТОВ «БІО ДОБРИВО»	Azotobacter vinelandii, Bacillus subtilis	Біопрепарат для фіксації атмосферного азоту, мобілізації макро- та мікроелементів.
4	Азогран	ПП «Агро- Адмірал»	Азотфіксуючі бактерії Azotobacter vinelandii та фосфат- мобілізуючі бактерії Bacillus subtilis	Зернові, зернобобові, технічні, овочеві, плодово-ягідні культури та декоративні рослини.
5	Азотер СЦ, рідкий концентрат мікро- організмів	ТзОВ «Азотер Україна»	Azotobacter chroococcum, Azospirillum brasiliense, Bacillus megatherium, Coniothyrium minitans.	Біодобрива з фунгіцидними властивостями. Для виращування всіх видів польових і плодкових культур.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
				Рекомендовано вносити під культури, що найбільше піддаються ураженню склеротинією (соняшник, ріпак озимий). Препарат вносять на поверхню ґрунту перед посівом та відразу ж загортають у ґрунт.
6	Азотер Ф	ТзОВ «Азотер Україна»	Azotobacter croococcum, Azospirillum brasiliense, Bacillus megatherium, Trichoderma sp.	Зернові, зернобобові, технічні, плодово-ягідні, овочеві культури та декоративні рослини.
7	Азотофіт-Т	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Азотфіксуючі бактерії Azotobacter chroococcum	Зернові, зернобобові, технічні, плодово-ягідні, овочеві культури та декоративні рослини.
8	Азотофіт-Р	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Азотфіксуючі бактерії Azotobacter chroococcum	Зернові, зернобобові, технічні, плодово-ягідні, овочеві культури та декоративні рослини.
9	Альбобактерин	Інститут с/г мікробіології та АПВ НААН	Achromobacter xylosoxidans 1122	Фосфатмобілізуючі бактерії. Препарат розчиняє важкодоступні фосфати ґрунту та стимулює ріст рослин.
10	Байкал ЭМ	ТОВ «КАРАВАН»	Живі культури молочнокислих бактерій (Lactobacillus casei 21, Lactococcus), фото- синтезуючих бактерій (Phodopseudomona s palustris 108), Saccharomices cerevisiae 76.	Для всіх с/г культур. Внесення позакореневе, кореневе, заробка до ґрунту та субстрату.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
11	БАЙКАЛ, мікродобриво	ФОП Рогачов В.В.	Консорціум ЕМ: <i>Rhodopseudomonas palustris</i> , <i>Rhodobacter spheroids</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Використовується для усіх видів с/г і садових культур при кореновому та позакореновому внесенню в ґрунт, а також для обприскування рослин. Обробка пожнивних залишків. Пригнічення патогенів в ґрунті.
12	БіоАг, мікро- біодобриво	ТОВ «Центр Ефективних технологій»	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Rhodopseudomonas palustris</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	ЕМ-препарат. Біодобриво для зернових, зернобобових, технічних, плодово-ягідних, овочевих культур, ефіро- олійних, кімнатних та декоративних рослин.
13	Біогран	Інститут с/г мікробіології та АПВ НААН	<i>Azospirillum brasilense</i> або консорціум <i>Azotobacter</i> .	Підвищення урожайності й покращення якості продукції картоплі та овочів.
14	Біозлак	ТОВ «Біонасервіс плюс» / ТОВ «Біонасервіс»	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Зернові-колосові.
15	Біокомплекс - БТУ бобові	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Raenibacillus polymyxa</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> .	Бобові культури (соє, горох, квасоля, нут, люцерна, чина, сочевиця тощо).

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
16	Біокомплекс - БТУ зернові	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Bacillus subtilis, Azotobacter chroococcum, Paenibacillus polymyxa, Enterococcus, Lactobacillus.	Зернові культури (пшениця, жито, ячмінь, овес, просо, кукурудза, гречка тощо).
17	Біокомплекс - БТУ овочеві	ПП «БТУ- Центр» / список д дистриб'юторів	Bacillus subtilis, Azotobacter chroococcum, Paenibacillus polymyxa, Enterococcus, Lactobacillus.	Овочеві культури (томати, баклажани, перець, капуста, огірки, кабачки, морква тощо).
18	Біокомплекс- БТУ плодово- ягідні	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Bacillus subtilis, Azotobacter chroococcum, Paenibacillus polymyxa, Enterococcus, Lactobacillus.	Плодово-ягідні культури (плодові дерева, ягідні кущі, виноград, суниця тощо).
19	Біокомплекс- БТУ технічні	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Bacillus subtilis, Azotobacter chroococcum, Paenibacillus polymyxa, Enterococcus, Lactobacillus.	Технічні культури (ріпак, соняшник, мак, гірчиця, льон, коноплі, буряк цукровий тощо).
20	Біокомплекс- БТУ універсальний (Живе добриво)	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Bacillus subtilis, Azotobacter chroococcum, Paenibacillus polymyxa, Enterococcus, Lactobacillus.	Зернові, бобові, технічні, плодово-ягідні, овочеві культури та декоративні рослини.
21	Біомаг, р.,гр.	ДП «Ензим» / список дистриб'юторів	Азотфіксуючі бактерії Azotobacter	Мікробіологічне азотне добриво для зернових, зернобобових, технічних, плодово-ягідних, овочевих культур та декор. рослин.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
22	Біонорма – Азот, р., гр.	ПП «НВП «ЕКО- ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	Azotobacter chroococcum eko/208, Azotobacter vinelandii eko/209, Azospirillum brasiliense eko/210, Azospirillum lipoferum eko/211.	Забезпечення азотним живленням зернових, зернобобових, олійних, технічних, овочевих, плодових, ягідних, декоративних культур. Обробка насіння, позакореневе підживлення (обприскування рослин), обробка розсади та саджанців.
23	Біонорма – Деструктор, р., гр.	ПП «НВП «ЕКО- ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	Trichoderma harzianum eko/101, Trichoderma lignorum eko/102, Pseudomonas fluorescens eko/201, Pseudomonas aureofaciens eko/202, Paenibacillus polymyxa eko/204.	Прискорення розкладання рослинних решток.
24	Біонорма – Кімнатні рослини, р., гр.	ПП «НВП «ЕКО- ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	Glomus sp. eko/104, Bacillus megaterium eko/207, Azotobacter vinelandii eko/209, Гумінові кислоти.	Краща схожість та приживлення розсади кімнатних рослин, підвищення імунітету кімнатних рослин та стійкості до хвороб. Позакореневе підживлення (обприскування рослин), обробка розсади та саджанців.
25	Біонорма – Овочі, р., гр.	ПП «НВП «ЕКО- ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	Trichoderma harzianum eko/101, Pseudomonas putida eko/203, Paenibacillus polymyxa eko/204,	Краща схожість та приживлення розсади овочевих культур, підвищення імунітету овочевих культур та стійкості до хвороб.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
			Bacillus subtilis eko/206, Azospirillum brasilense eko/210.	Позакореневе підживлення (обприскування рослин), обробка розсади та саджанців.
26	Біонорма – Сад, р., гр.	ПП «НВП «ЕКО-ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	Pseudomonas fluorescens eko/201, Paenylbacillus polymyxa eko/204, Bacillus subtilis eko/206, Streptomyces sp. eko/301.	Краща схожість та приживлення розсади садових та декоративних культур, підвищення імунітету садових та декоративних культур та їх стійкості до хвороб. Позакореневе підживлення (обприскування рослин), обробка розсади та саджанців.
27	Біонорма – Триходерма, р., гр.	ПП «НВП «ЕКО-ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	Trichoderma harzianum eko/101, Trichoderma lignorum eko/102, Trichoderma viride eko/103.	Пригнічення розвитку збудників грибкових та бактеріальних хвороб зернових, зернобобових, олійних, технічних, овочевих, плодово-ягідних та декоративних культур. Обробка насіння, позакореневе підживлення, обробка розсади та саджанців.
28	Біонорма – Фосфор, р., гр.	ПП «НВП «ЕКО-ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	Trichoderma harzianum eko/101, Bacillus amyloliquefaciens eko/205, Bacillus megaterium eko/207.	Забезпечення фосфорним живленням зернових, зернобобових, олійних, технічних, овочевих, плодових, ягідних, декоративних культур. Обробка насіння, позакореневе підживлення (обприскування рослин), обробка розсади та

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
				саджанців.
29	Біонорма – Pseudomonas, р., п.	ПП «НВП «ЕКО- ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	Pseudomonas fluorescens eko/201, Pseudomonas aureofaciens eko/202, Pseudomonas putida eko/203.	Підвищення імунітету рослини та стійкості до хвороб, забезпечення рослин вітамінами, фітогормонами, амінокислотами. Зернові, зернобобові, олійні, технічні, овочеві, плодові, ягідні, декоративні. Обробка насіння, позакореневе підживлення, обробка розсади та саджанців.
30	Біофосфорин, р., п.	ДП «Ензим» / список дистриб'юторів	Живі клітини та спори Bacillus megaterium	Забезпечення фосфором та калієм зернових, технічних, ягідних та овочевих культур та декоративних рослин.
31	Гаубсин FORTE	ДП «Ензим» / список дистриб'юторів	Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens	Захист зернових, зернобобових, картоплі, капусти, томатів, огірків, цукрового буряку, соняшника, бавовника, та плодово-ягідних культур від хвороб.
32	Гаупсин	ТОВ «БІО ДОБРИВО»	Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens	Захист с/г культур від шкідників та хвороб.
33	ГАУПСИН- ІМВ	ТОВ «ІК «Біоінвест- Агро»	Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens-B-111, Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens-B-306.	Для захисту рослин від шкідників і хвороб та стимулювання росту рослин.
34	Гаупсин М	ТОВ «БІО ЦЕНТР»	Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens	Зернові, технічні, плодові, овочеві та ягідні культури.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
35	Глобіома Біота Макс	ТОВ «Глобіома- Україна»	Bacillus subtilis, Bacillus laterosporus, Bacillus licheniformus, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Paenibacillus polymyxa, Trichoderma harzianum, Trichoderma viride, Trichoderma koningii, Trichoderma polysporum	Пробіотик ґрунту. Біодобриво, стимуляція росту рослин, біофунгіцид, виробництво фітогормонів, виробництво ауксину, фіксація азоту, розчинення фосфатів та мікроелементів, деструкція целюлози.
36	Граундфікс	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Azotobacter, Enterobacter, Paenibacillus polymyxa	Оздоровлення та підвищення родючості ґрунту, збагачення ґрунту елементами живлення, очищення від токсинів, нейтралізація втомлюваності ґрунту, стимуляція росту рослин, підвищення їх стійкості до фітопатогенів та шкідників, підвищення урожайності навіть за стресових умов.
37	Діазобактерин	Інститут с/г мікробіології та АПВ НААН	Активні штами азотфіксувальних бактерій Azospirillum brasiliense 18-2 або Azospirillum brasiliense 410 в залежності від цільової культури.	Для забезпечення рослин озимого жита, гречки, кормових злакових трав біологічним азотом, підвищення врожаю і поліпшення його якості.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
38	Добриво Vega agros стимулятор урожаю ТМ	ФОП Абселямова Е.Х.	Суспензія <i>Chlorella vulgaris</i> ≥ 100 млн/мл N заг. – 1 % P – 0,018 % K – 0,067% Вітаміни, мкг/1 г с.р.: Каротин – 1600 Вітамін B1 – 2-18 Вітамін B2 – 21-28 Вітамін C – 1300-5000 Провітамін D – 1000 Органічні кислоти – 80-100 мг/л Пантотенова кислота, Фолієва кислота, Біотін, Лейковерин, Амінокислоти, Мікроелементи (Cu, Fe, Zn, Co, Mn).	Добриво для кореневого живлення. Збагачення ґрунтів органічними речовинами, покращення структури, стимулювання росту корисних мікроорганізмів. Покращення утримання вологи в ґрунті. Забезпечення інтенсивного росту рослини. Формує правильні обмінні процеси в рослині, стимулюючи урожайність. Захищає рослину від зовнішніх стресових факторів (посуха, надмірно активне УФ- випромінювання). Придатний для всіх с/г культур. Підвищує ефективність дії внесених добрив.
39	Еко Рост	ПП «Еко Рост»	Рослинні екстракти, корисна агрономічна мікрофлора <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus</i> <i>stearothermophilus</i> .	Відновлення ґрунту, стійкість до посухи, краща зимівля, збільшення кореневої системи рослин, стійкість до хвороб. Зернові, зернобобові, технічні, плодово-ягідні, овочеві культури та декоративні рослини.
40	Екостерн	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma</i>	Для оздоровлення та підвищення родючості ґрунту, попередження його деградації, прискорення розкладання післяживних решток.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
			<i>lignorum.</i>	
41	Екофосфорин	ТОВ «ІК «Біоінвест- Агро»	Рістстимулюючі азотфіксуючі та фосфат- мобілізуючі ґрунтові бактерії.	Бактеріальний препарат для підвищення продуктивності злакових (озимої та ярої пшениці, ячменю та ін.), технічних та овочевих культур.
42	ЕкоЦелл	ДП «Ензим» / список дистриб'юторів	Концетровані форми ризосферних мікроорганізмів: ґрунтових азотфіксаторів, фосфор та калій- мобілізаторів антагоністів хвороб, біологічно активні речовини.	Обробка ґрунту під усі види с/г культур, для забезпечення азотом, фосфором, калієм, та відновлення мікрофлори ґрунту.
43	Екстракон	Патика Микола Володимирович / НВЦ Агробіотех- нологій «Екстракон»	<i>Sporocytophaga</i> <i>mixococcoides</i> , <i>Sorangium</i> <i>cellulosum</i> , <i>Cellvibrio</i> <i>mixtus</i> , <i>Trichoderma</i> <i>viridae</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B.</i> <i>pumilus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B.</i> <i>megaterium</i>	Природний консорціум ґрунтових мікроорганізмів. Трансформація органічної речовини в біогумус, оздоровлення ґрунту та усунення токсичності, активізація природних трофічних зв'язків у біоценозі, ініціація біологічних циклів ґрунту.
44	ЕМ АГРО	ТОВ «ЕМ- Україна»	Симбіоз ефективних мікроорганізмів, основні лідери: фотосинтезуючі <i>Rhodopseudomonas</i> <i>palustris</i> -молочно- кислі <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	ЕМ-препарат. Обробка ґрунтів під усі види польових та садових культур. Фіксація атмосферного азоту, рециркуляція і збільшення вмісту поживних речовин, виробництво полісахаридів для

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
			-азотофіксуючі Azotobacter.	поліпшення структури ґрунту. Перетворення поживних речовин з нерозчинних у розчинні форми, виробництво простих органічних молекул для живлення рослин та інших біоактивних компонентів. Пригнічення ґрунтових патогенів.
45	Ембіко відновлювач родючості ґрунту	ТзОВ «Пансіонат «Орбіта-2»	Живі культури молочнокислих, фотосинтезуючих бактерій та продукти їх життєдіяльності.	ЕМ-препарат. Біодобриво для зернових, зернобобових, технічних, плодово-ягідних, овочевих культур, ефіро-олійних, кімнатних та декоративних рослин.
46	ЕМ САД-ГОРОД	ТОВ «ЕМ- Україна»	Симбіоз ефективних мікроорганізмів, основні лідери: фотосинтезуючі Rhodopseudomonas palustris -молочно- кислі Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei -азотофіксуючі Azotobacter.	ЕМ-препарат. Обробка ґрунтів під усі види польових та садових культур, фіксація атмосферного азоту, рециркуляція і збільшення вмісту поживних речовин, виробництво полісахаридів для поліпшення структури ґрунту. Перетворення поживних речовин з нерозчинних у розчинні форми, виробництво простих органічних молекул для живлення рослин та інших біоактивних компонентів. Пригнічення ґрунтових патогенів.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
47	ЕНПОСАМ з прилиплю- ючими властивос- тями	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	<i>Paenibacillus</i> <i>polymyxa</i> 1718	Добриво для рослинництва, як фосфор і калій мобілізатор та в якості стимулятора росту кореневої та інших систем рослини з прилиплюючими властивостями.
48	ЕНПОСАМ з клейкими властивос- тями	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	<i>Paenibacillus</i> <i>polymyxa</i> 1718	Добриво для рослинництва, а саме, як фосфор і калій мобілізатор та в якості стимулятора росту кореневої та інших систем рослини з клейкими властивостями.
49	Ефект Біо	ТОВ «Біонасервіс плюс» / ТОВ «Біонасервіс»	<i>Bacillus</i> <i>acidocaldarius</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma viride</i> subsp. <i>Lignorum</i> .	Соя, зернові колосові, соняшник, кукурудза.
50	КЕМ БІН Байкал	ФОП Саєвський Ю.Ю.	<i>Lactobacillus casei</i> 21, <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> 47, <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> 76, <i>Rhodobacter</i> <i>sphaeroides</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> <i>palustris</i> .	ЕМ-препарат. Розклад органічних мас, стимулювання росту рослин, пригнічення запахів, накопичення азоту в ґрунті, біофунгіцидна дія.
51	Меганіт нірбатор А+В	ПП «Ексімінвест»	<i>Azotobacter</i> <i>chroococcum</i> , <i>Azospirillum</i> <i>lipoferum</i> , <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> , <i>Bacillus</i> <i>megatherium</i> .	Обробка ґрунтів для всіх видів польових та садових культур.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
52	МЕЛАНОРІЗ	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Бактерії <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>Paenibacillus polymyxa</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , мікоризоутворюючі гриби <i>Glomus sp.</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Trichoderma lignorum</i> , <i>Trichoderma viride</i> .	Призначений для обробки насіння, підживлення зернових, технічних, олійних, овочевих та плодово-ягідних культур, у період вегетації, з метою активного заселення кореневої та прикореневої зони рослин корисними грибами та бактеріями, забезпечення рослин мікроелементами в легкодоступній формі. Збільшення площі поглинання кореневої системи рослин за рахунок розвитку мікоризи, а також для обробки ґрунту, тобто прискорення відновлення ґрунтів після руйнівного впливу техногенних факторів. Замочування насіння, обприскування по вегетації та крапельний полив.
53	Метавайт	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	<i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Bacillus pumilis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Streptomyces sp.</i>	Обробка ґрунту перед дискуванням, оранкою, культивацією, сівбою або висаджуванням с/г культур; (1) передпосівна обробка насіння зернових, технічних і овочевих культур, бульб картоплі та коріння саджанців перед висаджуванням; (2) кореневе та позакореневе підживлення рослин; (3) обприскування вегетуючих рослин.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
54	Мікробний препарат Хетомік	Інститут с/г мікробіології та АПВ НААН	Штам гриба- антагоніста Chaetomium cochliodes Palliser 3250	Поліпшення живлення рослин та захисту від збудників кореневих хвороб: кореневих гнилей, фузаріозу, парші картоплі, ризоктоніозу картоплі та овочевих культур.
55	Мікрогумін	Інститут с/г мікробіології та АПВ НААН	Azospirillum brasilense	Підвищення урожайності і покращення якості зерна ячменю.
56	МІКОФРЕНД, МІКОФРЕНД-т, МІКОФРЕНД- с	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Бактерії Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Bacillus muciloginosus, Enterobacter sp., Pseudomonas, Streptomyces sp. та мікоризоутворюючі гриби Glomus sp., Trichoderma harsianum.	Призначений для обробки насіння, підживлення зернових, технічних, олійних, овочевих та плодово- ягідних культур, у період вегетації та крапельний полив, з метою активного заселення кореневої та прикореневої зони рослин корисними грибами та бактеріями, забезпечення рослин мікроелементами в легкодоступній формі. Збільшення площі поглинання кореневої системи рослин за рахунок розвитку мікоризи.
57	НітроЗлак	ТОВ «Біонасервіс плюс» / ТОВ «Біонасервіс»	Agrobacterium radiobacter, Bacillus megaterium.	Зернові-колосові.
58	НітроМаїс, КП	ТОВ «Біонасервіс плюс» / ТОВ «Біонасервіс»	Azospirillum brasilense	Соняшник, кукурудза, зернові колосові, ріпак.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
59	НітроМаїс, РН	ТОВ «Біонасервіс плюс» / ТОВ «Біона- сервіс»	Azospirillum brasilense	Соняшник, кукурудза, зернові колосові, ріпак.
60	Органік- баланс	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Azotobacter chroococcum, Bacillus subtilis, Paenibacillus polymyxa, Enterococcus, Lactobacillus.	Зернові, зернобобові, технічні, плодово-ягідні, овочеві культури та декоративні рослини.
61	Органік- баланс деструктор	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Azotobacter chroococcum, Bacillus subtilis, Paenibacillus polymyxa, Enterococcus, Lactobacillus.	Деструктор органічних відходів, поліпшувач ґрунту. Для оздоровлення та підвищення родючості ґрунту, прискорення розкладання післяжнивних решток.
62	Органік- баланс Polymyxa	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Paenibacillus polymyxa, Enterococcus та Lactobacillus	Обробка насіння, ґрунту та рослин в процесі вегетації з метою покращення фосфорного живлення рослин, їх росту і розвитку з захисними властивостями від патогенів.
63	Планриз-Біо	ТОВ НВЦ «Черкаси- біозахист»	Pseudomonas fluorescens	Зернові, зернобобові, технічні, плодово-ягідні, овочеві культури та декоративні рослини.
64	Планриз БТ (водна суспензія)	ІТІ «Біотехніка» НААН України	Життєздатні мі- кроорганізми з широким спектром дії: Pseudomonas fluorescens шт. AP33.	Призначений для обробки насіння та захисту зернових, технічних, бобових, овочевих, плодово- ягідних, квітково- декоративних рослин та винограду від хвороб та для стимулювання їх

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
				росту і розвитку.
65	Планриз М	ТОВ «БІО ЦЕНТР»	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Зернові, зернобобові, технічні, плодово-ягідні, овочеві культури та декоративні рослини.
66	Поліміксобак - терин	Інститут с/г мікробіології та АПВ НААН	<i>Paenibacillus polymyxa</i> KB	Фосфатмобілізуючі бактерії. Препарат розчиняє важкодоступні фосфати ґрунту та стимулює ріст рослин.
67	Псевдо- бактерин-2 (Респекта)	ТОВ «Біонасервіс плюс» / ТОВ «Біонасервіс»	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Для захисту зернових, овочевих, плодово- ягідних культур від грибкових і бактеріальних захворювань.
68	Райс Пі®	ТОВ «Агрітема»	Бактерії <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , штам IT45, титр – не менше 1*10 ⁹ КУО/г препарату на дріжджовій витяжці LYCC	Штам рослинних рістстимулюючих, фосформобілізуючих ґрунтових ризобактерій <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> . Зернові, бобові, технічні, овочеві культури, картопля, ягідні культури. Обробка насіння. Внесення в рядки під час висіву, кореневе (краплинне) та позакореневе внесення.
69	СКЛЕРОЦИД	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Coniothyrium</i>	Для обробки насіння: сої, кукурудзи, ріпаку, соняшнику. Для обробки саджанців перед

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
			minitans, Trichoderma harsianum.	висаджуванням в ґрунт (суниця). Для обробки ґрунту.
70	Споразин, р.	ТОВ «ІК «Біоінвест- Агро»	Pseudomonas aureofaciens- B- 7559, Pseudomonas aureofaciens- B- 7558, Bacillus subtilis.	Зернові, зернобобові, технічні, плодово-ягідні, овочеві культури та декоративні рослини.
71	Споразин, р	ТОВ «НВП «Мікробні біотехнології»	Pseudomonas aureofaciens- B- 7559, Pseudomonas aureofaciens- B- 7558, Bacillus subtilis.	Зернові, зернобобові, технічні, плодово-ягідні, овочеві культури та декоративні рослини.
72	Суспензія Хлорелли	ФГ «У Самвела»	Chlorella vulgaris штамм - C111	Для всіх с/г культур.
73	Філазоніт СВ	ТОВ «Філазоніт Україна»	Azotobacter chroococcum, Bacillus megaterium, целюло- зоруйнуючі бактерії.	Концентрат азотофіксуючих та фосфатмобілізуючих ґрунтових бактерій. Фіксація з повітря газоподібного азоту з подальшим перетворенням в доступні для рослин азотні сполуки, мобілізація та перетворення наявних у ґрунті недоступних фосфорних сполук, та перетворення їх у доступні для рослин форми.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
74	Флуоренцин БТ (водна суспензія)	ІТІ «Біотехніка» НААН України	Життєздатні мікроорганізми з широким спектром дії: <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	Захист зернових, технічних, бобових, овочевих, плодово- ягідних рослин від хвороб та для стимулювання їх росту і розвитку.
75	Хелпрост Укорінювач, р.	ПП «БТУ– Центр»/ список дистриб'юторів	Мезо– і мікроелементи, бактерії <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus</i>	Обробка розсади овочевих культур та квітів, саджанців, дорослих дерев. Замочування коріння та полив (під корінь). Для обробки розсади овочевих культур та квітів, саджанців, дорослих дерев з метою прискорення коренеутворення, стимуляції швидкого росту та розвитку кореневої системи, покращення приживлення розсади при висаджуванні та пересаджуванні.
76	Філазоніт ТО	ТОВ «Філазоніт Україна»	<i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , целюло- зоруйнуючі бактерії.	Концентрат азотофіксуючих та фосфатмобілізуючих ґрунтових бактерій. Фіксація з повітря газоподібного азоту з подальшим перетворенням в доступні для рослин азотні сполуки, мобілізація та перетворення наявних у ґрунті недоступних фосфорних сполук, та перетворення їх у доступні для рослин форми.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
77	Фітопсин	ТОВ НВЦ «Черкаси- біозахист»	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Для захисту зернових, овочевих, плодово-ягідних культур від грибкових і бактеріальних захворювань.
78	Флуоренцин БТ (водна суспензія)	ІТІ «Біотехніка» НААН України	Життєздатні мі- кроорганізми з широким спектром дії: <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	Захист зернових, технічних, бобових, овочевих, плодово-ягідних рослин від хвороб та для стимулювання їх росту і розвитку.
79	Хелпрост Укорінювач, р.	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Мезоеlementи і мікроelementи, бактерії <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus</i> .	Обробка розсади овочевих культур та квітів, саджанців, полив (під корінь) дорослих дерев з метою прискорення коренеутворення, стимуляції швидкого росту та розвитку кореневої системи, покращення приживлення розсади при висаджуванні та пересаджуванні.
80	Вінос Зернові	ДП «Ензим» / список дистриб'юторів	Антагоністи збудників корневих гнилей та хвороб стебла, азот- фіксатори та фосфор- і калій-мобілізатори, природні фітогормони та вітаміни.	Обробка насіння зернових культур, пшениця, жито, ячмінь, овес, просо, тритікале, тощо.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
81	Вінос Кукурудза С	ДП «Ензим» / список дистриб'юторів	Антагоністи збудників коренових гнилей та хвороб стебла, азот- фіксатори та фосфор- і калій-мобілізатори, природні фітогормони та вітаміни.	Обробка насіння кукурудзи.
82	Вінос Соняшник С	ДП «Ензим» / список дистриб'юторів	Антагоністи збудників коренових гнилей та хвороб стебла, азот- фіксатори та фосфор- і калій-мобілізатори, природні фітогормони та вітаміни.	Обробка насіння соняшнику.
83	Вінос ТК	ДП «Ензим» / список дистриб'юторів	Антагоністи збудників коренових гнилей та хвороб стебла, азот- фіксатори та фосфор- і калій- мобілізатори, природні фітогормони та вітаміни.	Обробка насіння технічних культур.
84	Bioterravit	ТОВ «Біо Терра Технологі»	Культури мікоорганізмів	Накопичення азоту в ґрунті, стимулювання росту рослин, розклад органічних мас, пригнічення запахів. Фертигація, оприскування, обробка насіння.

Мікроорганізми-інокулянти

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
1	Азорхіз, рідкий концентрат мікрооргані- змів	ТзОВ «Азотер Україна»	Rhizobium sp., Azotobacter chroococcum, Azospirillum brasilense, Bacillus megatherium.	Біодобрива з інокулянтом для бобових культур. Підвищення врожайності сої, люцерни, гороху і квасолі завдяки асоціативної та симбіотичної фіксації азоту бактеріями препарату. Препарат вносять на поверхню ґрунту перед посівом та відразу ж загортають у ґрунт.
2	Азотфіксатор на бобові	ТОВ НВЦ «Черкаси- біозахист»	Бактерії роду Rhizobium	Горох, нут, сочевиця та інші бобові.
3	Азотфіксатор на сою	ТОВ НВЦ «Черкаси- біозахист»	Bradyrhizobium japonicum	Соя
4	Андеріз, р., п.	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Bradyrhizobium japonicum, Rhizobium leguminosarum, Mezorhizobium ciceri, Sinorhizobium sp., Penicillium bilaii.	Соя, горох, нут, квасоля, сочевиця.
5	Біомаг-Соя	ДП «Ензим» / список дистриб'юторів	Bradyrhizobium japonicum	Соя
6	Біоінокулянт- БТУ-р	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Bradyrhizobium japonikum, Rhizobium leguminosarum.	Соя, горох, люцерна, нут, люпин та ін.
7	Біоінокулянт - БТУ-т	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Bradyrhizobium japonikum, Rhizobium leguminosarum.	Соя, горох, люцерна, нут, люпин та ін.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
8	Ековітал	ТОВ «ІК «Біоінвест- Агро»	Бактерії штамів Bradyrhizobium japonicum IMB B- 7242 та Bacillus megaterium IMB B- 7168.	Для бобових культур (сої). Сприяє підвищенню урожаю, покращенню структурованості та екологічного стану ґрунтів за рахунок збагачення їх азотом, фосфором та іншими біогенними елементами, розвитку корисної ґрунтової мікрофлори.
9	Ековітал	ПП «Агро- Адмірал»	Бактерії роду Bradyrhizobium та Bacillus megaterium.	Комплекс для підвищення врожайності та якості бобових культур (соя, горох, нут, квасоля та ін.)
10	Нітрофікс® (LS)	ТОВ «Біонасервіс»	Bradyrhizobium japonicum, Bradyrhizobium elcanii.	Соя
11	Нітрофікс® (CP)	ТОВ «Біонасервіс»	Bradyrhizobium japonicum, Bradyrhizobium elcanii.	Соя
12	Нітрофікс (Нітрагін), КП	ТОВ «Біонасервіс плюс»/ ТОВ «Біонасервіс»	Rhizobium leguminozarum, Bradyrhizobium japonicum	Горох
13	Нітрофікс (Нітрагін), РН	ТОВ «Біонасервіс плюс»/ ТОВ «Біонасервіс»	Rhizobium leguminozarum, Bradyrhizobium japonicum.	Горох
14	Преміум Інокулянт	ТОВ «Група компаній «Вітагро»	Bradyrhizobium japonicum USDA442	Соя

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
15	Преміум Інокулянт Форте	ТОВ «Група компаній «Вітагро»	Bradyrhizobium japonicum USDA442, Bradyrhizobium diazoefficiens SEIMA 5079, Bradyrhizobium diazoefficiens SEIMA 5080.	Соя
16	Пре Ноктін А (Нітрофікс®)	ТОВ «Біонасервіс»	Bradyrhizobium japonicum	Соя
17	Ризоактив бобові, р.	ПП «НВП «ЕКО- ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	Rhizobium leguminosarum bv. pisum eko/004, Sinorhizobium meliloti eko/005, Bradyrhizobium lupini eko/006, Rhizobium galegae eko/007, Rhizobium leguminosarum bv trifolii eko/008, Rhizobium leguminosarum bv. viceae eko/009, Mesorhizobium ciceri eko/010, Rhizobium leguminosarum bv. Phaseoli eko/011, Rhizobium leguminosarum bv. lenseko/012.	Обробка насіння бобових культур: горох, люцерна, люпин, конюшина, вика, квасоля, нут, козлятник, сочевиця.
18	Ризоактив концентрат, п., р.	ПП «НВП «ЕКО- ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	Bradyrhizobium japonicum eko/001, Bradyrhizobium japonicum eko/002, Bradyrhizobium japonicum eko/003	Інокулянт для насіння сої.
19	Ризогумін	Інститут с/г мікробіології та АПВ НААН	Bradyrhizobium japonicum бульбочкові бактерії	Підвищення урожайності і покращення якості продукції бобових культур.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
20	РІЗОЛАЙН	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Bradyrhizobium japonikum, Rhizobium leguminosarum	Соя, горох, люцерна, нут, люпин та ін.
21	BiNitro Горох, р., п.	ДП «Ензим» / список дистриб'юторів	Живі клітини та спори бактерії Rhizobium leguminosarum	Інокуляція гороху, сочевиці, кормових бобів, вика.
22	BiNitro Нут	ДП «Ензим» / список дистриб'юторів	Живі клітини та спори бактерії Mesorhizobium ciceri	Інокуляція нуту.

Мікориза

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
1	Міковітал	ФОП Олефірчук С.П.	Веgetативні клітини та спори гриба- мікоризоутворюв ача Tuber melanosporum (чорного трюфеля)	Для оброблення і підживлення коренів рослин всіх типів і видів в с/г, лісовому, парковому господарствах, квітникарстві, ландшафтному дизайні, плодовому, приватному та аматорському садівництві, горіхівництві, виноградарстві та городництві.
2	МікоАпплай, ЗП	ТОВ «Мікоризал Епплікейшнс», США / ТОВ «Самміт-Агро Юкрейн»	Ендомікоризні види грибів (Glomus intraradices, Glomus luteum, Glomus etunicatum, Glomus claroideum) – 1-8 %	Для передпосівної обробки насінневого матеріалу зернових колосових культур, зернобобових культур (соє), технічних культур (картопля).
3	Мікофікс	ТОВ «Група компаній «Вітагро»	Glomus intraradices (strain CMCCROC7)	Забезпечення рослин збалансованими елементами живлення, вологою.

4	МІКОФРЕНД	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Мікоризоутвор ючі гриби Glomus sp., Бактерії Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Bacillus muciloginosus, Enterobacter sp., Pseudomonas, Streptomyces sp. та Trichoderma harsianum.	Для обробки насіння зернових, технічних, олійних, овочевих та плодово-ягідних культур, у період вегетації, з метою активного заселення кореневої та прикореневої зони рослин корисними грибами та бактеріями. Збільшення площі поглинання кореневої системи рослин за рахунок розвитку мікоризи. Замочування насіння, обприскування по вегетації та крапельний полив.
5	Різомакс	ТОВ «Біонасервіс плюс» / ТОВ «Біо- насервіс»	Pleurotus ostreatus	Зернобобові, соя, зернові, кукурудза, ячмінь ярий, олійні культури, соняшник, овочеві культури, томати.

Інсектициди, акарициди

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
1	АгроМар mtz	ПП «Агро- Адмірал»	Ентомопатогенні ґрунтові гриби <i>Metarhizium anisopliae</i>	Проти ґрунтових шкідників зернових, зернобобових, технічних, овочевих, плодово-ягідних культур та декоративних рослин.
2	Бітоксубацилін -Біо	ТОВ НВЦ «Черкаси- біозахист»	<i>Bacillus thuringiensis var. thuringiensis</i>	Проти листогризух комах.
3	Бітоксубацилін БТ (водна суспензія)	ІТІ «Біотехніка» НААН України	Життєздатні мікроор-ганізми та їхні спори: <i>Bacillus thuringiensis var. Thuringiensis</i> .	Захист зернових, технічних, бобових, овочевих, плодово- ягідних рослин від шкодочинних комах. Обмежує чисельність шкідників хлібних запасів.
4	Бітоксубацилін М	ТОВ «БІО ЦЕНТР»	<i>Bacillus thuringiensis var. thuringiensis</i>	Проти листогризух комах.
5	Бітоксубацилін - БТУ (Актоверм формула)	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	<i>Bacillus thuringiensis var. thuringiensis</i>	Для захисту рослин від комах-шкідників та кліщів.
6	Бецимід БТ (водна суспензія)	ІТІ «Біотехніка» НААН України	Життєздатні мікроор-ганізми та їхні спори: <i>Bacillus thuringiensis var. kurstaki</i> шт. БТК-4.	Обмежує чисельність шкодочинних комах молодших віків більше 40 видів.
7	Боверин	ДП «Ензим» / список дистриб'юторів	Природні гриби <i>Beauveria bassiana</i>	Біоінсектицид для захисту сільськогосподарських, лісових і лікарських культур від шкідників.
8	Боверин	ТОВ «Біо Терра Технолоджі»	<i>Beauveria bassiana</i>	Фертигація, обприскування.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
9	Боверин БТ (водна суспензія)	ІТІ «Біотехніка» НААН України	Спори і міцелій життєздатного мікро- організму: <i>Beauveria bassiana</i> шт. 71661.	Захист картоплі, овочевих культур закритого і відкритого ґрунту. Пригнічує чисельність шкодочинних комах.
10	Боверин М	ТОВ «БІО ЦЕНТР»	Природні гриби <i>Beauveria bassiana</i>	Для захисту с/г, лісових і лікарських культур від шкідників.
11	ЕМ-5	ТОВ «ЕМ- Україна»	Екстракти гострого перцю та часнику на основі ЕМ препарату.	Для захисту с/г культур від шкідників і хвороб.
12	Ентоцид	ДП «Ензим» / список дистриб'юторі	Природні гриби <i>Metarhizium anisopliae</i>	Біоінсектицид для захисту сільськогосподарських, лісових і лікарських культур від шкідників.
13	Колорадо цид, р., п.	ДП «Ензим» / список дистриб'юторі	Живі клітини та спори <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>	Біоінсектицид для захисту сільськогосподарських, лісових і лікарських культур від шкідників.
14	Лепідоцид	ТОВ «Біонасервіс плюс»/ ТОВ «Біонасервіс»	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	Проти листогризух комах. Буряк, соняшник, люцерна, соя, горох, кукурудза, овочеві (капуста, томати), плодово-ягідні (яблуна, слива, груша, вишня, черешня, абрикос, суниця, агрус, малина, смородина), виноград.
15	Лепідоцид М	ТОВ «БІО ЦЕНТР»	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	Для захисту рослин від гусениць – личинок метеликів.
16	Лепідоцид- БТУ	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторі	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	Для захисту рослин від гусениць лускокрилих комах-шкідників.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
17	Мезітропін	ТОВ «Біо Терра Технолоджі»	Metarhizium anisopliae	Фертигація, обприскування, обробка насіння.
18	Метавайт- Плюс	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Metarhizium anisopliae, Beauveria bassiana, Bacillus pumilis, Bacillus thuringiensis var. thuringiensis	Біопрепарат інсектицидної дії. Обробка ґрунту, насіння та обприскування по вегетації плодово- ягідних, овочевих, технічних, зернових, олійних, бобових та ін. культур.
19	Метаризин	ТОВ НВЦ «Черкаси- біозахист»	Metarhizium anisopliae	Зернові, зерно-бобові, технічні, картопля, овочеві, плодово-ягідні культури.
20	Метаризин БТ (водна суспензія)	ІТІ «Біотехніка» НААН України	Спори і міцелій життєздатного мікроорганізму: Metarhizium anisopliae	Захист зернових, технічних, бобових, овочевих, плодово- ягідних рослин та картоплі від шкочинних комах.
21	Метаризин М	ТОВ «БІО ЦЕНТР»	Metarhizium anisopliae	Зернові, зерно-бобові, технічні, картопля, овочеві, плодово-ягідні культури.
22	Рідке калійне мило «БІОФРЕНД»	ПП «БТУ- Центр» / список дистриб'юторів	Рідке калійне мило	Для захисту рослин від шкідників та хвороб. Обприскування по вегетації плодово- ягідних, овочевих, технічних, зернових та ін. культур.
23	Фітоімун синтез	ТОВ «Органік Синтез»	Продукт на основі ЕМ препарату, Ферментовані екстракти хрону, червоного гіркого перцю, часнику	Знищення шкідників та хвороб на зернових, бобових, плодово- ягідних, овочевих та декоративних культурах.

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'ютор	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
24	FLOWER DS 4EC	ТОВ «УК ІНЖИНІРИНГ»	Піретрин – 4 % Рослинні олії синергістів – 16 %	Проти широкого спектру шкідників на всіх культурах: білокрилка, трипси, попелиці, кліщі, гусениці метеликів, жуки тощо.

Стимулятори росту рослин

№	Назва / препаративна форма	Виробник / Дистриб'юто р	Склад	Призначення, примітки, обмеження. № Сертифікату або Підтвердження
1	Агрінос Б	ТОВ «Агрінос Україна»	Azotobacter vinelandii та Clostridium pasteurianum	Біопрепарат для фіксації атмосферного азоту, мобілізації макро- та мікро- елементів. Зернові, олійні, технічні, овочеві, плодово- ягідні, декоративні та інші культури.
2	Агріфлекс Аміно, п. AgriFlex Amino (Ultra AminoMax)	ТОВ «Агрісол»	Амінокислоти: 40- 50% K ₂ O — 10% N — 15%, Розчинні цукри — 7-9% Пептиди — 3-5%	Стимуляція росту с/г культур.
3	Агріфлекс Фульвікс, п. - AgriFlex Fulvix (MAX SpecialFulvic 70)	ТОВ «Агрісол»	Фульвові кислоти: 60% K ₂ O — 12%	Стимуляція росту с/г культур.
4	Агріфлекс Хьюмік, п. - AgriFlex Humic (Ultra HumiMax)	ТОВ «Агрісол»	Гумінові кислоти: 72% Фульвові кислоти: 15%, K ₂ O — 12%	Стимуляція росту с/г культур.
5	Агрогум з леонардиту	ТОВ «Агробіон»	Гумінові та фульвові кислоти. Комплекс органічних та мінеральних елементів, глікопротеїни.	Підвищує врожайність, морозостійкість, посухостійкість рослин, зменшує накопичення нітратів, важких металів, забезпечує розвиток кореневої системи, покращує смакові якості плодів.

6	Агрогум з торфу	ТОВ «Агробіон»	Гумінові та фульвові кислоти, Комплекс органічних та мінеральних елементів, глікопротеїни.	Овочеві, плодово-ягідні культури, квіти, розсадники.
7	Алгарен Твін	ТОВ «Грін Еко Ферт»	Оптимальне співвідношення ауксинів / цитокінінів для стимуляції росту кореневої системи.	Зернові колосові та кукурудза, соняшник, озимий та ярий ріпак, зернобобові культури, овочеві культури відкритого та закритого ґрунту, плодово-ягідні культури.
8	Актив-Harvest Гумат	ТОВ ТД «Актив-Харвест»	Гумат калію – 10-15% (100-150 г/л).	Кореневе та позакореневе підживлення зернових, олійних, технічних, овочевих, плодово-ягідних, декоративних та інших культур з метою активації росту, подолання стресу та стимулювання природних захисних реакцій рослин.
9	Амалгерол, ЕВ	Хешенбіхлер ГмбХ, Австрія / ТОВ «Самміт-Агро Юкрейн»	Екстракт морських водоростей – 300 г/л. Екстракт рослин – 200 г/л Nзаг. – 5,0 г/л P2O5 – < 0,1 г/л K2O – 5,0 г/л	Для огірків і томатів закритого ґрунту шляхом кореневого підживлення рослин. Чинить позитивний вплив на мікробіоценоз та аерацію ґрунту, підвищує засвоєння рослинами поживних речовин із ґрунту, та прискорюючи ріст мікроорганізмів, сприяє розвитку кореневої системи культур та утворенню мікоризи, підвищує імунітет та стійкість рослин до несприятливих умов.
10	Амінозол®	ТОВ «БІОФЕРТ»	Амінокислоти – 9% N – 115 г/л K2O – 15 г/л	Органічне азотне добриво (амінокислоти) для листового підживлення.

11	Аміностим	ДП «Ензим» / список дистриб'юторі	Вільні амінокислоти рослинного походження, не менше 134 г/л.	Стимуляція росту зернових, бобових, технічних культур (соняшник, ріпак, кукурудза), овочевих та плодово-ягідних.
12	Біогрунт Синтез	ТОВ «Органік Синтез»	Продукт на основі ЕМ препарату. K ₂ O – 7580 мг/кг Мікроелементи в хелатній формі: Mn - 279 мг/кг Cu – 189 мг/кг Zn – 498 мг/кг Ca – 930 мг/кг Mg – 85,7 мг/кг B – 37,9 мг/дм ³	Підвищення врожайності. Покращує схожість насіння та зимостійкість культур, підвищує стресостійкість до погодних умов, стимулює розвиток кореневої системи. Перешкоджає накопиченню нітратів в продукції та важких металів і радіонуклідів, усуває хлороз, стимулює цвітіння та плодоношення.
13	Біонорма – Антистрес, р., гр.	ПП «НВП «ЕКО- ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	<i>Pseudomonas fluorescens eko/201</i> , <i>Pseudomonas putida eko/203</i> , <i>Paenibacillus polymyxa eko/204</i> , <i>Azospirillum lipoferum eko/211</i> .	Прискорення відновлення рослин та ґрунту після руйнівного впливу техногенних факторів. Зернові, зернобобові, олійні, технічні, овочеві, плодові, ягідні, декоративні. Обробка насіння, позакореневе підживлення (обприскування рослин), обробка розсади та саджанців.
14	Біонорма – Гумат, р., гр.	ПП «НВП «ЕКО- ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	<i>Bacillus megaterium eko/207</i> , <i>Azotobacter chroococcum eko/208</i> , Гумінові кислоти.	Краща схожість та приживлення розсади, підвищення імунітету рослини та стійкості до хвороб, забезпечення рослин вітамінами, фітогормонами, амінокислотами. Зернові, зернобобові, олійні, технічні, овочеві, плодові, ягідні, декоративні. Обробка насіння, позакореневе підживлення (обприскування рослин), обробка розсади та саджанців.

15	Біонорма – Кімнатні рослини, р., гр.	ПП «НВП «ЕКО- ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	Glomus sp. eko/104, Bacillus megaterium eko/207, Azotobacter vinelandii eko/209, Гумінові кислоти.	Краща схожість та приживлення розсади кімнатних рослин, підвищення імунітету кімнатних рослин та стійкості до хвороб. Позакореневе підживлення (обприскування рослин), обробка розсади та саджанців.
16	Біонорма – Овочі, р., гр.	ПП «НВП «ЕКО- ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	Trichoderma harzianum eko/101, Pseudomonas putida eko/203, Paenibacillus polymyxa eko/204, Bacillus subtilis eko/206, Azospirillum brasiliense eko/210.	Призначення: краща схожість та приживлення розсади овочевих культур, підвищення імунітету овочевих культур та стійкості до хвороб. Спосіб внесення: позакореневе підживлення (обприскування рослин), обробка розсади та саджанців.
17	Біонорма – Сад, р., гр.	ПП «НВП «ЕКО- ГАРАНТ», ТОВ «БІОНОРМА»	Pseudomonas fluorescens eko/201, Paenibacillus polymyxa eko/204, Bacillus subtilis eko/206, Streptomyces sp. eko/301.	Краща схожість та приживлення розсади садових та декоративних культур, підвищення імунітету садових та декоративних культур та стійкості їх до хвороб. Позакореневе підживлення (обприскування рослин), обробка розсади та саджанців.
18	Біостимулятор Soil Biotics «4 r FoliarCo ncentrate» (4P Фоліар Концентрат) органічний, п.	ТОВ «Агрус- Байотікс Україна»	Гумінова кислота – 55%, Фульвова кислота – 21%, Ульмінова кислота – 5% Мікроелементи – 6%	Культури відкритого та закритого ґрунту.

19	Біостимулятор «5P Соіл Буст EA», органічний SoilBiotics Organic 5r Soil Boost EA	ТОВ «Агрус-Байотікс Україна»	Гумінова кислота – 59%, Фульвова кислота – 20%, Ульмінова кислота – 5% Мікроелементи – 6%	Культури відкритого та закритого ґрунту.
20	Біохелат Аміновіта	ТОВ НВП «Біолабтехнологія»	Композиція аміно-кислот і поліпептидів (150 г/л), збагачених мікроелементами.	Призначене для забезпечення зростання, захисту від стресів, відновлення і зміцнення рослин.
21	Біохелат гумат калію	ТОВ НВП «Біолабтехнологія»	Гумат калію – 150 г/л N(NH ₂) – 12 г/л P ₂ O ₅ – 3,3 г/л K ₂ O – 15,2 г/л MgO – 0,1 г/л	Застосовується для підживлення усіх сільськогосподарських культур.
22	БлекДжек, кс.	АВЕНТРО Сарл	Гумус. Загальна органічна речовина (в т.ч. ульмінові кислоти та гумін) – 27-30 %, Гумінові кислоти – 19-21%, Фульвокислоти – 3-5%	Біологічний стимулятор. Буряки цукрові, зернові колосові культури, кукурудза, овочеві культури, ріпак, соняшник.
23	Вимпел 2, р.	МП НДП «Долина»	Гумінові кислоти: до 3 % Карбонові кислоти природного походження – 0,3-0,5 % Органічні сполуки – 28-30%	Для підвищення врожайності, стійкості до захворювань та стресових ситуацій. Зернові, зернобобові, технічні, олійні, овочеві, плодові, ягідні, декоративні культури: обприскування вегетуючих рослин – 0,5-2,0 л/га.

24	Вітазим БІО	ТОВ «Агро Експерт Інтернешнл»	Фітогормони (браси-ностероїди) Тріаконтанол Вітаміни В1, В2, В6	Позакореневе та кореневе підживлення сільськогосподарських культур. Обробка насіння та посадкового матеріалу.
25	Гумак-агро, г.	HUMAC s.r.o. / ГУМАК-УА	Гумусні речовини: 85-90%, Гумінові кислоти, фульвокислоти, гуміни. Негумінові органічні речовини: 10-15 %, Цукор, жирні кислоти, амінокислоти, лігнін, білки.	Природний стимулятор родючості ґрунту з високим вмістом гумінових кислот. Зернові, технічні, плодово-ягідні, овочеві культури.
26	Гумат калію, р., п.	ДП «Ензим» / список дистриб'юторів	Солі гумінових кислот, не менше 10%.	Стимуляція росту зернових, бобових, технічних культур (соняшник, ріпак, кукурудза), овочевих та плодово-ягідних.
27	Гумат Калію (GumiGold)	ТОВ «КАРАВАН»	Гумінові кислоти – 55% Фульвові кислоти – 30% Гіломеланові кислоти – 5% Мікроелементи	Обробка насіння, кореневе та позакореневе підживлення польових, овочевих, плодово-ягідних, баштанних культур відкритого та закритого ґрунту.
28	Гумат калію натрію з мікроелементами «ЛФ 12»	ПП «НВО «СИЛА ЖИТТЯ УКРАЇНА»	Гумінові речовини, азот, калій, фосфор, магній, мікроелементи.	Обробка насіння, вегетуючих рослин та пожнивних решток зернових культур, сої та соняшнику.
29	Гумат калію натрію з мікроелементами «ЛФ 20»	ПП «НВО «СИЛА ЖИТТЯ УКРАЇНА»	Гумінові речовини, азот, калій, фосфор, магній, мікроелементи.	Обробка насіння, вегетуючих рослин та пожнивних решток зернових культур, сої та соняшнику.

30	Гумат калію «Преміум гумат»	ТОВ «ДВІНТ»	Солі гумінових кислот	Гумати сприяють посиленню росту рослин, підвищенню врожайності, покращенню декоративності квітів, підвищенню резистентності рослин до захворювань та зниженню негативного впливу несприятливих кліматичних умов.
31	Добриво Vega agros стимулятор урожаю ТМ	ФОП Абсеямова Е.Х.	Суспензія <i>Chlorella vulgaris</i> ≥ 20 млн/мл. N заг. – 1% Р – 0,018% К – 0,067% Вітаміни, Органічні кислоти, Біотін, Лейковерин, Амінокислоти, Мікроелементи	Забезпечує інтенсивний ріст рослини. Формує правильні обмінні процеси в рослині, стимулюючи урожайність. Захищає рослину від зовнішніх стресових факторів. Придатний для всіх с/г культур. Підвищує ефективність дії внесених добрив.
32	Емістим С	ТОВ «Високий врожай»	Збалансований комплекс природних ростових речовин - фітогормонів ауксинової, гібберелінової та цитокінінової природи, амінокислот, вуглеводів, жирних кислот, мікроелементів.	При вирощуванні зернових, зернобобових, технічних, кормових, овочевих, плодово-ягідних культур, в лісовому господарстві, ландшафтному дизайні, на квітах та газонах. Збільшує енергію проростання і польову схожість насіння, сприяє розвитку кореневої системи, підвищує стійкість рослин до хвороб та стресових факторів, знімає фітотоксичний ефект, має антимутагенну дію, підвищує врожай та якість вирощеної продукції.

33	Ендофіт L1	ПП «ВКФ «ІМПТОРГ- СЕРВІС»	Комплекс природних ростових речовин — фітогормонів ауксинової, гібберелінової та цитокінінової природи, амінокислот, вуглеводів, жирних кислот, мікроелементів.	Збільшує енергію проростання і польову схожість насіння, сприяє розвитку кореневої системи, підвищує стійкість рослин до хвороб та стресових факторів, знімає фітотоксичний ефект, має антимутагенну дію, підвищує врожай та якість вирощеної продукції.
34	Жива М синтез	ТОВ «Органік Синтез»	Рн - 3,81 N заг. - 1,45 P ₂ O ₅ – 0,176 K ₂ O – 1,335 S, Mg, Ca, Fe – 0,058 Mn – 0,064 Zn – 0,097 Cu – 0,011 Co – 0,0002 B – 0,089 Mo – 0,0003 Ензими та живі мікроорганізми	Підвищення енергії проростання та схожості рослин. Підвищення імунітету рослин до несприятливих погодних умов та хвороб, стимуляція розвитку потужної кореневої системи, зменшення стресового впливу на рослини, підвищення стійкості до негативних факторів навколишнього середовища, підвищення врожайності с/г культур.
35	ІнтраСелл® / IntraCell®	ТОВ «Агрітема»	Чисті, природні, високі концентрації (> 97 %) N-триметилованої амінокислоти, відомої як Glycine Betaine	Стимулятор росту, антистресант, осмопротектор. Ефективний контроль різноманітних стресових ситуацій: післядія пестицидів, заморозки, посуха та спека, надмірні опади. Концентрована форма природного осмопротектора, який може захистити рослини від екстремальних умов і стресів, які мають негативний вплив на с/г культури.

36	Келпак РК	ТОВ «ТерраВіта Україна»	Ауксини 11 мг/л Цитокініни 0,03 мг/л	Сприяє розвитку кореневої системи, росту рослин, підвищує стійкість до хвороб, покращує якість продукції.
37	МАКС СіСейлер / СіМакс / Макс АльгаТех	ТОВ «Агрісол»	N – $\geq 1\%$ P ₂ O ₂ – $\geq 0,8\%$ K ₂ O – $\geq 16\%$ Мікроелементи, амінокислоти, альгінові кислоти, метінол, цитокініни та гібереліни	
38	Мікосан «В»	ТОВ «Мікотон-Агліконт»	Екстракт афілофоральних грибів	Індуктор стійкості рослин проти патогенів та несприятливих умов. Підвищує активний імунітет рослин проти патогенів. Стимулює розвиток кореневої системи.
39	Мікосан «Н»	ТОВ «Мікотон-Агліконт»	Екстракт афілофоральних грибів	Обробка насіння, бульб, розсади. Індуктор стійкості рослин проти патогенів та несприятливих умов. Підвищує активний імунітет рослин проти патогенів.
40	МС Крем, р.	ТОВ «Агрісол»	Mn — 1,5 % Zn — 0,5% Цитокініни, ауксини, гібереліни, бетаїни	
41	МС Екстра, п.	ТОВ «Агрісол»	N — 1 % K ₂ O — 20 % Органічна речовина, цитокініни Бетаїни — 0,2 %	

42	Сапрогум, природний стимулятор росту рослин	ТзОВ «УА ГРУНТ»	N $\geq$ 3 % P ₂ O ₅ $\geq$ 0,48 % K $\geq$ 0,1 % Солі гумінових кислот, солі фульвокислот мікроелементи, аміно кислоти, фітогормони (ауксини, гібереліни, цитокініни), вітаміни.	Підвищує енергію проростання, схожість насіння, сприяє кращому укоріненню розсади та саджанців, стимулює коренеутворення, ріст і розвиток рослин. Підвищує врожайність, скорочує терміни дозрівання, підвищує імунітет рослин до захворювань, приморозків та посухи, зменшує кількість нітратів, важких металів та радіонуклідів, покращує смакові якості і тривалість зберігання продукції.
43	Суспензія Хлорел- ли	ФГ «У Самвела»	Chlorella vulgaris штамм - C111	Для всіх с/г культур.
44	Фертілідер Голд Сіактів	ТОВ «Тімак Агро Україна»	Екстракт морських водоростей, Екстракт рослин, В, Мо.	Для листового внесення: зернові, зернові колосові, технічні, олійні.
45	Фертілідер Опал Сіактів	ТОВ «Тімак Агро Україна»	Екстракт морських водоростей, Екстракт рослин, Cu, Zn, Mn	Для листового внесення: зернові, зернові колосові, технічні, олійні, овочеві та плодово-ягідні культури.
46	Фертілідер Тонік Сіактів	ТОВ «Тімак Агро Україна»	Екстракт морських водоростей, Екстракт рослин, Cu, Zn, Mn	Для листового внесення: зернові, зернові колосові, технічні, олійні, овочеві та плодово-ягідні культури.
47	ПанцирКЕМ	ТОВ «Біо Терра Технолоджі»	Гриб-антагоніст проти фітопатогенних грибів (мікроміцетів)	Симбіотичний гриб для захисту і стимулювання кореневої системи. Обробіток насіння, замочування кореневої системи.
48	Фітовіт	ТОВ «ІК «Біоінвест-Агро»	Природний комплекс фітогормонів (ауксини, цитокініни, гібереліни, епібрасини), амінокислоти.	Індуктор системної стійкості рослин із біозахисним ефектом.

49	Фульвітал Плюс, з.п.	ТОВ «Агротехно- союз»	Фульвові кислоти — 750 г/кг, Fe — 40 г/кг Mn — 25 г/кг Mg — 70 г/кг Zn — 25 г/кг Cu — 10 г/кг S — 60 г/кг	Призначено для стимуляції росту рослин та покращення їхнього живлення.
50	Фульвітал Плюс, в.с.	ТОВ «Агротехно- союз»	Фульвові кислоти — 200 г/л, Fe — 13,5 г/л Mn — 6,5 г/л Mg — 21 г/л Zn — 9 г/л Cu — 5 г/л S — 15 г/л	Призначено для стимуляції росту рослин та покращення їхнього живлення.
51	Хелафіт- органік	Гармашов В.В., ТОВ «Хелафіт груп»	Мікроелементи в хелатній формі (B, Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Co), гумінові та фульвові кислоти, вітаміни, амінокислоти, Trichoderma, Bacillus subtilis.	Висока біологічна, рістрегулююча, імуностимулююча та імуномодельюча активність. Природний антистресовий адаптоген, мобілізує захисні сили рослини. Підвищує холодо і посухостійкість рослин. Протидіє сольовому стресу. Покращує процеси дозрівання.
52	Цитокін	АВЕНТРО Сарл	Цитокініни – 0,01% екстракт морських водоростей – 99,99%	Позакоренева обробка зернових, технічних, плодово-ягідних, овочевих культур, винограду.
53	Humic Green Life, Біостимулятор росту рослин	ТОВ Компанія «Терра-Агро»	Гумінові та фульвокислоти (150-350мг/л) та комплекс макро-та мікроелементів, біологічно- активних речовин.	Призначено для овочевих, плодово-ягідних, декоративних і лісових культур.

Біонорма Деструктор



Біопрепарат для обробки стерні та ґрунту після збирання врожаю зернових, зернобобових, олійних, технічних, овочевих та інших культур

Цільові культури

Зернові, зернобобові, олійні, технічні, овочеві

Діюча речовина

Комплекс грибів *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum* та бактерій *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Paenibacillus polymyxa*.

Цільові культури

Зернові, зернобобові, олійні, технічні, овочеві.

Призначення

Поліпшення розкладання рослинних решток у ґрунті.

Механізм дії

До складу препарату входять мікроскопічні бактерії та гриби, які володіють комплексом корисних в агрономічному аспекті властивостей.

Мікроміцети *Trichoderma harzianum* та *Trichoderma lignorum* – це активні целюлозоруйнівні біоагенти, які володіють здатністю до розкладання рослинних решток. Мікроміцети виділяють комплекс целюлозолітичних ферментів, які починають розкладання стерні одразу після внесення препарату та протягом всього періоду існування грибів у ґрунті. Істотною перевагою мікроміцетів роду *Trichoderma* є їх фунгіцидна активність, що забезпечує знезараження рослинних решток.

Бактеріальна складова препарату БІОНОРМА ДЕСТРУКТОР представлена бактеріями *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Paenibacillus polymyxa*. Ці мікроорганізми є активаторами корисної мікрофлори ґрунту за рахунок синтезу значної кількості біологічно-активних сполук, таких як ферменти, фітогормони, вітаміни та речовини антибіотичної природи, які пригнічують розвиток фітопатогенів.

Комплексна робота бактерій та мікроміцетів, що входять до складу препарату БІОНОРМА ДЕСТРУКТОР, дозволяє прискорити процеси розкладання органічних решток на полі, залишаючи у ґрунті вуглець та азот рослинного походження. На додачу, препарат покращує фітосанітарний стан ґрунту за рахунок пригнічення патогенної мікрофлори та покращення родючості ґрунту, що сприяє підвищенню врожайності культурних рослин від 10 до 30 %.

Способи застосування

Обробка ґрунту, обробка стерні

Норма витрат

- Кукурудза, соняшник, ріпак, буряк – 3-4 л/га
- Зернові, зернобобові – 2 л/га
- Бобові трави – 1 л/га

Ризоактив Концентрат Торф



*Інноваційний інокулянт
для передпосівної обробки
насіння сої*

Діюча речовина

Бульбочкові бактерії
Bradyrhizobium japonicum
eko/001, Bradyrhizobium
japonicum eko/002,
Bradyrhizobium japonicum

eko/003

Цільові культури

Соя

Призначення

Покращення азотного живлення рослин сої шляхом ефективного здійснення процесу біологічної фіксації азоту

Механізм дії

Бульбочкові бактерії, які є біоагентами препарату, вступають у симбіотичні відносини з кореневою системою сої. Завдяки роботі фермента нітрогенази бактерії фіксують атмосферний азот та сприяють його надходженню в рослинний організм у доступній для засвоєння формі.

Особливості застосування

Препарат Ризоактив Концентрат випускається в трьох марках, Р (рідкий), Т (на основі торфу), В (на основі активованого вугілля), завдяки чому може використовуватися для передпосівної обробки насіння в господарствах з різним технічним оснащенням (ручна обробка, безпосередньо в сівалках, обробка за допомогою протруювальних машин). Удосконалені формули усіх трьох марок

забезпечують рівномірний розподіл препарату в масі насіння та гарантоване покриття кожної насінини.

Біоагенти препарату характеризуються

- Підвищеним хемотаксисом до корневих ексудатів широкого спектру сучасних сортів сої, що важливо на початку симбіозу
- Синтезом екзополісахаридів для надійної взаємодії з коренями рослин
- Конкурентоздатністю та вірулентністю
- Високою нітрогеназною активністю, є «сильними азотфіксаторами»
- Синергічними ефектами один з одним, гарантуючи стабільну та ефективну дію препарату

Норма витрат

на 1 т насіння: 2 кг

Ризоактив



Препарат високоактивних, конкурентоздатних бульбочкових бактерій для передпосівної обробки насіння сої

Діюча речовина

Три штамми бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum*

Цільові культури

Соя

Призначення

Покращення азотного живлення рослин сої шляхом ефективного здійснення процесу біологічної фіксації азоту

Механізм дії

Бульбочкові бактерії *Bradyrhizobium japonicum* вступають в симбіотичні стосунки з рослинами сої, здійснюють процес біологічної фіксації азоту, покращуючи їх азотне живлення.

В препараті поєднано три високоактивні штамми азотфіксуючих бактерій *Bradyrhizobium japonicum*, які крім симбіотичних (вірулентність, конкурентоздатність, нітрогеназна активність), характеризуються рядом специфічних властивостей, що забезпечує кращий розвиток кореневої системи. Різні швидкості росту біоагентів підвищують імовірність утворення симбіотичного апарату (бульбочок) в продовж вегетації культури. Також дані штамми володіють високою адаптивною здатністю до різних ґрунтових та погодних умов.

Особливості застосування

Препарат Ризоактив випускається в трьох марках, Р (рідкий), Т (на основі торфу), В (на основі активованого вугілля), завдяки чому може використовуватися для передпосівної обробки насіння в господарствах з різним технічним оснащенням (ручна обробка, безпосередньо в сівалках, обробка за допомогою протруювальних машин)

Норма витрат

Норма витрат на 1 т насіння: 2 л

Біонорма *Pseudomonas*



Препарат захисної та стимулюючої дії з підвищеною антибактеріальною та антигрибковою активністю для захисту від фітопатогенних мікроорганізмів – збудників захворювань культурних рослин

Діюча речовина

Грунтові бактерії *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas putida*

Цільові культури

Зернові, зернобобові, олійні, технічні, овочеві, плодові, ягідні та декоративні

Призначення

Захист культурних рослин від потенційних збудників захворювань бактеріального та грибового походження: фітопатогенних грибів родів *Fusarium*, *Phyrium*, *Helminthosporium*, *Cladosporium*, *Colletotrichium*, *Botrytis*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Septoria* та бактерій родів *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*

Механізм дії

Бактерії, що входять до складу препарату здатні продукувати антибіотики групи феназінів, пірролнітрин та сульфацезин, які пригнічують розвиток фітопатогенів як бактеріального, так і грибового походження. Феназини індукують утворення активних форм кисню всередині клітин усіх фітопатогенних мікроорганізмів, що призводить до їх загибелі. Пірролнітрин порушує осмотичний тиск клітин грибових фітопатогенів, призводячи до їх автолізу. Антибіотик сульфацезин володіє бактеріостатичною активністю, призводить до порушення синтезу тетрагідрофолієвої кислоти, необхідної для синтезу пуринів і піримідинів бактеріальної клітини, тобто основних структурних елементів її ДНК

Способи застосування

Обробка ґрунту, обробка вегетуючих рослин, обробка насіння,
замочування розсади та саджанців

Біонорма Фосфор



Препарат ґрунтових спорових бактерій та мікроміцетів, які характеризуються високою фосфат мобілізувальною активністю, призначений для покращення фосфорного живлення сільськогосподарських культур

Діюча речовина

Ґрунтові спорові бактерії *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens*, мікроміцети *Trichoderma harzianum*

Цільові культури

Зернові, зернобобові, олійні, технічні, овочеві, плодові, ягідні та декоративні

Призначення

Забезпечення повноцінного фосфорного живлення сільськогосподарських культур, підвищення ступеня засвоєння фосфору як з ґрунту, так і з мінеральних добрив. Бактерії – діючі агенти препарату володіють рекордно високою здатністю до синтезу органічних та мінеральних кислот, а також ферментів-фосфатаз, які сприяють переведенню важкорозчинних сполук фосфору в ґрунтовий розчин, доступний для поглинання кореневою системою рослини

Механізм дії

Запорукою ефективності препарату Біонорма ФОСФОР є комплексна дія спорових бактерій *Bacillus megaterium* і *Bacillus amyloliquefaciens* та мікроміцетів *Trichoderma harzianum*.

Мікроорганізми *Bacillus megaterium* і *Trichoderma harzianum* мобілізують неорганічний фосфор завдяки синтезу комплексу органічних та неорганічних кислот, бактерії *Bacillus amyloliquefaciens* мобілізують органічні сполуки фосфати за рахунок продукування ферментів – фосфатаз. Завдяки різноспрямованій дії біоагентів препарату рослині стають доступними всі можливі джерела фосфорного живлення

Способи застосування

Внесення в ґрунт, обробка насіння, замочування розсади та саджанців.

Біонорма Азот



Препарат вільноживучих та асоціативних азотфіксувальних бактерій для покращення азотного живлення широкого кола сільськогосподарських культур

Діюча речовина

Вільноживучі азотфіксувальні бактерії: *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, асоціативні азотфіксувальні бактерії *Azospirillum brasilense*,

Azospirillum lipoferum

Цільові культури

Зернові, зернобобові, олійні, технічні, овочеві, плодові, ягідні та декоративні

Призначення

Забезпечення повноцінного азотного живлення сільськогосподарських культур та розкриття їх природного потенціалу до росту

Механізм дії

Композиція азотфіксувальних бактерій характеризується комплексною дією на рослини.

Вільноживучі азотфіксатори роду *Azotobacter* здатні фіксувати атмосферний азот та накопичувати його у верхньому родючому шарі ґрунту, збагачуючи його азотом в доступній для рослин формі.

Мікроорганізми роду *Azospirillum* є асоціативними азотфіксувальними бактеріями, що колонізують ризосферу та ризоплану рослини. Фіксують атмосферний азот в безпосередній близькості до кореня, сприяють його засвоєнню рослиною, підвищують здатність коренів утримувати воду та посилюють ріст в цілому.

Бактерії, що входять до складу препарату БІОНОРМА АЗОТ, доповнюють дію один одного, забезпечуючи найбільш ефективне накопичення сполук азоту в результаті їх біологічної азотфіксації

Способи застосування

Внесення в ґрунт, обробка насіння, замочування розсади та саджанців.

Азотофїт-Р

Природний стимулятор росту



Склад

Клітини природної азотфіксуючої бактерії *Azotobacter chroococcum*, біологічно активні продукти життє-діяльності бактерій: амінокислоти, вітаміни, фітогормони, фунгіцидні речовини.

Загальне число життєздатних мікроорганізмів продуцента не менше 1×10^{10} КУО/см³.

Культури

Зернові, технічні, бобові, круп'яні, картопля, овочеві, ягідні, садові та декоративні

Ефект від використання

- активно фіксує молекулярний азот атмосфери;
- синтезує рістстимулюючі речовини (БАР, нікотинову кислоту, пантотенову кислоту, піридоксин, біотин, гетероауксин, гібереліни, гормони росту);
- підвищує стійкість рослин до стресових чинників;
- підвищує схожість насіння;
- стимулює розвиток кореневої системи та рослин;
- покращує засвоєння поживних речовин;
- зміцнює імунітет рослин;
- підвищує урожайність.
- виділяє фунгіцидні речовини, які пригнічують ріст фітопатогенної мікрофлори;
- індикатор родючості Ґрунту.

Призначення та застосування

- передпосівна обробка насіння;
- обробка бульб картоплі;
- кореневе підживлення, фертигація;
- позакореневе підживлення (обприскування) рослин в період вегетації.

Обробку насіння та обробку розсади проводити у затінку, уникаючи дії прямих сонячних променів; кореневе та позакореневе

підживлення бажано проводити в безвітряну погоду, вранці або ввечері.

ФітоХелп

біофунгіцид широкого спектру дії, фунгіцид



Біопрепарат із антимікробною та ростстимулюючою дією БІОруйнівник бактеріозів!

Склад

Концентрат бактерій роду *Bacillus* найбільш активних проти грибкових та бактеріальних хвороб, титр не менше ніж 4×10^9 КУО/см³.

Культури

Зернові Бобові Технічні Картопля Овочеві відкритий ґрунт
Овочеві закритий ґрунт Квіти Садові, декоративні Ягідні

Ефект від використання

- захищає від збудників широкого спектру бактеріальних (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*) та грибних хвороб (фітофтороз, борошниста роса, іржа, парша, кокомікоз, макроспоріоз, ризокто-ніоз, пероноспороз, бура плямистість, кореневі та плодові гнилі, фузаріоз, аскохітоз, фомоз, церкоспороз, вертицильоз, пліснява);
- підвищує урожайність культур та поліпшує якість продукції;
- забезпечує антистресову дію до несприятливих умов.

Призначення та застосування

- Передпосівна обробка насіння;
- Обробка розсади овочевих культур перед висаджуванням;
- Обприскування в період вегетації.

Мікохелп

багатофункціональний біофунгіцид, фунгіцид від гнилей



*Багатофункціональний,
багатокомпонентний мікробний
препарат Удар по кореневій гнилі!*

Склад

Сапрофітні гриби-антагоністи роду *Trichoderma*, живі клітини бактерій *Bacillus subtilis*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, біологічно-активні продукти життєдіяльності мікроорганізмів-продуцентів. Загальне число

життєздатних клітин не менше $1,0 \times 10^9$ КУО/см³.

Культури

Зернові Бобові Технічні Картопля Овочеві відкритий ґрунт
Овочеві закритий ґрунт Квіти Садові, декоративні Ягідні

Ефект від використання

- лікування та профілактика грибкових захворювань. Гриби-антагоністи пригнічують розвиток таких фітопатогенів, як: *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Verticillium*, *Sclerotinia*, *Fusarium* та інші, що викликають кореневу, стеблову та плодову гниль;
- стимуляція росту кореневої системи;
- збільшення площі поглинання елементів живлення;
- збереження продуктивної вологи.

Призначення та застосування

- обробка ґрунту;
- передпосівна обробка насіння;
- обробка розсади овочевих культур перед висаджуванням в ґрунт;
- кореневе підживлення рослин;
- обприскування в період вегетації.

Фитоцид-р



Біопрепарат з фунгіцидною дією для захисту рослин від хвороб

Склад

живі клітини та спори природної бактерії *Bacillus subtilis* не менше ніж $1,0 \times 10^9$ КУО/см³, їх активні метаболіти: ферменти, вітаміни, фунгіцид-ні речовини.

Культури

Зернові Бобові Технічні Картопля Овочеві відкритий ґрунт
Овочеві закритий ґрунт Квіти Садові, декоративні Ягідні

Ефект від використання

- захищає рослини від грибкових і бактеріальних збудників хвороб: борошнистої роси, септоріозу, парші, фітофторозу, чорної ніжки, корневих гнилей, гнилей сходів, сажкових хвороб, іржі, фузаріозу тощо;
- стимулює ріст та розвиток рослин;
- зміцнює імунну систему рослин;
- підвищує урожайність сільськогосподарських культур на 20-35%;
- покращує якість продукції рослинництва.

Призначення та застосування

- для передпосівної обробки насіння;
- для обробки розсади овочевих культур перед висаджуванням;
- обприскування рослин у період вегетації.

Склероцид

Біологічний фунгіцид для пригнічення розвитку збудників білої гнилі



Склад

Мікопаразит *Coniothyrium minitans*, гриби-антагоністи: *Coniothyrium minitans*, *Trichoderma harzianum* та бактерії: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* не менше 3×10^9 КУО/мл.

Культура, об'єкт, що обробляється

- Обробка ґрунту та пожнивних решток
- Насіння – соняшник, ріпак, соя
- Позакореневе внесення – соняшник, ріпак, соя, кукурудза, суниця, овочеві

Механізм дії

- високоефективний [захист](#) проти збудників білої гнилі (склеротинії) *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum* завдяки унікальній селективності *Coniothyrium minitans* по відношенню до склероцій грибів роду *Sclerotinia* та властивостям *Coniothyrium minitans* та *Trichoderma harzianum* проявляти гіперпаразитизм до грибів роду *Sclerotinia*;

- знешкоджує патогена на стадіях міцеліального росту та склероції;

- *Trichoderma harzianum*, *Bacillus licheniformis* та *Bacillus subtilis* здатні не тільки зупиняти склеротиніоз у ранній фазі, а також боротися із супутніми інфекціями (фузаріозом, альтернаріозом, септоріозом), завдяки властивості конкурувати з патогенами за їжу, місце існування та синтезувати природні антибіотики;

- відсутність фітотоксичності (добре переноситься рослинами незалежно від стадії розвитку культури);

- підсилення імунітету рослин та оздоровлення ґрунту.

Призначення та застосування

- для обробки ґрунту та пожнивних решток;

- для передпосівної обробки насіння сої, соняшнику ріпаку, кукурудзи;
- для обробки посівів – позакореневе підживлення (обприскування);
- фертигація (стрічкове внесення) у період вегетації.

Обробка Ґрунту та пожнивних решток: проводять робочим розчином біопрепарату після збору урожаю, та за 15 – 40 діб до посіву чи висаджування сільсько-господарських культур. Обов'язковою умовою є наявність вологи в ґрунті – не менше 25-35% від повної вологості за температури ґрунту 5-28 °С.

Для підвищення дії біопрепарату бажано СКЛЕРОЦИД® вносити з деструктором Екостерн® в нормі 1,5 л/га. При використанні у баковій суміші СКЛЕРОЦИД® додають в останню чергу.

Передпосівна обробка насіння: проводять у затінку (уникаючи дії прямих сонячних променів) обприскуванням робочим розчином препарату СКЛЕРОЦИД® насіння у день висіву. Обробку насіння проводять вручну, обприскувачем або машинами для протруєння. Оброблене насіння висівають одразу або просушують в затіненому місці до сипучого стану.

Позакореневе підживлення (обприскування) у період вегетації: проводять робочим розчином біопрепарату в безвітряну погоду вранці або ввечері обприскувачем, дощувальною установкою.

Фертигація (стрічкове внесення): проводять через систему краплинного зрошення.

Перед використанням біопрепарат ретельно збовтують, потім нормовану кількість препарату розчиняють у необхідному об'ємі води! Робочий розчин біопрепарату готують перед обробкою, за необхідності зберігають **в прохолодному темному місці не більше 4-х годин**, безпосередньо перед використанням перемішують для однорідності.

Актоверм Формула®



Біопрепарат з інсектицидною та акарицидною дією

Склад

життєздатні клітини бактерій *Bacillus thuringiensis*, ендоспори – титр 2×10^9 КУО/см³ та біологічно активні продукти

життєдіяльності бактерій: білкові кристали і термостабільний екзотоксин.

Культури

Зернові Бобові Технічні Овочеві відкритий ґрунт Овочеві закритий ґрунт Садові, буряк

Ефект від використання

- забезпечує захист рослин від комах-шкідників;
- має подовжений період дії, не викликає звикання у комах-шкідників;
- тривалість між обробкою та першими ознаками його дії 1-3 дні;
- тривалість захисної дії до 14 днів;
- не накопичується в рослинах і ґрунті;
- біопрепарат кишкової дії.

Призначення та застосування

Рекомендується застосовувати для знищення павутинного кліща, колорадського жука, попелиць, трипсів, біланів, совок, білокрилки, плодожерок, молі, листовійок, п'ядунів тощо на сільськогосподарських, садових, декоративних культурах та квітах відкритого і закритого ґрунту. Біопрепарат застосовують для боротьби з личинками різного віку та з імаго шкідників.

Особливості застосування:

1. Рекомендується застосовувати для знищення павутинного кліща, колорадського жука, попелиць, трипсів, біланів, совок, білокрилок, плодожерок, молі, листовійок, п'ядунів тощо на

сільськогосподарських, садових, декоративних культурах та квітах відкритого і закритого ґрунту.

2. Біопрепарат для боротьби з личинками різного віку та імаго шкідників.

Особливості застосування:

- Обприскування проводять в період вегетації рослин за наявності шкідників. Проти попелиць захисні заходи доцільно проводити за заселення рослини шкідником не вище 10% дорослих особин.
- Інтервал між обробками 7-14 днів.
- Біопрепарат застосовують у вигляді розчину, приготовленого в день обробки.
- Необхідну норму препарату ретельно розмішують у воді з температурою від 15 °С до 25 °С.
- Робочий розчин слід використати зразу після приготування або зберігати не більше 5 – 6 годин в захищеному від світла місці.
- Для рослин відкритого ґрунту обробку бажано проводити у суху безвітряну погоду, уникаючи дії прямих сонячних променів, вранці або ввечері.
- Оптимальна температура повітря для обробки від 18 °С до 35 °С.
- Біопрепарат сумісний в баковій суміші з прилипачами, стимуляторами росту та іншими засобами захисту рослин біологічної та хімічної природи, крім тих, що мають лужну реакцію.
- Остання обробка – за 5 дні до збору урожаю.
- Термін ізоляції бджіл 1 доба.

Бітоксубацилін-БТУ



Біоінсектицид для захисту рослин від комах-шкідників, їхніх личинок та кліщів

Склад

життєздатні клітини бактерій *Bacillus thuringiensis*, ендоспори – титр 1×10^9 КУО/см³ та біологічно активні продукти життєдіяльності бактерій: білкові кристали (ендотоксини) і термостабільний екзотоксин.

Культури

Овочеві закритого Ґрунту Овочеві відкритого Ґрунту Зернові Бобові Технічні Садові та ягідні Декоративні

Ефект від використання

- забезпечує захист рослин від комах-шкідників;
- має подовжений період дії, не викликає звикання у комах-шкідників;
- не накопичується в рослинах і Ґрунті;
- тривалість між обробкою та першими ознаками його дії 1-3 дні;
- тривалість захисної дії до 14 днів.
- біопрепарат кишкової дії.

Призначення та застосування

Рекомендується застосовувати для знищення павутинного кліща, колорадського жука, попелиць, біланів, совок, білокрилок, плодожерок, молі, листовійок, п'ядунів тощо на сільськогосподарських, садових, декоративних культурах та квітах відкритого і закритого Ґрунту. Біопрепарат застосовують для боротьби з личинками різного віку та імаго шкідників. Обприскування проводять в період вегетації рослин за наявності шкідників. Проти попелиць захисні заходи доцільно проводити за заселення рослини шкідником не вище 10% дорослих особин. Інтервал

між обробками 7-14 днів. Біопрепарат застосовують у вигляді робочого розчину, приготовленого в день обробки.

Необхідну норму препарату ретельно розмішують у воді з температурою від 15 °С до 25 °С. Робочий розчин слід використати зразу після приготування або зберігати не більше 5 – 6 годин в захищеному від світла місці.

Для рослин відкритого ґрунту обробку бажано проводити у суху безвітряну погоду, уникаючи дії прямих сонячних променів, вранці або ввечері.

Оптимальна температура повітря для обробки: від 18 °С до 35 °С. Біопрепарат сумісний в баковій суміші з прилипачами, стимуляторами росту та іншими засобами захисту рослин біологічної та хімічної природи, крім тих, що мають лужну реакцію. Остання обробка – за 5 дні до збору урожаю. Сумісний в баковій суміші з іншими препаратами. Термін ізоляції бджіл – 1 доба.

Лепідоцид-БТУ



Біоінсектицид для захисту зернових, бобових, овочевих та садових культур, лікарських рослин та квітів від лускокрилих комах

Склад

життєздатні клітини бактерії *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, ендоспори – титр 1×10^9 КУО/см³ та біологічно активні продукти життє- діяльності бактерій: білкові кристали – ендотоксини.

Культури

Овочеві Зернові Бобові Технічні Виноград Садові Ягідні Декоративні

Ефект від використання

- забезпечує захист рослин проти лускокрилих комах-шкідників;
- має подовжений період дії, не викликає звикання у комах-шкідників;
- не накопичується в рослинах і ґрунті;
- біопрепарат кишкової дії;
- тривалість захисної дії до 14 днів.

Призначення та застосування

Для захисту овочевих, садових та декоративних культур, квітів від гусениць лускокрилих шкідників (біланів; капустяної, яблуневої та плодової молі; американського білого метелика; совок; вогнівок; листокруток; кукурудзяного та лучного метелика, пильщиків та ін.)

Для рослин відкритого ґрунту обробку бажано проводити у суху безвітряну погоду, уникаючи дії прямих сонячних променів, вранці або ввечері.

Максимальний захисний ефект досягається за оброблення рослин проти гусениць молодших віків. Застосовують біопрепарат у вигляді

розчину, який готують згідно з нормами, зазначеними у таблиці.

Інтервал між обробками 7-14 днів. Остання обробка – за 5 днів до збору урожаю.

За тривалого періоду яйцекладки і відродження гусениць наступні обробки слід проводити через 5-10 днів. При випаданні рясних опадів обробку повторюють відразу ж після їх закінчення. Оптимальна температура повітря для обробки: від 18 °С до 30 °С; температура водного розчину 12-25 °С.

Для підвищення ефективності до розчину препарату додати біоприлиплювач Липосам® або Енпосам®. Сумісний у баковій суміші з іншими препаратами захисту рослин.

Органик-Баланс



Біопрепарат для стимуляції росту та розвитку сільськогосподарських культур, стійкості до стресів, хвороб, та збалансованого живлення

Склад

- Живі бактерії:
- азотфіксуючі – забезпечують рослини азотом;
- фосфор- та каліймобілізуючі – перетворюють важкорозчинні сполуки на доступні для рослин

форми;

- мікроорганізми з фунгіцидними властивостями – захищають рослини від бактеріальних і грибних хвороб;
- компоненти поживного середовища (макро-, мікроелементи та органічні джерела живлення).

Загальне число життєздатних мікроорганізмів продуцентів не менше $1,0 \times 10^9$ КУО/см³.

Культури

Зернові, технічні, бобові, круп'яні, картопля, овочеві, ягідні, садові та декоративні, квіти

Ефект від використання

- підвищує стійкість рослин до стресових чинників: біотичних, антропогенних, кліматичних, едафічних;
- підвищує стійкість рослин до широкого спектру збудників хвороб;
- підвищує схожість, забезпечує однорідність та дружність сходів;
- забезпечує збалансоване живлення рослин, покращення розвитку;

- покращує якісні показники продукції;
- підвищує врожайність.

Призначення та застосування

- передпосівна обробка насіння;
- обприскування рослин у період вегетації.

Рекомендується застосовувати:

- Завчасно, перед дією стресового чинника для забезпечення стійкості рослин до стресів.

- Одночасно з факторами негативного впливу на рослину для зменшення стресового навантаження.
- Після дії стресового чинника для відновлення ростових процесів.
- Живлення для сприяння здоровому росту.

Біокомплекс-БТУ для овочевих культур



призначений для обробки бульб картоплі, цибулин, для передпосівної обробки насіння і обприскування рослин в період вегетації

Опис: Рідина від кремового до коричневого кольору зі слабким специфічним запахом.

Склад:

- Бактерії:
 - о азотофіксуючі - забезпечують рослини азотом;
 - о фосфор і каліймобілізуючі - перетворюють важкорозчинні сполуки в доступні для рослин форми: фосфор, калій і ін .;
 - о бактерії з фунгіцидними властивостями, які захищають рослини від бактеріальних і грибкових хвороб.
- біологічно активні продукти життєдіяльності бактерій: фітогормони, вітаміни, антибіотики, фунгіциди, ферменти, амінокислоти, а так само компоненти живильного середовища (макро- і мікроелементи, органічні джерела живлення).

Дія Біокомплексу-БТУ®:

- підвищує енергію проростання насіння
- прискорює процес поява однорідних сходів
- покращує приживлюваність розсади і розвиток рослин
- захищає рослини від широкого спектру збудників хвороб без ефекту звикання;
- підвищує стійкість рослин до впливу негативних природних факторів (посуха, перепади температур) і пестицидів;
- забезпечує рослини амінокислотами, вітамінами, макро- і мікроелементами;

- підвищує імунітет рослин, прискорює дозрівання врожаю;
- покращує хімічний склад продукції (скорочення вмісту нітратів, збільшує кількість білка, крохмалю, цукрів і вітамінів);
- підвищує врожайність на 10-30% і покращує смакові якості плодів
- покращує родючість ґрунту.

Максимальний захисний і ростостимулюючий ефект досягається при поєднанні передпосівної обробки насіння і обприскування рослин в період вегетації.

Біокомплекс-БТУ **для плодових дерев і ягідних культур**



призначений для стимуляції росту і захисту від хвороб.

Склад:

- бактерії:

- о азотифікуючі - забезпечують рослини азотом;

- о фосфор і каліймобілізуючі - перетворюють важкорозчинні сполуки в доступні для рослин форми: фосфор, калій і

інші елементи живлення;

- о бактерії з фунгіцидними властивостями, які захищають рослини від бактеріальних і грибкових хвороб.

- біологічно активні продукти життєдіяльності бактерій: фітогормони, вітаміни, антибіотики, фунгіциди, ферменти, амінокислоти, а так само компоненти живильного середовища (макро- і мікроелементи, органічні джерела живлення).

Дія Біокомплексу-БТУ:

- захист рослин від широкого спектру збудників хвороб без ефекту звикання;

- підвищення стійкості до впливу негативних природних факторів і пестицидів;

- забезпечення рослин амінокислотами, вітамінами, макро- і мікроелементами;

- поліпшення розвитку і скорочення термінів дозрівання;

- поліпшення хімічного складу продукції (скорочення вмісту нітратів, збільшення кількості білка, крохмалю, цукрів і вітамінів);

- підвищення врожайності на 10-30%

- зниження витрати мінеральних добрив, пестицидів та мікроелементів на 15-30%

- поліпшення родючості ґрунту.

Біоінокулянт-БТУ-р для сої



Для інокуляції насіння, сої, гороху та інших бобових культур

Склад

Життєздатні клітини бульбочкових бактерій:

- *Bradyrhizobium japonicum*, симбіотичні до сої, титр від $2,0 \times 10^9$ КУО/см³;
- *Rhizobium leguminosarum*, симбіотичні до гороху, титр від $2,0 \times 10^9$ КУО/см³;
- інші штами бульбочкових бактерій, симбіотичні до певних бобових культур;
- макро- та мікроелементи, біологічно активні продукти життєдіяльності бактерій (вітаміни, гетероауксини, гібереліни тощо).

Ефект від використання

- фіксує атмосферний азот (в умовах симбіозу з бобовими культурами) та перетворює його у форму, доступну для засвоєння рослинами;
- інтенсифікує процеси бульбочкоутворення;
- забезпечує рослини рістстимулюючими речовинами;
- збільшує вміст протеїну;
- підвищує урожайність;
- покращує агрохімічні та фізичні показники ґрунту.

Призначення та застосування

Для інокуляції насіння сої, гороху та інших бобових культур.

Особливості застосування:

- обробку насіння проводять обприскуванням робочим розчином біопрепарату у день висіву;
- оброблене насіння висівають одразу або просушують в затіненому місці до сипучого стану;
- для обробки насіння використовують будь-яке стандартне обладнання;

- обробку насіння проводять у затінку, уникаючи дії прямих сонячних променів;
- внесення в рядок проводять робочим розчином біопрепарату під час сівби;
- мінімальна температура застосування біопрепарату 10 °С, максимальна – не вище 30 °С.

Особливості застосування з протруйниками:

- одночасно з обробкою насіння Біоінокулянт-БТУ®-р можна використовувати малотоксичні протруйники, дозволені до застосування для бобових культур;
- Біоінокулянт-БТУ®-р можна застосовувати з іншими біопрепаратами, біоприлиплювачами та мікроелементами;
- сильнодіючими протруйниками насіння дозволяється обробляти за 5-7 днів до інокуляції в інтегрованому землеробстві. В такому випадку норму біоінокулянту збільшують на 30-50%.

Різолайн

інокулянт для сої, гороху та інших бобових

Для передпосівної інокуляції насіння сої, гороху та інших бобових культур



Склад

Концентрат життєздатних клітин бульбочкових бактерій:

- *Bradyrhizobium japonicum*, симбіотичні до сої, титр $(4,0 - 6,0) \times 10^9$ КУО/см³;
- *Rhizobium leguminosarum*, симбіотичні до гороху, титр $(4,0 - 6,0) \times 10^9$ КУО/см³;
- інші штами бульбочкових бактерій, симбіотичні до певних бобових культур.
- макро- та мікроелементи, біологічно активні продукти життєдіяльності бактерій (вітаміни, гетероауксини, гібереліни тощо).

Ефект від використання

- о фіксує атмосферний азот (в умовах симбіозу з бобовими культурами) та перетворює його у форму, доступну для засвоєння рослинами;
- о інтенсифікує процеси бульбочкоутворення;
- о забезпечує рослини рістстимулюючими речовинами (вітамінами, фітогормонами);
- о збільшує вміст протеїнів, жирів, вітамінів групи В у продукції;
- о підвищує урожайність сої, гороху та інших бобових культур до 15%;
- о покращує агрохімічні та фізичні показники ґрунту;
- о зменшує витрати азотних добрив.

Призначення та застосування

Передпосівна інокуляція насіння сої, гороху та інших бобових культур. Можлива обробка насіння за 1-7 діб до сівби.

Обробку насіння бобових проводять одним із вибраних способів:

- о безпосередньо перед посівом;
- о за 1-7 діб до посіву;
- о внесення інокулянту в рядок при посіві.

Особливості застосування:

- о Біопрепарат РІЗОЛАЙН змішують з біопротектором РІЗОСЕЙВ відповідно до норм, вказаних в таблиці.
- о Після відкриття упаковки, біопрепарат РІЗОЛАЙН необхідно використати протягом доби.
- о Робочий розчин готують в день обробки, при необхідності зберігають в прохолодному темному місці не більше 4-х годин.
- о Обробку насіння проводять у затінку, уникаючи дії прямих сонячних променів.
- о Оброблене насіння просушують в затіненому місці до сипучого стану та висівають або зберігають в захищеному від ультрафіолету приміщенні.
- о Посів проводять у вологий ґрунт.
- о Мінімальна температура застосування біопрепарату 10 °С, максимальна – не вище 30 °С.

Особливості застосування з протруйниками:

Одночасно з обробкою насіння біопрепаратом РІЗОЛАЙН можна використовувати біофунгіци- ди: Мікофренд®, ФітоХелп®, МікоХелп®, Фітоцид® або малотоксичні протруйники, дозволені до застосування для бобових культур.

Сильнодіючими протруйниками насіння дозволяється обробляти за 5-7 днів до інокуляції. В такому випадку норму біопрепарату РІЗОЛАЙН збільшують на 30-50%!

Біоінокулянт-БТУ-т для сої



Для інокуляції насіння сої, гороху та інших бобових культур

Склад

Життєздатні клітини бульбочкових бактерій:

- *Bradyrhizobium japonicum*, симбіотичні до сої, титр від $2,5 \times 10^9$ КУО/г;
- *Rhizobium leguminosarum*, симбіотичні до гороху, титр від $2,5 \times 10^9$ КУО/г;

- інші штами бульбочкових бактерій, симбіотичні до певних бобових культур.
- макро- та мікроелементи, біологічно активні продукти життєдіяльності бактерій (вітаміни, гетероауксини, гібереліни тощо).
- наповнювач – стерильний торф.

Ефект від використання

- фіксує атмосферний азот (в умовах симбіозу з бобовими культурами) та перетворює його у форму, доступну для засвоєння рослинами;
- інтенсифікує процеси бульбочкоутворення;
- забезпечує рослини рістстимулюючими речовинами;
- збільшує вміст протеїну;
- підвищує урожайність;
- покращує агрохімічні та фізичні показники ґрунту.

Призначення та застосування

Для передпосівної обробки насіння сої, гороху та інших бобових культур.

- Насіння змішують з препаратом вручну або в сівалці.
- Після відкриття упаковки Біоінокулянт-БТУ®-т необхідно використати протягом доби.
- Обробку насіння проводити в затінку, або в приміщеннях в день посіву, або за добу до нього.
- Під час транспортування насіння накривають чорною плівкою, брезентом або агроволокном.
- Необхідно уникати потрапляння прямих сонячних променів на Біоінокулянт-БТУ®-т та оброблене насіння.

Екостерн (Ecostern) деструктор стерні



Концентрований препарат, спеціально розроблений для розкладання післяжнивних решток кукурудзи, соняшнику та інших с/г культур, оздоровлення ґрунту та попередження його деградації

Склад

Гриби та бактерії, які прискорюють розкладання поживних решток, антагоністи патогенних мікроорганізмів, живі клітини бактерій *Bacillus subtilis*,

Azotobacter, *Enterobacter*, *Enterococcus* та гриби *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma viride*, загальне число життєздатних клітин $2,5 \times 10^9$ КУО/см³.

Культури

Кукурудза Соняшник Зернові, технічні Бобові Сидерати Овочеві
Опале листя плодових дерев безпосередньо на території саду у період листопаду

Ефект від використання

- ефективно розкладає рослинні рештки;
- збільшує біологічну активність ґрунту;
- оздоровлює ґрунт та запобігає його деградації;
- життєздатність мікроорганізмів не знижується при внесенні з чистим КАС;
- збільшує продуктивність сільськогосподарських культур;
- дія препарату помітна вже через місяць;
- препарат має позитивну післядію.
- має високу концентрацію агрономічно-цінних мікроорганізмів;
- мікроорганізми стійкі в умовах дефіциту вологи;
- має високу стабільність при застосуванні в широкому діапазоні температур.

Призначення

- після збирання урожаю зернових, технічних та інших культур для обробки Ґрунту та пожнив- них решток з метою прискорення їх розкладання;
- пригнічення розвитку фітопатогенів, нейтралізація фітотоксинів та покращення біологічної активності Ґрунту;
- поліпшення фізичних і агрохімічних показників Ґрунту.

Спосіб застосування:

- при застосуванні в інтегрованому землеробстві рекомендовано в бакову суміш вносити азотов- місні водорозчинні добрива у нормі №5-15;
- в органічному землеробстві рекомендовано в бакову суміш вносити Гуміфренд 0,5 – 1,0 л/га;
- обробку бажано проводити вранці або ввечері у безвітряну погоду!

Органік Баланс біодеструктор для no-till, strip-till



Біодеструктор призначений для обробки стерні та ґрунту після збирання врожаю зернових культур, технічних та інших культур, які вирощуються за технологіями no-till, strip-till і традиційною.

Особливості дії і переваги:

- підвищена концентрація мікроорганізмів і їх активних метаболітів забезпечує більш ефективне розкладання залишків, придушення патогенів, нейтралізацію фитотоксинів, що дозволяє проводити посів наступної культури;
- прискорене розкладання залишків забезпечується швидким розмноженням мікрофлори, яка розрушує целюлозу;
- процес розкладання залишків посилюється завдяки активності ферментів широкого спектра дії;
- процес мінералізації нерозчинних мінералів ґрунту: фосфору, калію, інших макро-і мікроелементів поліпшується за рахунок активної життєдіяльності мікрофлори;
- активна життєдіяльність азотфіксуючої мікрофлори підвищує вміст азоту в ґрунті;
- гриби і бактерії, здатні до швидкого заселення залишків, пригнічують розвиток фітопатогенів шляхом прямого паразитизму, конкуренції за субстрат, виділення антибіотиків, активних від широкого спектра грибкових і бактеріальних хвороб (кореневі гнилі, сіра і біла гниль, фузаріозне і вертицильозне в'янення, чорна ніжка, пероноспороз, плямистості, бактеріози і т.д.);
- підвищується загальна біологічна активність ґрунту за рахунок розмноження корисної мікрофлори і синтезу амінокислот, вітамінів, гормонів, що гарантує позитивне післядія препарату;

- спеціальні протектори природного походження підвищують стійкість мікроорганізмів препарату до стресових факторів: покращують його дію в умовах дефіциту вологи, захищають від сонячного опромінення, підвищують стабільність біопрепарату в широкому діапазоні температур;
- системне використання препарату за інструкцією забезпечує бездефіцитний баланс гумусу;
- покращує агрохімічні та фізичні показники ґрунту (рихлість, вологоємність, легкість);
- збільшується продуктивність сільськогосподарських культур на 10-30%;
- ефект від використання препарату видно вже через місяць!

Біодеструктор стерні



Біокомплекс-БТУ для оздоровлення ґрунту та розкладання поживних решток

Склад

- продуценти целюлаз та інших ферментів, що розкладають рослинні рештки;
- природні азотфіксуючі бактерії;
- фунгіцидні бактерії широкого спектру дії;
- фосфор- та каліймобілізуючі Ґрунтові бактерії;
- інша корисна мікрофлора (молочнокислі бактерії);
- фітогормони, вітаміни, амінокислоти.

Культури

Соняшник Кукурудза Зернові Бобові Сидерати

Ефект від використання

- прискорює розкладання рослинних решток;
- пригнічує патогени, які потрапляють у ґрунт з рослинними рештками;
- підвищує загальну біологічну активність ґрунту;
- збільшує продуктивність сільськогосподарських культур;
- покращує якісні показники ґрунту.

Призначення та застосування

• Обробка стерні, інших рослинних решток та Ґрунту після збирання урожаю сільськогосподарських культур, безпосередньо перед культивацією.

• Застосовувати в нічний або вечірній час із заробкою в ґрунт на глибину не менше 10 см.

• При застосуванні в інтегрованому землеробстві рекомендовано в бакову суміш вносити азотовмісні водорозчинні добрива у нормі N5-15.

- В органічному землеробстві рекомендовано в бакову суміш вносити Гуміфренд® 0,5-1,0 л/га

Екостерн Light

деструктор з вологоутримуючими властивостями



Біопрепарат для прискореного розкладання рослинних решток сільськогосподарських культур з вологоутримуючими властивостями

Склад

Мікроорганізми, які прискорюють розкладання поживних решток та продукують велику кількість капсульного слизу - високомолекулярного полісахариду: бактерії *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Paenibacillus polymyxa*, а також неслизові бактерії *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Enterococcus* та гриби *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma viride*. Загальне число життєздатних клітин не менше, ніж 1×10^9 КУО/см³

Культури

Кукурудза Соняшник Зернові, технічні Бобові Сидерати Овочеві

Конкурентні переваги біопрепарату ЕКОСТЕРН® LIGHT

- ✓ має високу концентрацію агрономічно-цінних мікроорганізмів;
- ✓ має вологоутримуючі властивості;
- ✓ покращена фіксація атмосферного азоту, що дає можливість заощадити на витратах мінеральних добрив;
- ✓ очищує ґрунт від важких металів та метаболітів рослин, які викликають ґрунтовтому;
- ✓ мікроорганізми стійкі в умовах дефіциту вологи;
- ✓ має високу стабільність при застосуванні в широкому діапазоні температур;
- ✓ дія препарату помітна вже через місяць;
- ✓ препарат має позитивну післядію.

Призначення

- обробка ґрунту та пожнивних решток після збирання урожаю зернових, технічних та інших культур з метою прискорення їх розкладання;
- утримання вологи на поверхні рослинних решток та у верхніх шарах ґрунту в регіонах з обмеженою кількістю вологи;
- нейтралізація фітотоксинів та покращення біологічної активності ґрунту;
- поліпшення фізичних і агрохімічних показників ґрунту;
- збільшення продуктивності сільськогосподарських культур.

Спосіб застосування:

- при застосуванні в інтегрованому землеробстві рекомендовано в бакову суміш вносити азотовмісні водорозчинні добрива у нормі N₀₋₁₀ д.р.;
- в органічному землеробстві рекомендовано в бакову суміш вносити добриво ГУМІФРЕНД® 0,5 – 1,0 л/га;
- обробку потрібно проводити вранці або ввечері в похмуру погоду;
- після внесення препарату необхідно провести заробку в ґрунт.

Мікофренд®

Мікоризоутворюючий біопрепарат



Склад

- мікоризоутворюючі гриби: Glomus VS, Trichoderma Harzianum;
- мікроорганізми, що підтримують утворення мікоризи та ризосфери рослин: Streptomyces sp., Pseudomonas Fluorescens;
- фосфатмобілізуючі бактерії: Bacillus Megaterium var. phosphaticum, Bacillus Subtilis, Bacillus Muciloginosus,

Enterobacter sp, загальне число життєздатних клітин (1,0 –

Культури

Зернові Кукурудза Технічні Бобові Овочі Ягідні Садові

Ефект від використання

- о активне заселення кореневої та прикореневої зони мікоризними грибами та сапрофітними ризосферними бактеріями;
- о збільшення площі поглинання кореневою системою рослин за рахунок утворення та розвитку мікоризи;
- о вироблення природних антибіотиків заселеними грибами і бактеріями та пригнічення розвитку збудників хвороб (фузаріозу, фітофторозу, альтернаріозу, бактеріозів чорного, базального та ін.) та шкідників (ураження нематодами тощо);
- о забезпечення рослин вітамінами, фітогормонами, амінокислотами;
- о забезпечення рослин збалансованим мінеральним живленням (азотом, фосфором, калієм, кальцієм тощо);
- о покращення схожості насіння, приживання розсади та саджанців.

Призначення та застосування

- о для обробки насіння зернових, зернобобових, технічних, овочевих культур;
- о внесення в рядок, фертигація;

- о для обробки розсади.

Передпосівна обробка насіння

Проводять обприскуванням робочим розчином МІКОФРЕНД®, або замочуванням в ньому насіння у день висіву на 1-2 год. Оброблене насіння висівають одразу або просушують в затіненому місці до сипучого стану.

Обробка розсади та саджанців

Проводять короткочасним зануренням кореневої системи у робочий розчин біопрепарату.

Внесення в рядок

Проводять робочим розчином біопрепарату під час сівби.

Граундфікс фосфор калій мобілізатор



Біодобриво ґрунтове для мобілізації фосфору та калію з нерозчинних сполук, фіксації азоту та підвищення ефективності використання мінеральних добрив

Склад

• клітини бактерії *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*, *Azotobacter chroococcum*, *Enterobacter*, *Paenibacillus polymyxa* загальне число життєздатних клітин (0,5 –

1,5)×10⁹ КУО/см³;

- інша корисна мікрофлора (молочно-кислі бактерії, продуценти ферментів);
- вітаміни, фітогормони, амінокислоти та інші фізіологічно-активні речовини

Культури

Озимі та ярі зернові Озимий ріпак Соняшник Кукурудза Соя, садові овочеві

Ефект від використання

- забезпечує поступове збільшення в ґрунті доступних для рослин рухомих форм фосфору і обмінного калію;
- підвищує коефіцієнт використання поживних елементів з добрив у 1,2-1,5 рази;
- дозволяє зменшити використання добрив до 20%;
- сприяє вільному надходженню в рослини кремнію;
- має позитивну післядію;
- збільшує біологічну активність ґрунту, оздоровлює ґрунт та запобігає його деградації;
- життєздатність мікроорганізмів не знижується при внесенні з чистим КАС;
- підвищує стресостійкість рослин;
- збільшує продуктивність сільськогосподарських культур.

- підвищує доступність і рухомість в Ґрунті фосфору і обмінного калію, а також збільшує кількість різних форм азоту в Ґрунті та добривах;

- поліпшує агрохімічні показники Ґрунту;

- покращує біологічну активність Ґрунту та пригнічує розвиток фітопатогенів.

Призначення

- передпосівне внесення (основний обробіток, культивація);

- внесення в рядок, фертигація;

- ранньовесняне підживлення;

Особливості застосування:

- Препарат вносити із заробленням у передпосівний обробіток Ґрунту.

- Препарат вносити без зароблення при ранньо-весняному підживленні озимих культур.