

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

К.О. Домбровський

ПРИРОДООХОРОННІ ТЕХНОЛОГІЇ

Навчальний посібник

**для здобувачів ступеня вищої освіти магістра напряму підготовки
«Екологія та охорона навколишнього середовища»**

Затверджено
вченою радою ЗНУ
протокол № від .. р.

Запоріжжя
2023

УДК 663.1 (075.8)
К 727

Домбровський К.О. Природоохоронні технології: навчальний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти магістра напряму підготовки «Екологія та охорона навколишнього середовища» / К.О. Домбровський – Запоріжжя: ЗНУ, 2023. – 116 с.

У навчальному посібнику висвітлені завдання та перспективи сучасної біотехнології для вирішення проблем раціонального природокористування та охорони навколишнього природного середовища. Коротко розглянуто історію становлення і розвитку промислової біотехнології. Значну увагу приділено опису способів культивування та зберігання промислових штамів мікроорганізмів, основних етапів біотехнологічного процесу. Детально висвітлено технологічні схеми виробництва біогазу, паливного етанолу, вилуговування металів, бактерійних добрив, біоінсектицидів, біогербіцидів і стимуляторів росту рослин за допомогою мікроорганізмів, а також біотехнологію очищення стічних вод, газоподібних відходів і ґрунту, утилізації твердих відходів.

Посібник містить теоретичні відомості, перелік питань для самоконтролю, тестові завдання для перевірки знань студентів з кожної теми курсу «Природоохоронні технології».

Для здобувачів ступеня вищої освіти магістра напряму підготовки «Екологія та охорона навколишнього середовища».

Рецензент *О.М. Войтович*, к.б.н., доцент, доцент кафедри садово-паркового господарства та генетики

Відповідальний за випуск *О.Ф. Рильський*, д.б.н., професор, завідувач кафедри загальної та прикладної екології і зоології

ЗМІСТ

ВСТУП	5
Тематичний розділ 1. Теоретичні основи біотехнології	7
Тема 1 Промислова біотехнологія: етапи становлення, завдання та перспективи	7
1 Промислова мікробіологія як складова біотехнології.....	7
1.2. Історія розвитку та етапи становлення біотехнології.....	12
Тема 2 Загальна характеристика мікроорганізмів-продуцентів і способи їх культивування	19
2.1. Загальна характеристика мікроорганізмів-продуцентів.....	19
2.2. Особливості й параметри росту мікроорганізмів.....	22
2.3. Отримання і способи зберігання культур-продуцентів.....	23
2.4. Способи культивування культур-продуцентів.....	25
Тема 3. Основні етапи біотехнологічного виробництва	29
3.1. Підготовчий (передферментаційний) етап біотехнологічного процесу.....	29
3.2. Виробничий (ферментаційний) етап біотехнологічного процесу.....	31
3.3. Заключний (постферментаційний) етап біотехнологічного процесу.....	34
Тематичний розділ 2. Промислове використання біотехнології в природоохоронній діяльності	40
Тема 4. Біотехнологія отримання біогазу	40
4.1. Історія і світовий досвід використання біогазу.....	42
4.2. Мікробіологічні і біохімічні основи процесів метаногенезу.....	44
4.3. Типи біогазових установок.....	48
4.4. Перспективи використання біогазу в Україні.....	52
Тема 5. Біотехнологія виробництва етилового спирту і розчинників	56
5.1. Виробництво етилового спирту.....	56
5.2. Біотехнологія одержання паливного етанолу.....	59
5.3. Біотехнологія отримання розчинників.....	60
Тема 6. Біогеотехнологія металів	64
6.1. Новітні тенденції у розвитку біотехнології металів.....	64
6.2. Бактерійне вилуговування металів.....	65
6.3. Біосорбція металів із розчинів.....	69
6.4. Біотехнологія збагачення руд.....	70
6.5. Акумуляція металів зі стічних вод.....	71
6.6. Очищення вугілля в нафти.....	72
Тематичний розділ 3. Екологічна біотехнологія	75
Тема 7. Біологічні методи очищення стічних вод	75

7.1. Очисні споруди, принципи та методи контролю їх роботи.....	75
7.2. Екстенсивні способи очищення стічних вод.....	77
7.3. Інтенсивні способи очищення стічних вод.....	77
Тема 8. Утилізація твердих відходів.....	86
8.1. Утилізація агровідходів.....	86
8.2. Виробництво біогазу як спосіб утилізації агровідходів.....	91
8.3. Утилізація твердих побутових відходів.....	93
Тема 9. Біотехнологія очистки газоподібних відходів і ґрунту.....	96
9.1 Біотехнологія очистки газоподібних відходів.....	96
9.2. Методи очистки ґрунту.....	99
Тема 10. Біотехнологічні альтернативи в сільському господарстві.....	102
10.1. Біотехнологія виробництва бактерійних добрив.....	102
10.2. Виробництво біоінсектицидів і препаратів проти гризунів.....	107
10.3. Виробництво мікробних засобів захисту рослин.....	111
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....	115

ВСТУП

Подальший розвиток суспільства може бути забезпечений тільки на основі інтеграції міждисциплінарних наукових досліджень, спрямованих на розвиток новітніх технологій, що дозволяють вирішувати екологічні, економічні і соціальні проблеми людства. Значна роль у розв'язанні комплексу цих проблем відводиться біотехнології, у рамках якої здійснюється цільове використання біологічних систем і процесів у різних сферах людської діяльності.

Сучасний етап науково-технічного прогресу характеризується революційними змінами в біології, яка вийшла на молекулярний і субмолекулярний рівень. Такі актуальні проблеми як дефіцит чистої води і продуктів харчування, забруднення довкілля, скорочення сировинних і енергетичних ресурсів, не можуть бути вирішені традиційними методами.

У навчальному посібнику висвітлені основні завдання і перспективи сучасної біотехнології у вирішенні проблем раціонального природокористування та охорони навколишнього природного середовища за програмою підготовки студентів-екологів.

Метою викладання навчальної дисципліни «Природоохоронні технології» є формування у студентів теоретичних знань про наукові основи біотехнологічних процесів, що відбуваються за допомогою промислових мікроорганізмів, а також про перспективи їх застосування для раціонального використання природних ресурсів і вирішення екологічних проблем навколишнього природного середовища.

Завданнями вивчення навчальної дисципліни «Природоохоронні технології» є формування у студентів фундаментальних знань з біотехнології для вирішення практичних завдань раціонального використання природних ресурсів і охорони довкілля, для самостійного розв'язання проблем, що постають перед екологом як фахівцем у різних галузях народного господарства.

Згідно з вимогами освітньо-професійної програми, студенти повинні досягти таких *компетентностей*:

- знати та зрозуміти фундаментальні та прикладні аспекти наук про довкілля;
- знати правові та етичні норми для оцінки професійної діяльності, розробки та реалізації соціально-значущих екологічних проектів в умовах суперечливих вимог;
- знати новітні методи та інструментальні засоби екологічних досліджень, у тому числі методи та засоби математичного і геоінформаційного моделювання;
- уміти використовувати концептуальні екологічні закономірності у професійній діяльності;
- уміти вільно спілкуватися державною українською мовою, а також володіти іноземною мовою в науковій, виробничій та соціально-суспільній сферах діяльності;

- уміти доносити зрозуміло і недвозначно професійні знання, власні обґрунтування і висновки до фахівців і широкого загалу;
- уміти використовувати сучасні інформаційні ресурси з питань екології, природокористування та захисту довкілля;
- уміти оцінювати ландшафтне і біологічне різноманіття та аналізувати наслідки антропогенного впливу на природні середовища;
- уміти оцінювати потенційний вплив техногенних об'єктів та господарської діяльності на довкілля;
- уміти використовувати сучасні інформаційні ресурси з питань екології, природокористування та захисту довкілля;
- уміти використовувати сучасні методи обробки і інтерпретації інформації при проведенні інноваційної діяльності;
- вміти впроваджувати, адаптувати та презентувати результати наукових досліджень в відповідні сфери діяльності;
- вміти застосовувати методи та інструменти системного аналізу;
- вміти оцінювати стан та якість атмосферного повітря, водних об'єктів, ґрунтового покриву, геологічного середовища, біоценозів та ландшафтів;
- вміти визначати комплексні показники стану довкілля та контролювати рівень техногенного навантаження на природні та антропогенно-змінені екосистеми;
- володіти основами виконання екологічних досліджень та еколого-експертної оцінки впливу на довкілля;
- обирати стратегію діяльності підприємства із мінімізацією негативного впливу на довкілля.

Курс «Природоохоронні технології» складається з 2-х тематичних розділів.

Тематичний розділ 1. Теоретичні основи біотехнології.

Тематичний розділ 2. Промислове використання біотехнології в природоохоронній діяльності.

Навчальний посібник розроблено з метою організації аудиторної та самостійної роботи студентів, а також контролю рівня засвоєних знань. Матеріал подано в обсязі, який визначений навчальною програмою дисципліни «Природоохоронні технології».

Тематичний розділ 1. Теоретичні основи біотехнології

Тема 1. Промислова біотехнологія: етапи становлення, завдання та перспективи

Мета: сформулювати уявлення про промислову мікробіологію, як складову біотехнології, її зв'язок з іншими науками, історію становлення і етапи розвитку, завдання та перспективи сучасної біотехнології для вирішення проблем раціонального природокористування та охорони навколишнього природного середовища.

План

1. Промислова мікробіологія як складова біотехнології.
2. Історія становлення і етапи розвитку промислової біотехнології.

Основні терміни і поняття: біотехнологія, промислова мікробіологія, біотехнологічні виробництва.

1.1. Промислова мікробіологія як складова біотехнології

Сучасний етап науково-технічного прогресу характеризується революційними змінами в біології, яка стає лідером природознавства. Біологія вийшла на молекулярний і субклітинний рівень, у ній інтенсивно застосовуються методи суміжних наук, системні підходи. Бурхливий розвиток наук біологічного профілю, розширення практичної сфери їх застосування обумовлено також соціально-економічними потребами суспільства. Такі актуальні проблеми, як дефіцит чистої води, сировинних та енергетичних ресурсів, потреба в нових методах діагностики і лікування, не можуть бути вирішені традиційними методами. Наразі існує гостра необхідність у розробці й впровадженні принципово нових методів й технологій.

Уперше термін «біотехнологія» було запропоновано в 1917 р. угорським інженером К. Еріке, який запропонував процес великомасштабного промислового вирощування свиней з використанням у якості кормів цукрового буряку. При цьому він розглядав перетворення сировини (буряку) у цільовий продукт (свинину) як ряд біотехнологічних етапів. Оскільки цільовий продукт було отримано в результаті життєдіяльності біологічної системи, цей процес було названо біотехнологією.

Друге народження і популярність цей термін набув у 1961 році після того як шведський мікробіолог Карл Герен Хеген запропонував змінити назву наукового журналу «Журнал мікробіологічної і хімічної інженерії і технології» на «Біотехнологія і Біоінженерія». Оскільки цей журнал публікував роботи з прикладної мікробіології і промислової ферментації, то з цього моменту біотехнологія була пов'язана із дослідженнями в області промислового виробництва товарів та послуг за участі живих організмів, біологічних систем і процесів.

Таким чином, основою нового наукового напрямку була інтеграція мікробіологічних процесів і хімічної інженерії, що сприяло розвитку великомасштабного виробництва продуктів біологічного походження.

Ефективність біотехнологічного виробництва залежить від управління продуктивністю мікробіологічних процесів, що можливо за умов пізнання молекулярно-біологічних процесів, які відбуваються в мікробних клітинах.

Завдяки інтенсивному розвитку молекулярної біології і біохімії прокаріотичних клітин стали відомими основні етапи синтезу білка в клітині, механізми синтезу РНК на молекулах ДНК, механізми реплікації і кон'югації клітин бактерій. Було виділено і охарактеризовано плазміди, здійснено хімічних синтез генів і сформульовано уявлення про механізм мутагенезу.

Новітні біологічні технології дозволяють здійснювати реконструкцію генетичного апарату мікроорганізмів, яка спрямована на «надпродукцію» тих чи інших цінних біологічних речовин, синтез нових продуктів, що є нехарактерними для даного організму (*наприклад*, інсулін, що продукується клітинами *E. coli* тощо).

У 1983 р. на міжнародному біотехнологічному Конгресі в м. Братиславі було прийнято таке визначення біотехнології:

Біотехнологія – це наука, що розробляє наукові основи великомасштабної реалізації процесів отримання за допомогою каталізаторів різноманітних продуктів і захист навколишнього середовища. У цьому визначенні з'явився важливий аспект для біотехнології – захист оточуючого середовища.

У 1984 р. Європейською Федерацією Біотехнологів було запропоновано наступне визначення біотехнології:

Біотехнологія – це інтегральне використання біохімії, мікробіології та інженерних наук у цілях промислової реалізації здатностей мікроорганізмів, культур тканин, клітин і їх частин.

Біотехнологія – це свідоме виробництво необхідних людині продуктів і матеріалів за допомогою біологічних об'єктів і процесів. Часто до біотехнології відносять дослідження рекомбінантних ДНК і нові процеси, створені при використанні генної інженерії.

За Ю.А. Овчинниковим, **біотехнологія** – це комплексна багатопрофільна галузь науково-технічного прогресу, що включає мікробіологічний синтез у його широкому розумінні, генетичну, білкову і клітинну інженерію, ензимологію.

Зв'язок біотехнології з іншими науками

За своїм походженням науково-технічні галузі можна поділити *на три групи*:

1. Галузі, що виникли на базі вдосконалення традиційних емпіричних виробництв (ливарне виробництво, обробка металу різанням), розвиток яких завжди відбувається еволюційно.

2. Нові галузі, які виникли в результаті впровадження у виробництво фундаментальних наукових знань. Розвиток їх, як правило, революційний і відбувається в результаті виникнення протиріччя між науковим потенціалом і станом техніки. Вони не можуть виникати на базі попереднього виробничого досвіду або емпіричним шляхом. *Наприклад:* атомна енергетика, квантова електроніка, радіоелектроніка й обчислювальна техніка. Природні науки входять до цих галузей в якості суттєвого елемента.

3. Галузі, що виникли на основі традиційних виробництв у результаті докорінного перевороту технології, викликаного взаємодією фундаментальних природничих і технічних наук.

Біотехнологія відноситься до третього типу. Вона виникла в надрах мікробіології на базі традиційних бродильних виробництв.

Складові біотехнології:

1. Генна інженерія (технологія рекомбінації ДНК).
2. Біокаталіз (створення ферментів за допомогою нових принципів виділення, іммобілізації та стабілізації ферментів).
3. Імунологія (одержання моноклональних антитіл).
4. Технологія ферментації (технологія переробки відходів і технологія виробництва харчових продуктів).
5. Біоелектрохімія (технології з очистки виробничих стічних вод).

Науково-технічні напрями, інтегровані з біотехнологією:

1. *Фундаментальні біологічні дослідження:* генетика; біохімія; фізіологія, імунологія, біологія клітини, молекулярна біологія, мікробіологія, біофізика, альгологія, екологія.
2. *Галузеві дослідження:* медичні науки, сільськогосподарські науки; екологічні науки, суспільні науки, фармацевтичні науки.
3. *Технічні науки і технології:* харчові технології, хімічні технології, технічні науки, кібернетика.
4. *Агропромислові та енергетичні проблеми.*
5. *Охорона навколишнього середовища.*

Основні галузі застосування промислової біотехнології

Сучасна промислова біотехнологія знаходить застосування в різних галузях господарства, наукових дослідженнях, медицині, побуті, тощо, а також у вирішенні екологічних проблем і оптимізації довкілля.

1. **Медицина, охорона здоров'я, фармакологія** – використання в медичній практиці біологічно активних речовин і препаратів, таких як антибіотики, ферменти, амінокислоти, кровозамінники, алкалоїди, нуклеотиди, імунорегуляторні препарати, протиракові та противірусні препарати, нові вакцини, гормональні препарати (інсулін, гормон росту), моноклональні антитіла для діагностики, дослідження природи раку і процесів старіння людського організму, продукти для дієтичного харчування.

2. **Отримання хімічних речовин** – етилену, пропілену, бутілену, окиснених вуглеводів, органічних кислот, терпенів, фенолів, акрилатів, полімерів, ферментів, продуктів тонкого органічного синтезу, полісахаридів.

3. **Тваринництво** – удосконалення кормових раціонів (виробництво білка, амінокислот, вітамінів, кормових антибіотиків, ферментів, заквасок (для силосування); виробництво ветеринарних препаратів (антибіотики, вакцини тощо), гормонів росту; створення високопродуктивних порід, пересадка запліднених яйцеклітин та ембріонів, маніпуляції з ембріонами.

4. **Рослинництво** – біораціональні пестициди, бактерійні добрива, гібереліни; виробництво безвірусного посадкового матеріалу; створення високопродуктивних сортів і гібридів стійких до посухи, заморозків, засоленості ґрунту.

5. **Рибне господарство** – кормовий білок, ферменти, антибіотики.

6. **Харчова промисловість** – білок, амінокислоти, замінювачі цукру (аспартат, глюкозо-фруктозний сироп), полісахариди, органічні кислоти, нуклеотиди, ліпіди, переробка харчових продуктів.

7. **Енергетика та видобуток корисних копалин** – виробництво спиртів, біогазу, жирних кислот, аліфатичних вуглеводнів, водню, урану, а також інтенсифікація видобування нафти, газу, вугілля, штучний фотосинтез, біометалургія, добування сірки.

8. **Важка промисловість** – покращення технічних характеристик каучуку, бетонних, цементних, гіпсових розчинів, отримання моторного палива, антикорозійних присадок, змазки для прокатки чорних і кольорових металів, технічного білка і ліпідів.

9. **Легка промисловість** – покращення технології переробки шкіри, виробництво технічної сировини, шерсті, паперу, парфумерно-косметичних виробів, отримання біополімерів, штучної шкіри і вовни тощо.

10. **Біоелектроніка, космонавтика, екологія** – створення замкнених систем життєзабезпечення в космосі, біосенсорів; утилізація сільськогосподарських і побутових відходів; виробництво нешкідливих пестицидів, полімерів, які легко руйнуються; біодеградація токсичних речовин (пестицидів, гербіцидів, нафти), що важко розкладаються; створення замкнених технологічних циклів.

11. **Наукові дослідження** – генно-інженерні й молекулярно-біологічні дослідження (ферменти рестрикції ДНК, ДНК і РНК-полімерази, ДНК і РНК-лігази, нуклеїнові кислоти, нуклеотиди тощо), медичні дослідження (засоби діагностики, реактиви), хімія (сенсори, реактиви).

Основні завдання та перспективи біотехнології

За прогнозами фахівців до 2025 р. населення нашої планети становитиме біля 9 млрд. осіб. Ріст населення призведе до значного зростання потреб у продуктах харчування і енергетичних ресурсів, підвищення попиту й вимог до медичного обслуговування. Це потребує зростання промислового й аграрного виробництва. Так, для забезпечення потреб людства в продуктах харчування, воді, та енергії до 2025 р. на рівні сучасних європейських стандартів необхідно збільшити масштаби виробництва в 10 разів порівняно з теперішнім рівнем.

Однак, зростання виробництва за існуючих технологій неминуче призведе до біосферної катастрофи. Екологічна криза матиме планетарні наслідки, які призведуть до радикальних змін у прояві життя на планеті. Про це уперше було вказано на конференції в Стокгольмі в 1972 р. за участі 106 країн.

Рішення цієї проблеми може бути досягнуто тільки за умов впровадження новітніх технологій, які дозволять мати високий виробничий потенціал і не чинити загрози довкіллю. На думку багатьох фахівців найбільш перспективними є технології, що базуються на властивостях біологічних систем. Це обумовлено тим, що біологічні системи здатні функціонувати з високою ефективністю при низьких тиску і температурах, піддаються контролю, їх активність можна регулювати. Вони компактні, не забруднюють довкілля, бо можуть бути безвідходними.

Новітні технології, засновані на використанні різноманітних, високо специфічних властивостей біологічних систем, дозволять комплексно вирішити глобальні завдання, що стають перед людством:

1. *Забезпечення харчовими ресурсами* – шляхом використання високоефективних технологій отримання біомаси визначеного складу.

2. *Охорона здоров'я* – шляхом розробки нових високоефективних діагностичних тестів, нових лікарських препаратів біологічного походження, способів лікування та профілактики.

3. *Забезпечення енергетичними ресурсами* – шляхом отримання енергії з джерел, що швидко відновлюються.

4. *Відновлення й збереження стану довкілля* – шляхом біологічної утилізації відходів традиційних технологій і розробки безвідходних технологій.

Крім того, біологічні технології знаходять застосування при вирішенні інших завдань, зокрема, у промисловості при вилученні з бідних руд рідкісних хімічних елементів, таких як золото, платина, срібло тощо.

Нова концепція природокористування повинна базуватися на використанні новітніх сучасних технологій, які дозволять зменшити антропогенний тиск на біоценози і розробити коеволюційну систему виживання, тобто сумісної односпрямованої еволюції людини і довкілля.

1.2. Історія становлення та етапи розвитку промислової біотехнології

Питання щодо формування біотехнології трактують неоднозначно: на думку одних вчених (Овчинніков, Баєв, Скрябін), вважається правомірним віднести до сфери біотехнології давні процеси бродіння, включно отримання спирту, силосування; на думку інших (Аїба, Хемфі, Мілліс), умовно датою появи біотехнології можна вважати присудження в 1947 р. компанії «Марк Кемікал Компані» премії Мак-Гро-Хілла за досягнення в області біохімічної технології. Нарешті, існує думка, що початок розвитку біотехнології слід віднести до 70-х років ХХ ст. Вочевидь, правомірно віднести виникнення сучасної біотехнології, яка почала своє формування на базі існуючих галузей мікробіологічної промисловості, до початку 50-х років ХХ ст., а весь попередній етап вважати *передісторією формування біотехнології*.

Передісторію формування біотехнології можна розділити на ряд етапів:

1. Поява емпіричних технологій у VI-му тисячолітті до н.е.
2. Зародження природничих наук у XV – XVII ст.
3. Формування мікробіологічних виробництв і початок взаємодії науки і мікробіологічних виробництв наприкінці XIX – 10-х роках ХХ ст.
4. Створення науково-технічних передумов для виникнення сучасної біотехнології (10-і – кінець 40-х років ХХ ст.).

Першими мікробіологічними процесами, що були використані на практиці, були бродильні виробництва: бродіння використовували при отриманні вина, пива, квасу, хліба, кисломолочних продуктів. З III-IV тисячоліття відомі процеси пектинового бродіння, що лежать в основі вимочування прядильних рослин (льону, конопель). З давнини людство зустрічалось із негативними наслідками діяльності мікроорганізмів (псування продуктів харчування, інфекційні захворювання тварин і людини). Наслідком цього були емпіричні спроби розробки методів і заходів боротьби з цими явищами – методи консервування продуктів.

У другій половині XV ст. починається розвиток сучасного природознавства. На становлення і розвиток біології суттєвий вплив здійснили досягнення хімії, яка в цей період з описової перетворилась у аналітичну. Відбулися зміни уявлень щодо суті процесів бродіння; з'явився термін «ферментація», а процес бродіння почали пов'язувати з присутністю дріжджів і ферментів. У XVI – XVII ст. спочатку у Франції, а потім і в інших країнах для розпушування тіста почали застосовувати дріжджі спиртових виробництв. У Європі почали видобувати мідь у процесах бактерійного вилуговування.

У другій половині XVIII ст. була доведена спроможність одних речовин розкладати інші. Це обумовило розвиток експериментального вивчення унікальної здатності ферментів до каталізу специфічних хімічних реакцій. Таким чином, розвиток описової мікробіології і вивчення хімічних перетворень стали підґрунтям для становлення мікробіології і біохімії.

У XIX ст. з розвитком хімічних наук були закладені основи органічної хімії. У цей період були відкриті більшість органічних кислот, гліцерин,

холестерин, глюкоза, перші амінокислоти, синтез сечовини. Для зародження ензимології велике значення мало вивчення процесів гідролізу полісахаридів.

Значний внесок у вивчення процесів бродіння внесли французькі вчені А. Лавуазьє і Луї Пастер.

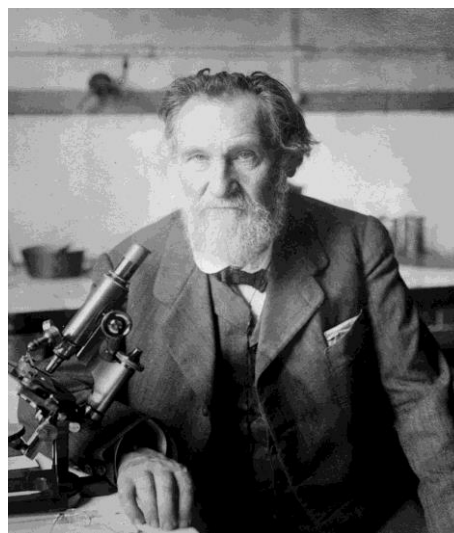
А. Лавуазьє (хімік) першим наблизився до розуміння ролі дріжджів у процесах спиртового бродіння (з цукру).

Значний вплив на формування наукових основ мікробіологічних виробництв мали праці **Луї Пастера** (1822–1895), який на прохання уряду Франції вивчав причини порушення технологічних процесів у ряді виробництв. Л. Пастер зробив ряд фундаментальних відкриттів, які заклали фундамент сучасної технічної мікробіології. Саме його вважають засновником промислової мікробіології. Він довів, що хвороби, псування продуктів, бродіння і гниття викликають мікроорганізми і створив теорію про екзогенність потрапляння цих організмів у середовище. Цим було доведена неспроможність теорії самозародження мікроорганізмів, яка панувала на той період. Праці Луї Пастера заклали наукові основи виноробства, пивоваріння, виробництва спирту й оцту, боротьби з інфекційними хворобами.

У 1857 р. Луї Пастер відкрив дріжджі, що викликають спиртове бродіння. Він довів, що утворення молочної кислоти із цукру може протікати тільки за наявності живих дріжджів і є результатом особливої форми їхньої життєдіяльності без доступу повітря. Пізніше він відкрив маслянокисле бродіння й довів, що збудниками маслянокислого бродіння є анаеробні бактерії (рухливі циліндричні прямі палички із закругленими кінцями). Саме Луї Пастер увів у біологію терміни *«аеробний»* і *«анаеробний»* для позначення життя за наявності кисню та без нього.



Луї Пастер (1822–1895)



І.І. Мечников (1845–1916)

Досліджуючи процеси бродіння, він довів, що різні його види – спиртове, молочнокисле, маслянокисле – є результатом діяльності певних груп мікроорганізмів, і описав окремих збудників цих процесів.

Праці Луї Пастера були поштовхом для **розвитку мікробіологічних виробництв**, у основі яких лежать процеси бродіння. Луї Пастер на прохання французьких виноробів вивчав процеси скисання вина та пива. У 1866 р. він опублікував працю «Дослідження вина», у якій довів, що псування вина спричинене діяльністю оцтовокислих бактерій. Для боротьби із «хворобами» вина він запропонував прогрівати вино до 60-70⁰С після того, як воно розлите в пляшки. Продукт не втрачав якості, а бактерії при цьому гинули. Цей метод дістав назву **«пастеризація»**, його широко застосовують для стерилізації харчових продуктів.

Значним досягненням цього періоду була розробка метода чистих культур, а також удосконалення середовищ для виділення й культивування мікроорганізмів. Чисті культури стали використовувати в мікробіологічних виробництвах.

Роберт Кох (1843–1910) – німецьких мікробіолог, розробив технології мікробіологічних виробництв. Він розробив методи посіву на щільні середовища та виділення культур мікроорганізмів у чисту культуру; увів у практику забарвлення мікробів аніліновими фарбниками, імерсійну систему мікроскопування і мікрофотографію.

Велике значення мали роботи з вивчення мікробного антагонізму й використання його в медицині. **І.І. Мечниковим** (1845–1916) було створено вчення про антагонізм мікробів і науково обґрунтовано рекомендації щодо його практичного застосування.

У цей період активно вивчалися процеси азотфіксації. Німецькі вчені Гельригель і Вильфарт установили біологічну природу процесу фіксації азоту бобовими рослинами, а М. Бейеринк виділив чисту культуру бульбочкових бактерій і довів їх присутність у ризосфері рослин. Виробництво бактерійних препаратів бере початок з досліджень учених С.М. Виноградського, М. Бейеринка, В. Л. Омелянського, які вивчали мікроорганізми ґрунту і їхнє практичне застосування.

М. Бейеринк – голландець – досліджував ґрунтову мікрофлору, відкрив аеробний азотфіксатор *Az. chroococcum*.

С. М. Виноградський (1856–1953) запропонував створювати специфічні (селективні) умови, які дають можливість переважно розвиватися певній групі мікроорганізмів. Він виділив з ґрунту бактерій хемолітотрофної групи (бактерії, які в якості єдиного джерела вуглецю використовують CO₂, а енергію дістають у результаті окиснення неорганічних сполук: відновлених сполук азоту, заліза, сірки, молекулярного водню). С.М. Виноградський відкрив здатність деяких бактерій засвоювати (фіксувати) атмосферний азот, виділив з ґрунту *Clostridium pasteurianum*, який є анаеробним азотфіксатором.

В. Л. Омелянський (1867–1928) – учень і співробітник С.М. Виноградського. Вивчав процеси нітрифікації, розкладу целюлози. Написав перший підручник «Основи мікробіології» та практикум з мікробіології. В.Л. Омелянський разом із В.А. Ніколаєвим і Г.Л. Селібер розробили наукові основи бродіння тіста.

Роботами С.М. Виноградського, В.Л. Омелянського, Б.Л. Ісаченка були закладені основи геологічної мікробіології, почалося вивчення ролі мікроорганізмів у перетворенні сірки, заліза, кальцію тощо.

Б. Л. Ісаченко (1871–1948) – автор численних праць про роль мікроорганізмів у кругообігу речовин у водоймах, що мало значення для створення мікробоценозів очисних споруд.

Л. Й. Рубенчик (1896–1988) – український вчений, досліджував участь мікроорганізмів у кругообігу сірки, зокрема сульфатредуючих бактерій, як основних продуцентів сірководню у водоймах і ґрунті. Його працями було закладено фундамент для розробки процесів біосорбції та осадження металів із розчинних концентратів.

У 70 – 80 рр. ХІХ ст. були закладені основи культивування рослинних клітин і тваринних тканин. Після робіт Шванна і Вірхова, які назвали клітину елементарним організмом, розпочалися експерименти зі збереження життєздатності клітин і тканин у специфічних умовах і середовищах.

У 1865 р. **Г. Мендель** зробив доповідь Товариству дослідників природи про закономірності передачі спадкових ознак. На початку ХХ ст. були введені терміни «мутації», «ген» виникла гіпотеза Сеттона-Бовері про те, що хромосоми є матеріальними носіями ознак спадковості. Російським вченим цитологом Навашиним було розкрито особливості структури хромосом і закладено основи хромосомної теорії спадковості.

Останній період ери передісторії сучасної біотехнології (10-і –40-і роки ХХ ст.) умовно можна розділити на два етапи. На *першому етапі*, на його початку, відбувалось удосконалення технологій існуючих виробництв, а потім на базі успіхів мікробіології, біохімії та інших наук, у результаті принципового вдосконалення апаратури, технологій виникла основа для організації новітніх виробництв. У цей період почали виготовляти екологічно чисті біодобрива, біологічні препарати для боротьби зі шкідниками сільського господарства, виникли виробництва деяких цільових продуктів (органічних розчинників, спиртів), почалися промислові випробування біотехнологічних процесів переробки і використання рослинних відходів.

Саме ХХ століття характеризується великими відкриттями в галузі мікробіологічних виробництв.

Впровадження безперервного способу культивування мікроорганізмів пов'язане з російським вченим, спеціалістом з виноробства і бродильних виробництв, **С. В. Лебедєвим**, який розробив його в 1915 р. для культивування дріжджів.

Автор теорії фізіологічної двофазності бродіння і дослідник динаміки процесів **В. М. Шапошніков** (1884–1968) описав фізіологію молочнокислих, оцтовокислих, маслянокислих ацетобутилових бактерій, що дало можливість суттєво поліпшити технології одержання продуктів їхньої життєдіяльності. На основі його праць було налагоджено виробництво молочної і масляної кислот, ацетону й бутилового спирту. У 1923 р. було налагоджено виробництво лимонної, а далі глюконової та інших органічних кислот.

В. С. Буткевич (1872–1942) – розробив мікробіологічний спосіб отримання лимонної кислоти за допомогою грибів. Роботи про роль мікроорганізмів в утворенні залізо-марганцевих руд.

П. Лінднер (у Німеччині) під час Першої світової війни розробив схему виробництва гліцерину за допомогою гриба *Endomyces vernalis*.

Х. Вайсман (Англія) – розробив технологію отримання ацетону за допомогою бактерій.

Другий етап цього періоду пов'язаний із біотехнологічними методами отримання складних речовин – антибіотиків, ферментів, вітамінів.

Досягненням ХХ ст., яке мало першорядне значення для медицини, було відкриття антибіотиків.

А. Флемінг (1888–1955) – англійський мікробіолог – у 1929 р. відкрив пеніцилін і застосував його в якості антисептика при лікуванні гнійних ран. У 1940 р. **А. Флорі** і **Е. Чейн** (Оксфорд, Англія) одержали перші чисті препарати пеніциліну і довели їх терапевтичну активність, налагоджено виробництво (спільна Нобелівська премія, 1945 р.). У Радянському Союзі пеніцилін вперше відкрили академік **З. В. Єрмольєва** і **Т.І. Балезіна** в 1942 р. з плісеневого гриба *Penicillium crustosum*. У 1940–1944 роках **З. Ваксман** виділив культуру стрептоміцетів – продуцентів стрептоміцину, який виявився дуже цінним для лікування туберкульозу. Російськими вченими Г.Ф. Гаузе, З. В. Єрмольєвою, М.О. Красильниковим були відкриті антибіотики граміцидин С, альбоміцин, бацитрацин, екмолін та ін. Пізніше були розроблені технології виробництва цих та інших антибіотиків у промислових масштабах.

Ера новітніх біотехнологічних процесів, яка виникла впродовж останніх 25-35 років, пов'язана з використанням іммобілізованих ферментів і клітинних органел, а також заснована на методах рекомбінантних ДНК. Розвиток генетичної і клітинної інженерії сприяє тому, що біотехнологія невпинно впроваджується у нові галузі виробництва та різні сфери діяльності людини (виробництво антитіл, інтерферону, протипухлинних хіміопрепаратів).

Виникнення генетичної інженерії умовно відносять до 1972 р., коли в США Бергом була отримана перша рекомбінантна молекула ДНК. Розвиток генетичної інженерії створює можливість конструювання рекомбінантних ДНК і цілеспрямовано створювати штучні генетичні програми. Це дає змогу організувати отримання багатьох важливих препаратів, а також отримання штамів мікроорганізмів-деструкторів промислових токсикантів.

Розвиток промислової мікробіології в Україні в ХХ столітті

Розвиток промислової мікробіології в Україні у ХХ ст. пов'язаний із вченими Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного, який був створений 31 травня 1928 року.

Д. К. Заболотний (1866–1929) – академік, Президент Всеукраїнської академії наук України, засновник Інституту мікробіології і вірусології. У різні роки вченими цього інституту створено антибіотики із рослинної сировини, які

знайшли застосування в медицині та рослинництві (В.Г. Дроботько, К.Г. Бельтюкова, Б.Ю. Айзенман та ін.).

В. В. Смірнов – вивчав механізми антибіотикоутворення у багатьох мікроорганізмів різних систематичних груп. За його участю було одержано антистафілококовий антибіотик батумін і розроблено препарат «Діастаф» для діагностики стафілококових інфекцій.

Є. І. Квасников – створення й впровадження біотехнологію безперервного розмноження дріжджів в умовах резервуарного способу виготовлення шампанських вин.

М. М. Підплічко – проводив дослідження процесів біосинтезу біологічно активних речовин мікроміцетами. Знайдено новий вид грибів (*Penicillium vitale*), на основі якого вченими **В. Й. Білай** і **О. О. Нікольською** розроблено технологію одержання ферментів глюкозооксидази й каталази.

Т. С. Кириленко та ін. знайдено мікроміцети-продуценти альфа-галактооксидази, пероксидази, поліфенолоксидази. Вивчено гідролітичні ферменти, зокрема целюлази, протеолітичні, пектолітичні та ліполітичні ферменти.

К. Г. Бельтюковою проводились дослідження бактерійних хвороб рослин і їх збудників та були винайдені нові методи боротьби зі шкідниками.

Співробітниками інституту інтенсивно вивчались аеробні спороутворювальні бактерії для створення протипухлинних засобів і пробіотиків (Д. Г. Затула). Було створено препарати: біоспорин, бактерин, фітоспорин, гінеспорин, субалін (В.В. Смірнов). Також створено пробіотики й кисломолочні продукти на основі молочнокислих бактерій (Є.І. Квасніков, В. С. Підгорський, Н. К. Коваленко).

Досліджено азотфіксувальні бактерії з метою їх використання для підвищення врожайності бобових, овочевих і технічних культур (К. І. Андріюк, А. Ф. Антипчук) і створено ефективні гранульовані препарати цих мікроорганізмів (І. К. Курдиш).

Дослідження біології мікроорганізмів, що дезактивують високотоксичні катіони важких металів стічних вод (Є.І. Квасніков, В.С. Підгорський), ґрунтів (К.І. Андріюк, Г.О. Іутинська), очищують ґрунти і води від нафтозабруднень.

Г. М. Шавловський (1925–1996) – професор кафедри мікробіології Львівського університету зі співробітниками і учнями вивчав біосинтез рибофлавіну дріжджами р. *Pichia*.

Питання для самоконтролю:

1. Сформулюйте основні завдання та перспективи промислової біотехнології.
2. Розкрийте зв'язок промислової біотехнології з іншими науками.
3. Охарактеризуйте основні етапи становлення біотехнології.
4. Наведіть класифікацію біотехнологічних процесів.
5. Назвіть основні галузі застосування промислової мікробіології.
6. Який внесок наукової діяльності Л. Пастера в галузі промислової біотехнології?

7. Охарактеризуйте основні наукові досягнення С.М. Виноградського, В.Л. Омелянського, Б.Л. Ісаченка.

8. Який внесок вітчизняних вчених у розвиток промислової мікробіології?

Виберіть правильну відповідь:

1. Хто увів терміни «аероби» і «анаероби»?

- А) Р. Кох;
- Б) Л. Пастер;
- В) Дженнер;
- Г) С.М. Виноградський.

2. Засновником промислової мікробіології вважають:

- А) Л. Пастера;
- Б) А. Лавуазьє;
- В) Р. Коха;
- Г) А. ван Левенгука.

3. Які типи бродіння досліджував Луї Пастер?

- А) спиртове;
- Б) молочнокисле;
- В) маслянокисле;
- Г) пропіоновокисле.

4. Ким уперше було запропоновано щільні поживні середовища й анілінові барвники?

- А) Л. Пастер;
- Б) А. Лавуазьє;
- В) Р. Кох;
- Г) А. ван Левенгук

5. Ким уперше було відкрито антибіотики?

- А) А. Флемінгом;
- Б) А. Лавуазьє;
- В) Р. Кохом;
- Г) Флорі та Чейном.

6. Хто відкрив продуцентів стрептоміцину?

- А) А. Флемінг;
- Б) Г. Флорі та Е. Чейн;
- В) З.В. Єрмольєва;
- Г) З. Ваксман.

7. Біотехнологія виробництва лимонної кислоти розроблена:

- А) В.С. Буткевичем;
- Б) В.М. Шапошніковим;
- В) С.М. Виноградським;
- Г) Л.Й. Рубенчиком.

8. Безперервний метод для культивування дріжджів у бродильні виробництва впровадив:

- А) З. Ваксман;
- Б) В.М. Шапошніков;
- В) С.М. Виноградський;
- Г) С.В. Лебедев.

9. Виробництво пробіотиків пов'язано з працями:

- а) З. Ваксмана;
- б) В.В. Смірнова;
- в) С.М. Виноградського.

Виконайте завдання:

1. Побудуйте схему:
 - а) «Структура сучасної біотехнології»;
 - б) «Зв'язок промислової біотехнології з іншими науками».
2. Заповніть таблицю «Галузі застосування промислової біотехнології».

Таблиця

Галузі застосування промислової біотехнології

Галузі застосування	Приклади
1.	
2.	
3. ...	

Тема 2. Загальна характеристика мікроорганізмів-продуцентів і способи їх культивування

Мета: сформувати знання про основні способи отримання, культивування, зберігання та принципи регуляції метаболізму мікроорганізмів-продуцентів, що використовуються в біотехнологічних процесах.

План

1. Загальна характеристика мікроорганізмів-продуцентів.
2. Особливості й параметри росту мікроорганізмів.
3. Отримання і способи зберігання культур-продуцентів.
4. Способи культивування культур-продуцентів.

Основні терміни і поняття: ауксотрофи, чиста культура, культивування, ліофілізації, кріопротектори, мікроорганізми-продуценти, прототрофи, фактори росту, хемостатне культивування.

2.1. Загальна характеристика мікроорганізмів-продуцентів

Мікроорганізми, маючи широкий набір ферментних систем, здатні утворювати в процесі життєдіяльності різні продукти обміну, які є цінними для

людини. Мікроорганізми здатні модифікувати природні та хімічно синтезовані сполуки в речовини, які потребує людина.

Особливого розвитку набули мікробіологічні виробництва в останні роки завдяки детальному вивченню фізіолого-біохімічних і генетичних властивостей мікроорганізмів. Серед бактерій промислове застосування мають прокаріоти різних таксономічних груп. Найширше використовують дріжджі, рідше інші одноклітинні гриби, а також анаеробні та аеробні бактерії. Загалом у виготовленні харчових продуктів використовують понад 70 видів мікроорганізмів-продуцентів.

Різні штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* використовують при виготовленні пива, вина, хліба, отримання етилового спирту. Як джерело білка і вітамінів на нехарчовій сировині використовують дріжджі роду *Candida*.

Плісеневі гриби використовують для отримання органічних кислот: лимонної (*Aspergillus niger*), глюконової (*Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*), ітаконової (*Aspergillus terreus*), фумарової (*Rhizopus nigricans*); антибіотиків – пеніциліну (*Penicillium chrysogenum*, *P. notatum*), та цефалоспорину (*Cephalosporium sp.*); препарати вітаміну В₂ одержують за допомогою *Eremothecium ashbyii*, *Ashbyii gossypii*, а бета-каротин – *Blakeslea trispora*.

Деякі промислові продуценти і продукти, які вони утворюють, представлені в таблиці 2.1.

Для промислового використання штам-продуцент повинен відповідати таким вимогам:

- здатність рости в чистій культурі (зокрема бактерії – без фагів);
- бути генетично стабільними;
- відсутність патогенності й токсиноутворення;
- висока швидкість росту при масовому культивуванні та здатність синтезувати продукт у великій кількості за період не більше трьох діб;
- стійкість до забруднення (контамінації іншими культурами).

Деякі прокаріоти виявляють потребу в одній певній органічній сполуці із групи амінокислот, вітамінів чи азотистих основ, які самі не здатні синтезувати. Такі органічні речовини потрібні в дуже малих кількостях і називаються **факторами росту**, а організми які їх потребують – **ауксотрофами**, на відміну від **прототрофів**, що синтезують усі необхідні їм органічні сполуки. Більшість мікроорганізмів, що використовуються в мікробіологічних процесах, належать до прототрофів. Окремі мікроорганізми є ауксотрофами за кількома факторами росту. Зокрема, деякі молочнокислі бактерії потребують для росту всі амінокислоти, пурини, піримідини та вітаміни групи **В**. У деяких мікроорганізмів (молочнокислі бактерії, окремі штами *E. coli*, дріжджі) потреба у вітамінах є постійною і специфічною ознакою.

Мікробіологічне виробництво базується на використанні ростучих культур відповідних видів. Для отримання деяких продуктів також

використовують суспензії відмерлих клітин та іммобілізовані клітини мікроорганізмів.

Таблиця 2.1

Продукти і продуценти, що їх утворюють
(за Й. Ленгелером, Г. Дреусом, Г. Шлегелем, 2005)

Продукти	Продуценти
Харчові продукти Соління та маринади Кисломолочні продукти Оцет	<i>Lactococcus lactis, Leuconostoc, Pediococcus;</i> <i>Lactobacillus, Streptococcus;</i> <i>Acetobacter xylinum, Acetobacter aceti</i>
Харчові та кормові добавки Глутамат, лізин, інші амінокислоти Вітаміни	<i>Corynebacterium glutamicum,</i> <i>Brevibacterium flavum,</i> <i>Micrococcus, Microbacterium</i> <i>p.Eremothecium, Ashbyii; Propionibacterium;</i> <i>Bacillus subtilis</i>
Ферменти Протеази Амілази Глюкозоізомераза Пеніцилінацидаза	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>B. licheniformis, B. amyloliquefaciens;</i> <i>Actinoplanes missouriensis, Streptomyces sp.</i> <i>Escherichia coli.</i>
Розчинники Етанол Ацетон, <i>n</i> -бутанол Молочна кислота	<i>Saccharomyces cerevisiae, Rhizopus,</i> <i>Zymomonas mobilis</i> <i>Clostridium acetobutylicum;</i> <i>Lactobacillus sp.</i>
Полісахариди Ксантан Декстран Альгірати	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Leuconostoc mesenteroide;</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>
Бактерійні препарати Добрива Ентомопатогенні	<i>Rhizobium sp.</i> <i>Bacillus thuriangiensis</i>
Лікувальні засоби Стероїди Антибіотики Амінокислоти	Мікобактерії, <i>Penicillium chrysogenum, Penicillium notatum,</i> <i>Streptomyces erythraeus,</i> Бактерії роду <i>Bacillus</i>

2.2. Особливості й параметри росту мікроорганізмів

Для характеристики росту мікроорганізмів визначають наступні параметри:

Економічний коефіцієнт – вихід кінцевого продукту по відношенню до використаного субстрату. Розраховують за джерелом вуглецю, азоту або фосфору й оцінюють ріст певного виду мікроорганізмів на різних середовищах.

Метаболічний коефіцієнт – питома швидкість метаболізму чи фізіологічна активність (швидкість використання поживних речовин і, відповідно, швидкість утворення продукту). Є величиною непостійною і визначається швидкістю росту мікроорганізму й умовами культивування.

Питома швидкість росту – приріст біомаси за одиницю часу на одиницю біомаси. Цей параметр є важливою характеристикою як самої культури, так і умов культивування. Лімітуючим фактором є концентрація субстрату, а також нагромадження продуктів обміну.

Величина врожаю (вихід біомаси) культури – це та максимальна кількість клітин, чи біомаси, яку можна одержати за певних умов у одиниці об'єму (кількість клітин у 1 мл або 1 л середовища). Цей показник залежить від умов культивування (рН середовища, температура, аерація).

Час генерації або час подвоєння біомаси (критерій швидкості росту) – це час, протягом якого подвоюється кількість клітин чи біомаси.

Одним із способів вимірювання біомаси є визначення абсолютно сухої ваги клітин ваговим методом. На практиці для оцінки росту найчастіше застосовують непрямі методи визначення біомаси: за вмістом клітинного азоту, білка тощо. Біомасу можна визначити за допомогою оптичних приладів (фотоелектроколориметра, спектрофотометра), вимірюючи оптичну густину суспензії. Інколи підраховують сумарну кількість клітин під мікроскопом у спеціальних лічильних камерах, або лише кількість живих клітин, висіваючи проби на тверді поживні середовища чи спеціальним зафарбовуванням живих або мертвих клітин.

У біотехнологічних виробництвах важливим є наукове керування метаболічними процесами мікроорганізмів для чого використовують два підходи:

- генетичний, який базується на використанні мутагенезу;
- фізіологічний – створення оптимальних умов культивування для росту культур-продуцентів. Використання цього підходу можливе за умови точних відомостей про фізіологічну роль цього процесу для продуцента, шлях синтезу метаболіту, оптимальні умови його синтезу.

Усі мікробіологічні процеси за характером росту культур-продуцентів поділяють на дві групи:

- перша група – продуценти, синтез цінного метаболіту яких пов'язаний із процесами росту культури. Для культивування підбирають умови, оптимальні для росту певної культури.

– друга група – продуценти, синтез метаболітів яких не пов'язаний із процесами росту культури.

Визначення оптимальних умов залежить від фази росту мікробів, у якій відбувається максимальне накопичення певного продукту, що може бути обумовлено підтриманням високої швидкості катаболітних процесів, порушення регуляції поглинання джерела вуглецю, підвищенням проникності цитоплазматичної мембрани. Надсинтез метаболіту в цій групі залежить від лімітуючого фактора (рН, температура, іонна сила, вторинні метаболіти тощо). Значення рН і температури взаємопов'язані: із підвищенням температури діапазон рН звужується, що впливає на ефективність конверсії субстрату в певний продукт.

2.3. Отримання й способи зберігання культур-продуцентів

Отримання посівного матеріалу

Для отримання посівного матеріалу використовують вихідну музейну культуру, що надходить з відповідного інституту чи колекції. Така культура містить молоді ростучі колонії на скошеному агарі або в ампулах (до неї додають паспорт, що містить дані про культуру: продуцент, колекційний номер, серія і дата виготовлення, середня активність серії та термін придатності).

Залежно від виду продуцента, приготування посівного матеріалу проходить у кілька етапів: вихідна культура → ріст на скошеному агаризованому середовищі → вирощування в колбах на струшувачах у рідкому середовищі → посівні апарати → стадія виробничої ферментації.

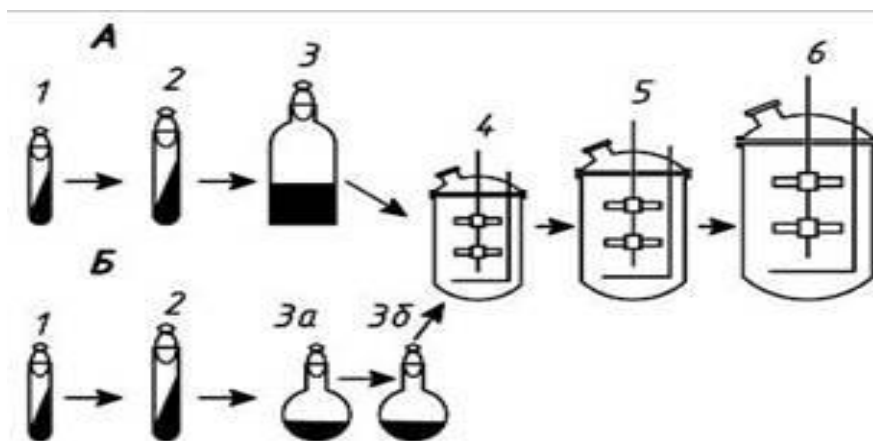


Рисунок 2.1 – Схема вирощування культур-продуцентів у флаконах (А), у колбах на качалках (Б): 1 – законсервований вихідний матеріал; 2 – спорова генерація на скошеному агарі в пробірці; 3 – II спорова генерація на твердому середовищі; 3а і 3б – I і III генерації на рідкому середовищі в колбі; 4 – ферментер попереднього інокулювання; 5 – ферментер інокулювання; 6 – основний ферментер.

Методи зберігання промислових культур

Відомо багато методів зберігання культур мікроорганізмів у життєздатному стані: *періодичні пересіви* (субкультивування), *зберігання при низьких та ультранизьких температурах*, *висушування* (просте і ліофілізоване), *зберігання під мінеральною олією*.

Періодичні пересіви (субкультивування) – систематичні пересіви культур – аспорогенні види пересівають 1-2 рази на місяць; спороутворювальні і мікроміцети – через 2-3 місяці. Культури зберігають у темноті при температур від +5 до +20⁰С. Недоліками цього методу є ймовірність зараження, короткотривалість зберігання, трудомісткість, високі витрати на приготування середовищ.

Зберігання при низьких температурах – з використанням кріопротекторів (гліцерин, глюкоза, сахароза, галактоза, натрій глютамат, натрій аспартат, деякі білки). Густу суспензію мікроорганізмів у середовищі, що містить кріопротектори, поміщають у скляні чи пластмасові ампули із гвинтовими корками, заморожують у рефрижераторах при температурі від -12 до -80⁰С. Культури зберігають у рідкому азоті тривалий час.

Ліофілізація – висушування заморожених клітин у вакуумі. У якості протекторів при ліофілізації використовують прості сполуки (гліцерин, глюкозу, сахарозу, галактозу, натрій глютамат, натрій аспартат) і складні (сироватку крові, білки сироватки, желатину, молоко, бульйон, декстрин, крохмаль, поліетиленгліколь тощо). Використовують як окремі препарати, так і декілька в різних співвідношеннях. Ліофілізацію проводять у спеціальних апаратах, після чого ампули запаюють і зберігають при +4⁰С у темноті. Такі ампули зручно транспортувати. Ліофілізовані клітини зберігають у вакуумі або в атмосфері інертного газу (аргон, неон, гелій, криптон). Так зберігають бактерійні препарати, вакцини, сироватки.

Ліофілізацію краще переносять грампозитивні, ніж грамнегативні бактерії, дріжджі з маленькими клітинами і аскоспорами (рр. *Pichia*, *Lipomyces*), ніж неспороутворювальні великі клітини дріжджів (рр. *Saccharomyces*, *Rhodotorula*). Культури, що не витримують ліофілізації (деякі автотрофні бактерії, спірохети, мікоплазми, різні віруси та закваски молочнокислих бактерій) зберігають у рідкому азоті.

Висушування – (зневоднення мікробних клітин) на адсорбентах – у стерильному ґрунті, піску, глині, силікагелі, на фільтрувальному папері, ваті, скляних і фарфорових частинках, тканинах, пластмасах, тощо. Застосовують для спороутворювальних мікроорганізмів.

Зберігання під мінеральною олією – культуру вирощують на оптимальному твердому середовищі й заливають вазеліновою олією, яка сповільнює швидкість обмінних процесів і запобігає висиханню середовища. Цей метод не потребує спеціального обладнання, проте забезпечує тривале зберігання культур.

2.4. Способи культивування культур-продуцентів

Розрізняють два способи культивування мікроорганізмів: *поверхневий* і *глибинний*.

Поверхнєве культивування (для вирощування грибів) – мікроорганізми вирощують на поверхні тонкого шару рідкого середовища чи твердого субстрату, які в свою чергу за способом посіву поділяються на дві групи:

– посів на поверхню тонкого шару середовища (тонкошарова схема) – субстрат вносять товщиною 2-4 см у металеву або дерев'яну ємність у приміщеннях з гарною аерацією для видалення тепла, що утворюється під час культивування і вологістю 40-70 %.

– глибинний засів – культуру вносять у середовище (субстрат), яким заповнюються на 0,6 чи 1,5-1,8 м прямокутну ємність.

Субстрат – буряковий і виноградний жом, зернова солома, пшеничні та рисові висівки, різні солі тощо.

Глибинне культивування – це головний спосіб, який використовують у мікробіологічних виробництвах. Воно має ряд переваг: менш трудомістке, потребує менше площ, має меншу ймовірність інфікування, його легше автоматизувати, контролювати й отримувати більший вихід продукції.

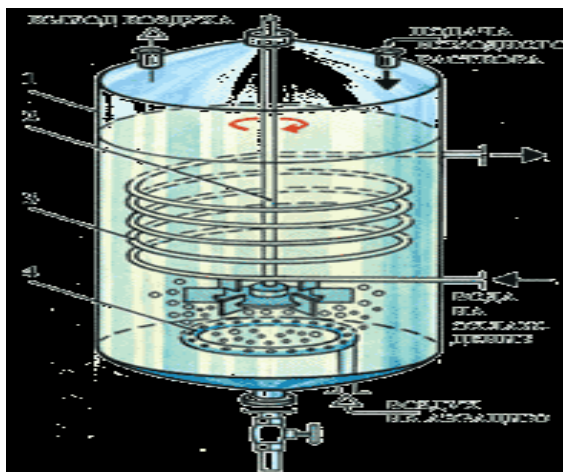


Рисунок 2.2 – Біореактор для періодичного культивування культур-продуцентів

Глибинне культивування може бути *періодичним* і *безперервним*.

Періодичне культивування або стаціонарне – культивування мікроорганізмів у закритому об'ємі без поновлення поживного середовища.

За цих умов популяція мікроорганізмів проходить певний цикл розвитку, для якого притаманна певна зміна фаз або періодів. Послідовна зміна фаз має вигляд S-подібної кривої. Виділяють чотири основні фази росту періодичної культури.

Лаг-фаза – починається з моменту посіву мікроорганізмів у поживне середовище. У лаг-фазі культура адаптується до нових умов культивування: відбувається синтез мРНК, ферментів, чисельність клітин практично не змінюється. Тривалість фази – від декількох хвилин до декількох годин або днів – визначається оптимальними умовами для росту посівного матеріалу і залежить від віку й об'єму культури, складу середовища, умов культивування.

Експоненціальна (логарифмічна) фаза – розпочинається після адаптації культури до нових умов культивування. Під час цього процесу досягається максимальна швидкість росту й біохімічна активність, яка є генетично зумовленою та можливою за певних умов. Збільшення кількості клітин відбувається в геометричній прогресії.

Стаціонарна фаза – спостерігається незначний приріст біомаси (процес розмноження врівноважується процесом відмирання клітин). У цій фазі росту культура менш чутлива до дії фізичних факторів, її біомаса досягає максимального значення. Інтенсивність обмінних процесів у стаціонарній фазі знижується, нагромаджуються в значній кількості вторинні метаболіти і токсичні продукти обміну, вичерпуються поживні речовини, що сповільнює ріст культури.

Фаза відмирання – крива росту йде вниз, бо кількість клітин у культурі помітно зменшується. Починається лізис клітин під дією власних ферментів (*автоліз*). У фазі відмирання в культурі нагромаджується значна кількість ендогенних ауторегуляторних факторів (зокрема ефірів), які впливають на чисельність популяції і перехід вегетативних клітин у стан спокою.

Періодичні культури вирощують на твердих субстратах або в рідкому середовищі: у лабораторних умовах – у скляному посуді різного об'єму в термостатах, у промислових – у ферментерах (біореакторах) різного об'єму.

Для культивування аеробних мікроорганізмів використовують ферментери, оснащені мішалками і системою аерації. Анаеробні бактерії вирощують у спеціальних апаратах – анаеростатах, анаеробних боксах, у спеціальному герметичному посуді в атмосфері азоту або інертних газів (аргону). Фототрофні бактерії потребують світла, тому для їх культивування застосовують термостати, оснащені лампами денного світла – *люменістати*.

Безперервне культивування – це культивування при якому культура мікроорганізмів тривалий час підтримується в стані експоненціального росту.

Перевагами безперервного культивування є: використання спеціального обладнання, стабілізація в часі, поліпшення якості продукту, можливість автоматизації.

Безперервне культивування можна здійснювати різними способами.

Гомогенно-безперервний – процес повного витіснення, який проводять у трубчастому ферментері, у який з одного боку подається середовище і посівний матеріал, а з іншого – витікає культура. Застосовується для отримання харчових продуктів, зокрема пива. Процес проводять при інтенсивному повітряному чи механічному перемішуванні, створюючи умови, що відповідають певній фазі кривої росту. При швидкому заміщенні середовища – це умови експоненціальної фази росту, при повільному – стаціонарної.

Контроль і керування процесами безперервного культивування проводять двома способами: хемостатним і турбідостатним.

Хемостатне культивування – проводять у хемостатах – апаратах, у які із постійною швидкістю надходить свіже поживне середовище і з такою ж швидкістю відбувається відтік культури. У хемостаті протягом тривалого періоду автоматично підтримується постійний урожай культури (вихід молодих клітин), швидкість росту і концентрація компонентів середовища. Хемостатне культивування дає можливість вивчати особливості обміну речовин культур-продуцентів, які залежать від швидкості росту культури або умов середовища. У такій спосіб можна впливати на культуру лімітуючим чи інгібуючим фактором, а також регулювати ступінь цього впливу. *Наприклад*, при виробництві деяких антибіотиків, продуцентами яких є актиноміцети, лімітуючим фактором є дефіцит фосфору, при виробництві пеніциліну – глюкоза, граміцидину С – молекулярний кисень.

Хемостатне культивування має як практичне, так і теоретичне значення, адже дає змогу визначати важливі показники росту і вивчати фізіологічну реакцію культури на лімітуючі фактори, субстрати і їх суміші, що використовують різні культури тощо.

Турбідостатне культивування – проводять у турбідостатах – у середовищі підтримують постійний рівень біомаси мікроорганізмів, який реєструють за оптичною густиною спеціальним приладом, що обладнаний фотоелементом. На відміну від хемостата, ріст мікроорганізмів у турбідостаті здійснюється без зовнішнього лімітування, швидкість нагромадження біомаси визначається швидкістю притоку поживного середовища.

Параметри, що контролюються:

- **фізичні параметри** – температура, тиск, енерговитрати, в'язкість, швидкість струменя повітря й рідини, мутність, маса ферментера;
- **хімічні параметри** – рН, розчинний O_2 ; O_2 і CO_2 у вихідному газі, окисно-відновний потенціал, концентрація субстрату, концентрація продукту, іонна сила розчину;
- **біологічні параметри** – метаболіти, активність ферментів, вміст ДНК, РНК, вміст АТФ і НАДН₂; вміст білка.

Питання для самоконтролю:

1. Назвіть мікроорганізми-продуценти, що використовують у мікробіологічних виробництвах.
2. Які параметри визначають для характеристики росту мікроорганізмів?
3. Назвіть способи зберігання культур-продуцентів.
4. Охарактеризуйте способи культивування культур-продуцентів.
5. Назвіть основні фази росту періодичної культури.
6. Порівняйте хемостатний і турбідостатний способи культивування.
7. Обґрунтуйте переваги безперервного способу культивування.
8. Які параметри середовища контролюються при біотехнологічних процесах?

Виберіть правильну відповідь:

1. Чиста культура – це:

- А) бактеріальні клітини, виділені з різних середовищ;
- Б) популяція мікроорганізмів одного виду, що отримані з ізолюваної мікробної колонії;
- В) клітини одного виду, що отримані з різних середовищ і в різний час;
- Г) бактеріальні клітини, що відрізняються за розміром.

2. Час, за який подвоюється кількість клітин чи біомаси – це:

- А) час генерації;
- Б) врожай (вихід біомаси) культури;
- В) питома активність культури.

3. Яка фаза росту бактерій характеризується станом рівноваги?

- А) лог-фаза;
- Б) лаг-фаза;
- В) стаціонарна фаза;
- Г) фаза відмирання.

4. Для оцінки ефективності процесів росту (ефективності використання компонентів середовища), використовують:

- А) економічний коефіцієнт;
- Б) метаболічний коефіцієнт.

5. Етапи приготування посівного матеріалу:

А) вихідна культура → скошене агаризоване середовище → вирощування в колбах на качалках → посівні апарати → стадія виробничої ферментації;

Б) вихідна культура → вирощування в колбах на качалках у рідкому середовищі;

В) вихідна культура → посівні апарати → стадія виробничої ферментації.

6. Методи для тривалого зберігання культур бактерій (дайте найповнішу відповідь):

- А) ліофілізація, субкультивування і зберігання під вазеліновою олією;
- Б) ліофілізація, зберігання під вазеліновою олією;
- В) зберігання під вазеліновою олією, різні способи висушування, ліофілізація.

7. Обов'язковими умовами культивування аеробів є:

- А) джерела світла та енергії, рН середовища;
- Б) джерело світла, рН середовища, температура;
- В) аерація, температура, світло, джерело живлення;
- Г) джерело живлення та енергії, рН середовища, аерація, температура.

8. Мікроорганізми, які потребують факторів росту – це:

- А) ауксотрофи;
- Б) прототрофи.

9. При періодичному культивуванні...

А) змінюються швидкість росту, фізіологічна активність та морфологічні показники культури;

Б) не змінюються швидкість росту, фізіологічна активність та морфологічні показники культури.

10. Автоклаввання – це:

- А) стерилізація сухим жаром;
- Б) стерилізація кип'ятінням;
- В) дробна стерилізація;
- Г) стерилізація паром під тиском.

Виконайте завдання:

1. Побудуйте схему:
 - а) «Методи зберігання культур-продуцентів»;
 - б) «Способи культивування культур-продуцентів».
2. Заповніть таблицю «Параметри, що контролюються в біотехнологічних процесах».

Таблиця

Параметри, що контролюються в біотехнологічних процесах

Фізичні параметри	Хімічні параметри	Біологічні параметри

Тема 3. Етапи біотехнологічного процесу

Мета: сформувати знання про основні етапи біотехнологічного процесу, завдання, що вирішуються на кожному етапі виробництва; методи виділення, очищення цільового продукту.

План

1. Підготовчий (передферментаційний) етап біотехнологічного процесу.
2. Виробничий (ферментаційний) етап біотехнологічного процесу.
3. Заключний (постферментаційний) етап біотехнологічного процесу.

Основні терміни і поняття: біотехнологічний процес, промислові культури, промислові штами, ферментація, цільовий продукт.

3.1. Підготовчий (передферментаційний) етап біотехнологічного процесу

Підготовчий (передферментаційний) етап біотехнологічного процесу включає вирішення наступних завдань:

1. Постановка завдання, вибір стратегії його вирішення, підготовку технічної документації і технічних інструкцій.
2. Підбір, отримання або придбання культур-продуцентів.

3. Підбір, виробництво або придбання біореакторів або промислових установок.

4. Приготування поживних середовищ і підготовка умов культивування.

5. Нарощування маточних культур-продуцентів.

6. Запуск виробництва.

При розробці стратегії отримання цільового продукту необхідно виходити не тільки з метаболічної активності біологічних систем, але й з потенційних витрат на виробництво цього продукту різними способами, тобто з його рентабельності. Постановка завдання не може бути успішною без всебічного аналізу стану цього питання.

Продуктивність виробничої системи характеризує кількість продукту, що отримують на одиницю об'єму біореактора за одиницю часу із субстрату, який використовується. Продуктивність біотехнологічної системи залежить від багатьох факторів, основними з яких є: активність продуцента; коефіцієнт виходу продукту із використаного субстрату; кількість активної біомаси в біореакторі (тобто, кількість біомаси, що приймає участь в отриманні цільового продукту).

Збільшення виходу продукту дозволяє знизити собівартість цільового продукту, адже значну частину в структурі собівартості складає ціна субстрату (сировини). Важливими показниками ефективності виробництва є такі показники як питомі енергозатрати та непродуктивні витрати субстрату та енергії у процесах біоконверсії.

На вихід продукту впливає організаційні фактори (тип біореактора, кваліфікація спеціалістів), генетичні і біохімічні особливості продуцента.

Основні вимоги до культур-продуцентів, що використовуються в біотехнології:

- високий стабільний вихід цільового продукту;
- невисока ціна середовищ;
- простота культивування;
- висока швидкість росту і вихід продукту за коротких час;
- зберігання характеристик при тривалому культивуванні;
- стійкість до можливих контамінантів (інших мікроорганізмів);
- цільовий продукт повинен відносно легко виділятися;
- безпечність для оточуючого середовища.

Відмінні (від хімічних) особливості біотехнологічних процесів ферментації:

- чутливість продуцентів до фізико-хімічних і механічних впливів;
- забезпечення масопередачі в багатофазних системах;
- тривалість періодичного культивування (8-12 діб);
- дотримання стерильності;
- піноутворення;
- багатокомпонентність живильних середовищ;
- складність механізмів регуляції росту й біосинтезу продуцентів.

3.2. Виробничий (ферментаційний) етап біотехнологічного процесу

Виробничий етап – це сукупність послідовних операцій від початку функціонування об'єкта до завершення процесів росту, біосинтезу або біотрансформації, які можуть бути обумовлені вичерпанням компонентів живильного середовища, старінням культури, зміненням характеристик об'єкта тощо. Для цього в процесі виробництва необхідно контролювати десятки фізико-хімічних параметрів середовища культивування, кількість яких може варіювати залежно від завдання виробництва. Усі необхідні параметри контролюються автоматично і в динаміці. За необхідності, у разі відхилення від заданих характеристик проводиться їх корекція: внесення необхідних компонентів, або їх видалення.

Параметри середовища культивування, що контролюються:

- рН середовища та окисно-відновлювальний потенціал (ОВП);
- тиск та температура в біореакторах;
- рівень і маса середовища культивування;
- рівень рідини та газів;
- швидкість обертання мішалок (для регулювання рівня піни);
- концентрація катіонів і аніонів;
- концентрація солей у живильному середовищі;
- концентрація газів у повітрі.

Основна мета на цьому етапі – забезпечення максимально сприятливих умов функціонування біооб'єкта (максимальне отримання цільового продукту при мінімальних витратах).

Основні завдання виробничого етапу

Серед завдань, які необхідно вирішувати на виробничому етапі, можна виділити наступні:

1. Підтримання й контроль асептичних (стерильних) умов.
2. Створення й контроль умов росту культур (температурний режим, масо- і газообмін, якість поживного середовища – зменшення поживних речовин і збільшення продуктів метаболізму).
3. Концентрація ферментів і білків у культуральній рідині.
4. Відсутність сторонньої мікрофлори.
5. Рівень піноутворення.

Особливості вирішення задач виробничого етапу

1. Підтримання й контроль асептичних (стерильних) умов

У процесі виробничого етапу постійно відбувається газообмін між зовнішнім середовищем і культуральним, тому необхідно дотримуватись умов стерильності, що досить складно при великих об'ємах виробництва.

Рішення цієї проблеми полягає в наступному:

- застосування попередньо очищеного від контамінантів (іншої мікрофлори) повітря за допомогою фільтрів;
- стерилізація поживних середовищ у процесі культивування;
- контроль стерильності умов виробництва.

2. Створення й контроль умов росту культур

Температурний режим. У процесі культивування постійно змінюється температурний режим, тому постійно потрібно або відводити тепло, або, навпаки, підігрівати середовище. Так, у аеробних умовах відбувається тепловиділення, причому чим вище інтенсивність росту культури, тим більша швидкість розігріву культуральної рідини.

Найбільш простим способом відводу тепла є застосування зворотної води через змійовики, водяні сорочки тощо.

Дещо простіше здійснювати контроль підвищення температури: існують різні системи підігріву – електричні, водяні.

Масо- і газообмін. Важливою особливістю біологічних об'єктів є їхня гетерогенність, тобто неоднорідність. Рідке середовище, у якому культивують мікроорганізми, теж є гетерогенним, бо в ньому є рідкі, тверді і газоподібні компоненти (фази). У процесі життєдіяльності клітини утилізують частину компонентів із середовища і постійно виділяють екзометаболіти, тобто вони самі створюють гетерогенність хімічного та газового складу. Таким чином сам об'єкт постійно створює відхилення від оптимальних для нього умов функціонування. Завдання біотехнолога забезпечити максимальну продуктивність об'єкта в штучних умовах шляхом усунення факторів «самознищення».

Забезпечення необхідного масо- і газообміну. Перемішування культур – це складне завдання тому, що інтенсивне перемішування призводить до активного піноутворення, яке є вкрай небажаним явищем. Використання піногасників призводить до проблем, пов'язаних з їх побічною дією і дотримання стерильності.

Забезпечення киснем (аеробних культур) – за рахунок гарної розчинності кисню у воді, або шляхом підвищення парціального тиску кисню в газі. (парціальний тиск – це тиск газу або пари в суміші, який мав би цей газ або пара, якщо він один займав увесь об'єм у суміші).

Забезпечення культивування анаеробів, яке не потребує аерації, пов'язано з вирішенням проблеми видалення кисню із середовища, що досягається введенням у реактор інертного газу або витіснення кисню вуглекислотою, яка виділяється в процесі метаболізму об'єкту, що культивується. Герметизація біореактора створює певні складності, бо утруднює перемішування і теплообмін.

Необхідно постійно здійснювати контроль хімічного складу, вмісту кисню, вуглекислого газу в середовищі культивування, а за необхідності регулюється інтенсивність перемішування.



Рисунок 3.1 – Біореактори, що використовуються в сучасних біотехнологічних виробництвах

3. Склад і якість поживного середовища.

Найважливішим фактором оптимального росту клітинної культури є склад і якість живильного середовища, які динамічно змінюються, що виражається в зменшенні вмісту корисних для клітин речовин і неперервному нагромадженні продуктів метаболізму (екзометаболітів). Крім того, компоненти, що входять до складу поживного середовища, можуть змінюватися з неоднаковою швидкістю, що призводить не тільки до збіднення складу, але й до змінення співвідношення між компонентами.

Контроль складу культурального середовища одне з найскладніших завдань виробничого етапу.

Процес культивування поділяють на: періодичне культивування, безперервне культивування, напівперервне культивування:

– при **періодичному культивуванні** до складу поживного середовища не вводять додаткові компоненти, а після завершення циклу культивування виділяють цільовий продукт (якщо цільовий продукт накопичується в процесі культивування);

– при **безперервному культивуванні** необхідна постійна підтримка заданого стаціонарного стану середовища (контролюється автоматично за допомогою комп'ютерних систем);

– **напівперервний процес культивування** – така система культивування, при якій через певний інтервал часу відбирається частина біомаси і вноситься свіже поживне середовище, що значно збільшує термін культивування. Для цього застосовують автоматичні системи реєстрації і подачі необхідних компонентів у біореактор.

У середовищі культивування контролюються такі параметри:

- температура;
- рН середовища – за допомогою рН-електродів (скляний мембранний електрод);
- тиск – за допомогою мембранних манометрів, що дають пневматичний сигнал, який перетворюється в електричний;

- в'язкість середовища – оцінюють потужність, яка потребує мішалка за різної швидкості обертання;
- уміст кисню – за допомогою гальванічних (потенціометричних) або полярографічних (електрод Кларка) зондів (виміряється парціальний тиск).

4. Контроль стану культури в процесі виробництва

Важливою проблемою є втрата виробничої якості культури, яка може бути з двох причин – аутоелекції і контамінації:

- **аутоелекція** – самовільна селекція клітин у процесі тривалого культивування, основним фактором якого є спонтанні мутації, нестабільність генома в процесі інтенсивного культивування. У результаті можуть втрачатися вихідні властивості культури і промисловий штам може бути втрачено;
- **контамінація** – коли в «чисту культуру» потрапляє культура грибів, або бактерій, що швидко розмножуються і ростуть. Вони можуть досить швидко інгібувати (гальмувати) ріст культури-продуцента.

Методи контролю стану культури:

- морфологічний метод контролю (визначення форми, розмірів, структури клітин);
- генетичний метод контролю (функціональна нестабільність культури).

3.3. Заключний (постферментаційний) етап виробництва

Головним завданням завершального етапу біотехнологічного виробництва є **виділення** та **очистка** цільового продукту. Цей процес ускладнюється тим, що в біомасі знаходяться розбавлені розчини і складна суміш розчинних позаклітинних метаболітів, продуктів розкладу клітин, компонентів поживного середовища. При концентруванні цільового продукту в процесі виробництва відбувається інгібування росту продуцентів та їхня загибель.

У залежності від типу цільового продукту (біомаса або окремі метаболіти – ферменти, гормони, вітаміни) використовують різні типи концентрування та виділення. З огляду на те, що продукти мають біологічну природу (ферменти, гормони, вітаміни тощо), у чистому вигляді вони можуть втрачати свої властивості та активність. Тому для забезпечення їх збереження використовують різні способи стабілізації (висушування, консервацію).

У процесі виробництва біологічні об'єкти не повністю використовують компоненти поживного середовища, проте, вони синтезують велику кількість різних сполук, крім цільового продукту, що може створювати проблеми, пов'язані з їх утилізацією.

Завершальний етап біотехнологічного виробництва включає:

- концентрування продукту;
- виділення й очистку продукту;
- стабілізацію і фасування продукту;
- утилізацію побічних продуктів.

Цільовий продукт – це очищена речовина, суміш речовин або біомаса клітин, що мають господарську цінність і отримуються як кінцевий продукт біотехнологічного виробництва.

Концентрування та виділення цільового продукту

Концентрування – збільшення вмісту продукту в об'ємі за рахунок зменшення вмісту води, залежить від цільового продукту.

До способів концентрування належать наступні:

- *упарювання і висушування* (якщо білково-вітамінний комплекс);
- *седиментація* – осадження часток у полі гравітаційних сил;
- *декантація* – зливання рідини (звіджування);
- *фільтрація*;
- *флотація* – прилипання часточок до бульбашок повітря (піна);
- *центрифугування* – розділення неоднорідних сумішей на компоненти за допомогою центробіжної сили;
- *сепарація*.

Методи виділення цільового продукту:

- *екстракція* – за допомогою органічних розчинників;
- *сорбція* (адсорбція, абсорбція, хемосорбція, десорбція);
- *хроматографічний метод* (газова і рідинна хроматографія; за формою – колонкова, тонкошарова, паперова хроматографія; гель-фільтрація, іонообмінна хроматографія; афінна хроматографія (дуже коштовна) – «хроматографія по середству» – заснована на використанні високої специфічності зв'язування природних сполук: антитіла-антиген, лектин-рецептор, фермент-субстрат.

Основні стадії концентрування й очистки цільового продукту:

1. Видалення великих часток (центрифугування, сепарація).
2. Концентрування цільового продукту (екстракція, флотація, сорбція, осаджування).
3. Очистка цільового продукту (хроматографія, мембранна фільтрація, електрофорез).

Виділення цільового продукту з культурального середовища:

- відділення клітин-продуцентів (сепарація, фільтрація або флотація);
- виділення цільового продукту методом осаджування (спирти, органічні розчинники, висолювання з додаванням сульфату натрію або інші солі) або хроматографії.

Групи методів концентрування й очистки продукту:

1. *Безреагентні методи* (сепарація, центрифугування, фільтрація).
2. *Методи з використанням реагентів* (коагуляція, флотація, флокуляція, хроматографія).

Безреагентні методи дозволяють отримати чистий продукт, але досить трудомісткі, енерговитратні, не завжди високоефективні. Реагентні методи

більш ефективні, але не завжди дозволяють отримати високоякісні й безпечні продукти (можуть бути токсичними).

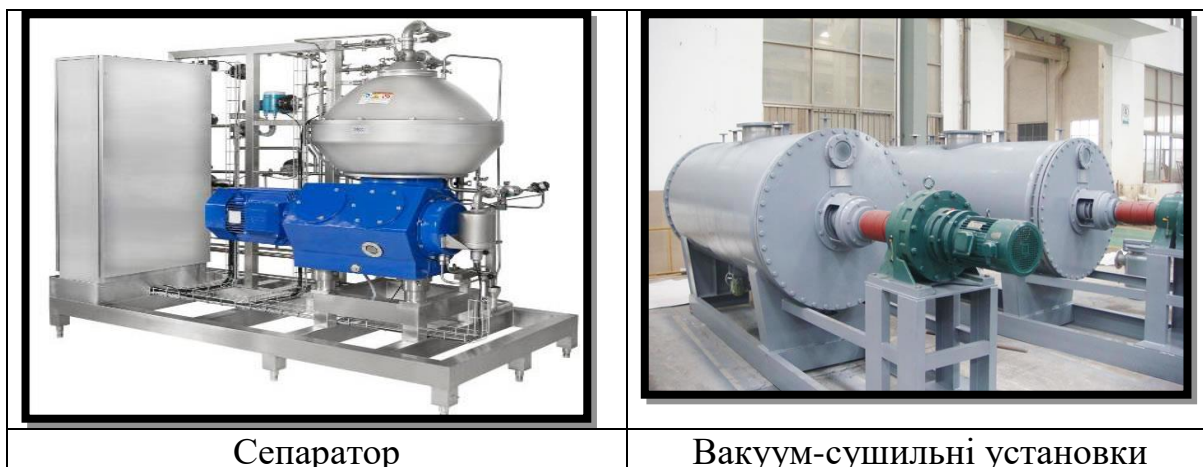


Рисунок 3.2 – Сепаратор і вакуум-сушильні установки

Очистка цільового продукту

Цільові продукти в промисловій мікробіології досить різноманітні: клітини, очищені молекули тощо. Вони представлені двома різновидами:

- біомасою клітин;
- виділеними метаболітами (екзометаболітами).

Для отримання біомаси клітин необхідно відділити клітини від культуральної рідини (сепарація, центрифугування, фільтрація). Культуральна рідина у випадку виділення екзометаболітів обробляється (за схемою) і з неї отримують цільові продукти у вигляді екзометаболітів. У разі, якщо культуральне середовище не використовується, воно є побічним продуктом.

Вибір способу очистки клітинної біомаси залежить від:

- характеристики клітин (розмір, маса, концентрація);
- характеристики культурального середовища (в'язкість, компоненти середовища та їх концентрація);
- область застосування (корм для тварин, харчові продукти, медицина або подальша переробка);
- рентабельність.

Наприклад, хлібопекарські дріжджі – сахароміцети – отримують на основі вуглеводів, концентрують флотацією, після чого клітини збирають фільтруванням на барабанних вакуум-фільтрах. Біомасу збирають з фільтру, пресують і отримують живу біомасу клітин, які здатні зброджуватися.

У разі необхідності очищення біомаси дріжджів, яку вирощують на метанолі, першим етапом очистки є сепарація. Клітини розрізняються за розмірами і масою, тому для отримання біомаси дріжджів 80–90 % чистоти сепарацію необхідно проводити 2-3 рази.

Очистка є досить складною якщо необхідно виділити дрібні клітини або спори бактерій. У цьому випадку вміст реактора упарюють за умов, що забезпечують біологічне збереження клітин (низька температура і вакуум).

Застосовують декілька стадій очистки, що дозволяє отримати продукт у чистому вигляді. Кількість стадій і способи очистки індивідуальні для кожного продукту. Так, наприклад, при отриманні амінокислот, цільовий продукт можна виділити тільки шляхом кристалізації із розчинів, які попередньо очищують, використовуючи хроматографію (катионообмінну з підбором рН середовища). При отриманні ферментів (що містяться в культуральному середовищі) застосовують екстракцію, осаджування з розчину, вилуговування, ліофілізацію.

Останнім часом найчастіше застосовують послідовну ультрафільтрацію крізь мембрани з необхідним розміром пор.

Досить часто в якості цільового продукту використовують *клітинні метаболіти* (гормони, інтерферон та інші БАР, які отримують біотехнологією рекомбінантних ДНК). Першим етапом у виділенні метаболітів клітин – порушення клітинних оболонок за допомогою детергентів (дезінтеграція біомаси). Для цього застосовують методи: *механічні* (гомогенізація, ультразвукова обробка, заморожування-танення), *хімічні* (застосування різних розчинників), *ферментативні, комбіновані*.

Стабілізація та фасування цільового продукту

Як вже було зазначено, вимоги до цільового продукту залежать від області застосування. Так, у разі використання біомаси в тваринництві в якості вітамінно-білкової добавки, вона висушується і фасується в мішки.

Якщо цільовий продукт використовується в якості харчових домішок, то він повинен пройти мікробіологічний контроль, оцінку специфічної поживної цінності й обґрунтування термінів зберігання. Стабілізація цільового продукту повинна вирішувати декілька завдань:

- забезпечення стерильності;
- збереження стабільності;
- рентабельність і зручність під час транспортування.

Найбільш поширеними способами стабілізації є:

- *кристалізація*;
- *висушування* – використовуються розпилювальні та вакуумні системи висушування продукту;
- *заморожування* з використанням кріопротекторів (гліцерину, глюкози, сахарози, лактози);
- *заморожування-висушування* (сублімаційна сушка), використовується для стабілізації фармацевтичних препаратів, діагностичних реагентів, які характеризуються низькою термостабільністю.

Цей спосіб стабілізації має ряд переваг перед методом заморожування-танення:

- дозволяє забезпечити дуже низький вміст вологи і високу стабільність продукту;

- продукт знаходиться в контейнері у вакуумі або інертному газі, що зводить до мінімуму окислювальні процеси.

Процес упаковки готової продукції повинен забезпечити збереження стерильності, стабільності, надійності, зручності при транспортуванні.

Питання для самоконтролю:

1. Сформулюйте основні завдання передферментаційного етапу мікробіологічного виробництва.
2. Які основні вимоги до продуцентів, що використовуються в біотехнологічних виробництвах?
3. Назвіть параметри, які контролюються в середовищі культивування.
4. Сформулюйте основні завдання ферментаційного етапу й особливості їх вирішення.
5. Назвіть причини втрати виробничої якості культур-продуцентів.
6. Сформулюйте основні завдання заключного етапу біотехнологічного виробництва.
7. Назвіть методи виділення цільового продукту.
8. Які способи концентрування культуральної рідини використовують у мікробіологічних виробництвах?
9. Назвіть групи методів виділення цільового продукту.
10. Охарактеризуйте групи методів очистки цільового продукту.
11. Які способи стабілізації є найбільш поширеними?

Виберіть правильну відповідь:

1. Основні завдання, що вирішуються на підготовчому етапі біотехнологічного процесу:

- А) підбір продуцентів;
- Б) підбір умов культивування;
- В) контроль умов росту культур;
- Г) контроль якості середовища;
- Д) контроль масо- і газообміну

2. Для підтримання умов стерильності культурального середовища необхідно:

- А) очищувати повітря за допомогою фільтрів;
- Б) проводити аерацію свіжим повітрям;
- В) проводити стерилізацію середовища;
- Г) контролювати рівень піни;
- Д) контролювати стерильність умов виробництва.

3. Забезпечення необхідного рівня масо- і газообміну досягається шляхом:

- А) перемішування культур;
- Б) аерації;
- В) підвищення парціального тиску кисню у газі;
- Г) введення в біореактор інертного газу;

Д) активного піноутворення.

4. Процес культивування, при якому до складу середовища не вводять додаткові компоненти – це:

- А) періодичне культивування;
- Б) неперервне культивування;
- В) напівперервне культивування.

5. Умови культивування анаеробів:

- А) постійне перемішування;
- Б) аерація;
- В) видалення кисню вуглекислою;
- Г) введення в біореактор інертного газу;
- Д) у товстому шарі середовища.

6. Завершальний етап виробничого процесу – це:

- А) очистка цільового продукту;
- Б) виділення цільового продукту;
- В) концентрування;
- Г) контроль якості сировини;
- Д) стабілізація та фасування.

7. До методів концентрування продукту з використанням реагентів відносяться:

- А) сепарація;
- Б) фільтрація;
- В) хроматографія;
- Г) коагуляція;
- Д) флотація.

8. Для стабілізації фармпрепаратів, діагностичних реагентів, які характеризуються низькою термостабільністю, використовують:

- А) кристалізацію;
- Б) сушку;
- В) заморожування з використанням кріопротекторів;
- Г) заморожування-висушування (сублімаційна сушка).

9. Методи відділення клітин-продуцентів із культуральної рідини:

- А) сепарація;
- Б) фільтрація або флотація;
- В) хроматографія;
- Г) осаджування.

10. Зараження «чистої культури» іншими культурами бактерій чи грибів – це:

- А) аутоелекція;
- Б) контамінація;
- В) інокуляція.

Тематичний розділ 2. Біоенергетика та біологічна переробка мінеральної сировини

Тема 4: Біотехнологія отримання біогазу

Мета: сформувати у студентів теоретичні знання про мікробіологічні та біохімічні основи процесу метаногенезу; традиційні й новітні технології отримання біогазу.

План

1. Історія й світовий досвід використання біогазу.
2. Мікробіологічні та біохімічні основи процесів метаногенезу.
3. Типи біогазових установок .
4. Перспективи використання біогазу в Україні

Основні терміни і поняття: біогаз, метаногенез, метаногени, метантенки, біогазові установки, газгольдер, дайджестер.

Різноманітні природні копалини стрімко вичерпуються. За розрахунками, запасів нафти і газу вистачить тільки до половини першого століття третього тисячоліття. Тому отримання енергії з відновлюваних джерел сировини є актуальною проблемою. Відновлювана сировина – це рослинний світ, де завдяки процесам фотосинтезу, води й діоксиду вуглецю утворюються органічні сполуки. На Землі в рослинному покриві знаходиться 1800 млрд. т сухої речовини, у якій міститься $3,0 \times 10^{22}$ Дж енергії. У той же час запаси нафти, газу, вугілля та урану еквівалентні $2,5 \times 10^{22}$ Дж. Щорічний приріст органічної речовини на планеті становить 2×10^{11} т. З цієї кількості $1,2 \times 10^{11}$ т припадає на долю лігноцелюлозної сировини.

Існує декілька способів перетворення рослинної біомаси в сировину.

1. Найпростіший спосіб перетворення біомаси в енергію полягає в *спалюванні* – воно забезпечує тепло, яке можна перетворити в механічну або електричну енергію.

2. У разі, якщо сировина сира, найбільш ефективним методом є *отримання біогазу*.

3. Енергію можна отримувати з сільськогосподарських культур, які спеціально вирощують з цією метою (плантації дерев, що швидко ростуть, рослини багаті на крохмаль і сахарозу). З такої рослинної біомаси екстрагуються й піддаються гідролізу запасні вуглеводи, які потім шляхом мікробного зброджування перетворюються на спирт. Останнім часом для отримання біопалива широко застосовують рапс.

Отримання палива за схемою «біомаса – біотехнологія» базується на поєднанні фотосинтезу, тваринництва, кормовиробництва й ферментації з використанням тих або інших біологічних агентів.

Найбільш ефективними методами для перетворення сонячної енергії, що засновані на використанні біосистем, вважаються добре розвинені біотехнології перетворення біомаси в енергоносії в процесах біометаногенезу і виробництва спирту, а також новітні розробки, орієнтовані на модифікацію та підвищення ефективності самого процесу фотосинтезу, створення біопаливних елементів, біоелектрокаталіз тощо.

Біометаногенез або метанове «бродіння» – процес перетворення біомаси в енергію.

Біогаз, що отримують з органічної сировини в ході біометаногенезу в результаті розкладання складних органічних субстратів різного походження за участі мікроорганізмів, представляє собою суміш із 65-75% метану і 20-35% вуглекислоти, а також незначної кількості сірководню, азоту, водню (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Хімічний склад біогазу

Газ	Хімічна формула	Об'ємна частка, %
Метан	CH ₄	40-70
Вуглекислий газ	CO ₂	30-60
Інші гази		1-5
Водень	H ₂	0-1
Сірководень	C ₂ S	1-2

Теплоутворювальна здатність біогазу залежить від співвідношення метану й вуглекислоти і складає 5-7 ккал/м³. Відомо, що 1 м³ біогазу еквівалентний 4 кВт/г електроенергії, 0,6 л керосину, 1,5 кг вугілля і 3,5 кг дров.

Продукція біогазової станції на 1 м³ біогазу: 1,5-2,2 кВт/г електроенергії і 2,8-4,1 кВт/г тепла або еквівалент 1 л дизельного палива; 0,3-0,4 м³ вуглекислого газу; 4-4,5 кг сухої речовини добрив; 35-40 л води.

Неочищений біогаз використовують у побуті для обігріву житла й теплиць, приготування їжі, а також використовують у якості палива в стаціонарних установках, що виробляють електроенергію. Газ можна транспортувати й використовувати (після попередньої очистки) в якості пального для двигунів внутрішнього згорання.

У процесах метаногенезу вирішується не тільки проблема виробництва енергії, але вирішуються екологічні проблеми, пов'язані з утилізацією і переробкою відходів різних виробництв і технологій, сільськогосподарських і побутових твердих відходів.

4.1. Історія й світовий досвід використання біогазу

Перші систематичні дослідження біогазу розпочав італійський натураліст **Аллесандро Вольта**. Йому вдалося зібрати в 1770 р. болотяний газ у відкладах озер на півночі Італії, після чого він зайнявся проведенням дослідів зі спалювання цього газу.



Рисунок 4.1 – Перші установки для отримання біогазу

Англійський фізик **Фарадей** експериментував також з болотним газом і ідентифікував його як вуглеводень.

У 1821 р. досліднику **Авогадро** вдалося встановити хімічну формулу метану (CH_4). **Луї Пастер** у 1884 р. проводив випробування з біогазом, який він виділяв з твердого гною. Він вперше запропонував використовувати гній з паризьких стаєнь для виробництва газу для освітлення вулиць.

У 1897 р. у лікарні для хворих на проказу в м. Бомбей (Індія) побудували першу установку, газ якої використовували для освітлення, а в 1907 р. – для живлення двигуна для виробництва електроенергії (рис. 4.1).

У Німеччині інженер з очисних споруд **Імхофф** з 1906 р. на території регіону Рур почав систематичне будівництво анаеробних, двоjarусних установок з очищення стічних вод, що одержали назву «емшерський колодязь».

Екологічна безпечність застосування й калорійність біогазу в поєднанні з нескладними технологіями його отримання, а також великою кількістю відходів, що підлягають переробці – все це є позитивними факторами для подальшого розвитку й поширення біогазової промисловості.

Поштовхом для розвитку даного біотехнологічного напряму була енергетична криза, яка виникла в середині 70-х років минулого століття. Виробництво біогазу стало основним принципом енергетичної політики багатьох країн Тихоокеанського регіону. Так, керівництво Китаю вкладало багато коштів у становлення біогазової промисловості, особливо в сільській

місцевості. В рамках національної програми були створені умови для появи заводів, що випускали біогазові установки. Державні банки надавали населенню пільгові кредити і матеріали для будівництва установок. Починаючи з середини 70-х рр., у Китаї щорічно будувалося близько мільйона метантенків. На початку 80-х рр. в Китаї вироблялося до 110 млрд. м³ біогазу, що еквівалентно 60-80 млн. т сирої нафти, а в середині 80-х років було створено до 70 млн. установок, які забезпечували побутові потреби в енергії 70 % родин. КНР забезпечує 20 % національних потреб в енергії за рахунок біогазу.

Друге місце в світі з виробництва біогазу займає Індія, у якій ще в 30-ті роки була прийнята перша в світі програма з розвитку біогазової технології. На кінець 2000 р. в сільських районах Індії було побудовано понад 1 млн. метантенків, що дозволило поліпшити енергозабезпеченість ряду селищ, їх санітарно-гігієнічний стан, уповільнити вирубку навколишніх лісів і поліпшити якість ґрунту. Сьогодні щоденне виробництво біогазу в Індії становить 2,5-3 млн. куб. м.

Будівництво *біогазових установок* (БГУ) розпочалося на Філіппінах, у Ізраїлі, країнах Латинської Америки. У Непалі була створена й активно функціонує національна біогазова компанія. Біогазові установки успішно працюють у тваринницьких господарствах Японії.

Зацікавленість технологіями біометаногенезу в середині 80-х років минулого століття підсилювався також у країнах центральної Європи, особливо в Німеччині та Франції. Французьким Комісаріатом зі сонячної енергетики в середині 90-х років було виділено 260 млн. франків на створення і поширення біогазових установок у сільській місцевості. Французькими вченими було доведено, що при утилізації і переробці гною тваринницьких ферм можна повністю забезпечити потреби в енергії комплексу з 30 голів великої рогатої худоби або 500 свиней. В середині 90-х років у країнах Європейського економічного союзу функціонувало біля 600 установок з виробництва біогазу з рідких сільськогосподарських відходів і біля 20 для переробки твердого побутового сміття.

Інтегровані національні програми багатьох країн Африки, Латинської Америки, які мають велику кількість сільськогосподарських відходів (понад 90 % світових відходів цитрусових, бананів, кофе; понад 70 % цукрової тростини, біля 40 % відходів худоби), орієнтовані на отримання біогазу.

На сьогодні лідером у виробництві біогазу можна вважати ЄС загалом і Німеччину зокрема. Загальна кількість біогазових установок в Європі перевищує 11 тис. одиниць (7,2 тис. од. у Німеччині). Загальне виробництво біогазу в ЄС вже в 2010 р. складало 10,9 млн. т. (еквівалент 13,5 млрд. м³ природного газу), з них 6,7 млн. т вироблено в Німеччині. При цьому річний приріст склав 31,3 %.

4.2. Мікробіологічні та біохімічні основи процесів метаногенезу

Метанове бродіння (зброджування) являє собою безкисневу біологічну конверсію органічної речовини в біогаз, який складається частіше за все з метану і вуглекислоти.

З біохімічної точки зору метанове бродіння – це процес анаеробного дихання, у ході якого, електрони з органічної речовини переносяться на вуглекислоту; остання відновлюється до метану. При справжньому бродінні кінцевим акцептором електронів слугує молекула органічної речовини, яка є кінцевим продуктом бродіння. Донором електронів для метаногенів є водень, а також оцтова кислота.

У складних процесах біодеструкції складних субстратів і утворенні біогазу приймає участь мікробна асоціація різних мікроорганізмів: *деструкторів*, що викликають гідроліз складної органічної маси з утворенням органічних кислот (масляної, пропіонової, молочної), а також спиртів, аміаку, водню; *ацетогенів*, що перетворюють ці кислоти до оцтової кислоти, водню, окису вуглецю; *метаногени* – мікроорганізми, що відновлюють воднем кислоти, спирти і окиси вуглецю до метану.

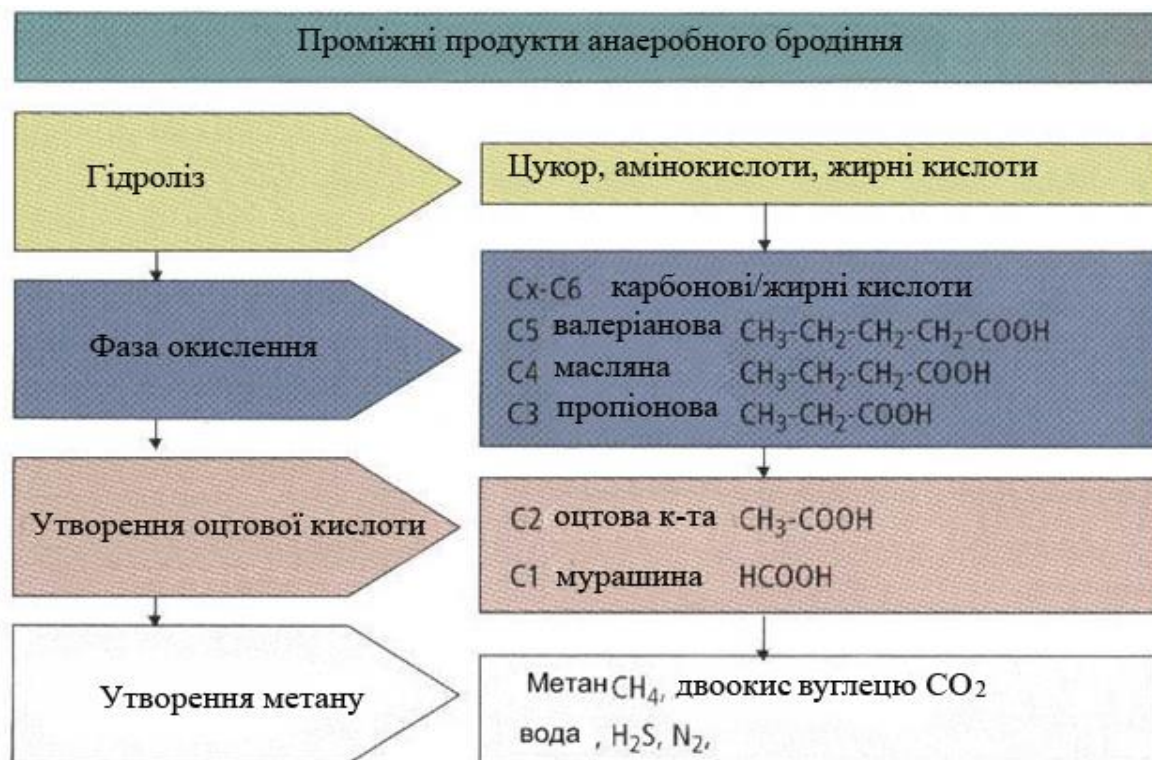


Рисунок 4.2 – Продукти анаеробного бродіння

Анаеробне бродіння – багатостадійний процес, який здійснюється кількома функціональними групами бактерій, що тісно взаємодіють між собою.

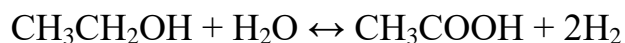
Перша стадія (кислотогенна або воднева). Гетерогенна група анаеробних бактерій, так звані *первинні анаероби*, піддають ферментативному розщепленню складні водонерозчинні органічні полімери – білки, ліпіди й полісахариди. При цьому разом із бактеріями, які здійснюють гідроліз полімерів, функціонують мікроорганізми (*мікрофлора розсіювання*), що розкладають моноцукри, органічні кислоти і спирти, які утворюються при гідролізі. Результатом діяльності обох груп мікроорганізмів є утворення водню, CO₂, низькомолекулярних (летких) жирних кислот (ЛЖК) і спиртів.

Гідролітичні бактерії знаходяться в тісному контакті з субстратом, який гідролізується. Мікрофлора розсіювання, навпаки, розвивається в рідкому середовищі.

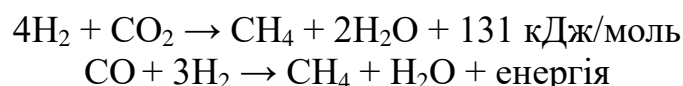
У процесах першої стадії беруть участь облігатні анаеробні бактерії (*Clostridium, Bacteroides, Butirivibro* та ін.), а також факультативні (*Escherichia coli i Bacillus sp.*).

Друга стадія (метанова або лужна). Здійснюється декількома групами бактерій, але основну роль відіграють метанові (метанутворюючі) бактерії (метаногени). Характерною особливістю цих бактерій є дуже вузький спектр використовуваних субстратів: а) водень; б) вуглекислота; в) мурашина й оцтова кислоти; г) метанол; д) моно-, ді-, триметиламіни.

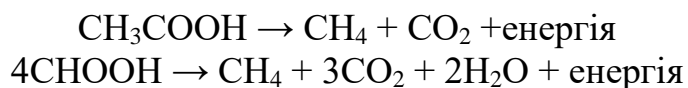
Ці субстрати частково наявні й після стадії кислотогенезу, однак, в основному, в їх утворенні бере участь так звана **синтрофна мікрофлора** – ацетогенні й гомоацетогенні бактерії:



Синтрофні мікроорганізми представлені як облігатними, так і факультативними анаеробами (*Synthrophobacter, Syntrophomonas, Desulfovibrio*). Процес розкладання цими бактеріями органічних кислот і спиртів на водень і оцтову кислоту може бути здійснений термодинамічно тільки при дуже низьких концентраціях водню. Функцію вилучення водню виконують водень-використовуючі метаногени, що належать до родів *Methanobacterium, Methanobrevibacter, Methanosarcina*, при цьому концентрація водню стає нижче термодинамічного порогу для синтрофних бактерій:



Водень-використовуючі бактерії складають більшість з відомих науці метанових бактерій, у процесах анаеробної обробки субстрату за водневим шляхом утворюється всього близько 28 % метану. Основна кількість метану (72 %) утворюється з ацетату та з мурашиної кислоти:



Метанобактерії, які використовують ацетат, представлені двома родами: *Methanosarcina* і *Methanotherix*.

Метаногени – це група мікроорганізмів, які дуже відрізняються від усіх інших за своїми властивостями, фізіологією і біохімією. Метанові бактерії – це особлива група бактерій – *архебактерії*. Вони відрізняються дуже низькою швидкістю росту, надзвичайно чутливі до умов навколишнього середовища і вимагають перш за все відсутності в середовищі розчиненого кисню та інших окиснювачів.

Архебактерії відрізняються від інших прокаріотичних мікроорганізмів відсутністю муреїну в клітинній стінці; специфічним складом ліпідів, що не містять жирних кислот; специфічною нуклеотидної послідовністю 16SpРНК. У основі процесів їх життєдіяльності лежать реакції, що протікають за участю унікальних ферментів (так звані фактори F20, F30, кофермент М).

Усі метаногени – суворі анаероби; серед них зустрічаються як мезофільні, так і термофільні форми; гетеротрофи й автотрофи. Особливістю метаногенів є здатність активно розвиватись у тісному симбіозі з іншими групами мікроорганізмів, які забезпечують їх умовами і субстратами для утворення метану.

Метаногенне оточення – це складна екологічна система. Істотні відмінності в біохімічних основах життєдіяльності бактерій різних груп передбачають їх як за фізіологією, так і за параметрами росту. Так, при температурі 35°C час подвоєння біомаси гідролітичних мікроорганізмів складає 10-20 годин, негідролітичних кислотогенів – 1-10 годин, синтрофних бактерій – біля 100 годин, довикористовуючих метанових бактерій – 15-100 годин.

У свою чергу, кожна функціональна група представлена декількома родами (видами) фізіологічно схожих мікроорганізмів, які розрізняються за кінетикою росту. Наприклад, біомаса ацетат-використовуючих метанових бактерій роду *Methanosarcina* подвоюється за 20-30 годин, тоді як роду *Methanotherix* – за 200-300 годин. Разом з тим бактерії роду *Methanotherix* здатні використовувати у п'ять разів більш низькі концентрації ацетату.

Перевага того чи іншого роду (виду) у складі функціональних груп метагенного оточення залежить від складу і концентрації субстрату, умов проведення процесу.

Таким чином процес анаеробного метанового бродіння – результат складних взаємовідносин між функціональними групами і видами мікроорганізмів і може бути зрозумілим тільки при аналізі всього оточення в цілому, а не тільки властивостей окремих видів.

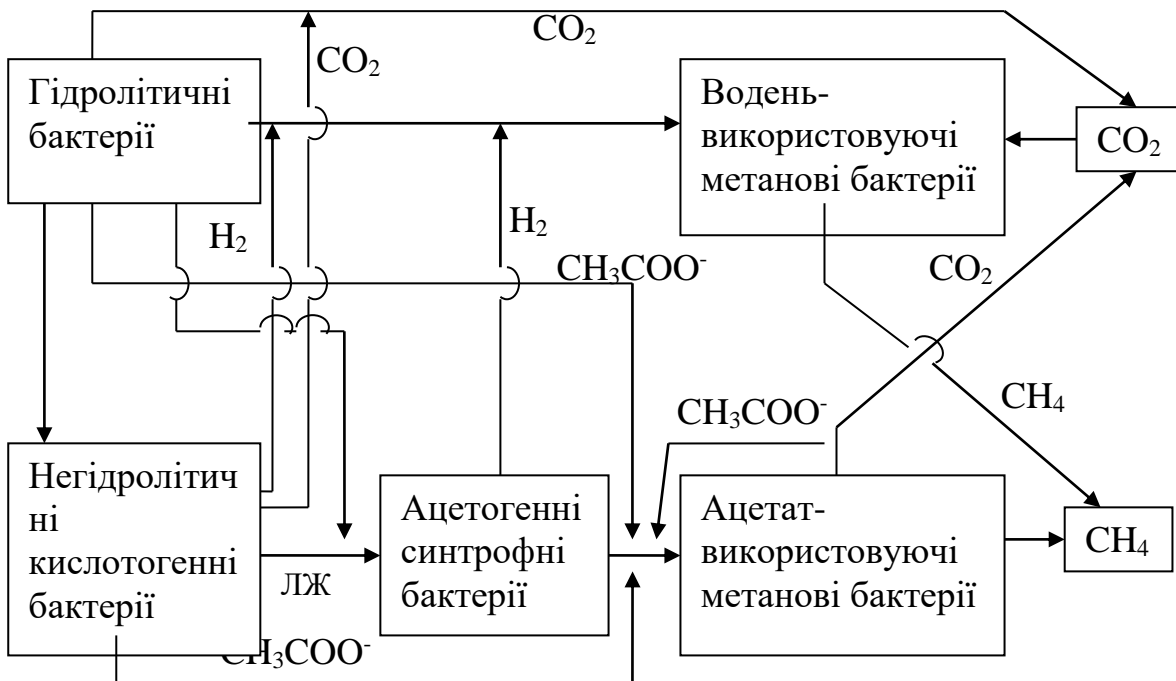


Рисунок. 4.3 – Схема конверсії складних органічних речовин анаеробним метаногеновим оточенням

У анаеробних біореакторах метанові бактерії можуть утворювати один з одним та іншими мікроорганізмами складні просторові структури: **флокули (пластівці)**, **біоплівку** на поверхні матеріалу твердої фази, **гранули**. При створенні подібних структур, розміром до декількох міліметрів, метанові бактерії значно втрачають здатність вільно пересуватися в об'ємі реактора, зберігаючи свою метаболічну активність. Це дозволяє також при короткотривалому перебуванні стічної води в біореакторі підтримувати в ньому дуже високу концентрацію біомаси (5-10 г/л). Явище утворення бактеріальних макроструктур покладено в основу роботи анаеробних біореакторів другого покоління.

Створення локальних висококонцентрованих бактеріальних утворень неминуче змінює властивості бактерій у порівнянні з дисперсними суспендованими культурами. Так, біоплівка (товщина її може досягати 1-4 мм) здатна в певних межах підтримувати у відповідній мікрзоні оптимальні умови середовища (рН), окисно-відновлювальний потенціал. Біореактори з біоплівкою стійкі до дії токсичних речовин.

Метаногенна плівка має досить крихку структуру. Це забезпечує вільне проникнення субстрату і відвід метаболітів при товщині біоплівки приблизно до 1мм. При більшій її товщині виникає проблема опору дифузії.

Метаногенез і токсичність

Метаногенез піддається інгібувальному впливу деяких токсичних речовин, які наявні в субстратах у розчинному стані. Інгібіторами є проміжні продукти (ЛЖК і H_2).

Вплив токсичних речовин може бути *бактеріостатичним* і *бактерицидним*. До гостротоксичних для метанового бродіння відносяться деякі синтетичні органічні речовини (в основному хлорорганіка), неорганічні сполуки (ціаніти, ціаніди), важкі метали та окиснювачі.

Один із токсикантів, який найчастіше зустрічається в стічних водах – амонійний Нітроген, що утворюється при розкладанні білків. Ступінь токсичності залежить від рН середовища: при $pH < 7,2$ переважає менш токсична форма – іон амонію NH_4^+ , при лужному середовищі – більш токсична форма – вільний аміак $NH_3 \uparrow$.

Другий токсикант – сульфат іон SO_4^{2-} , який в анаеробних умовах трансформується в більш токсичні сульфіди.

Концентрація SO_4^{2-} і HS^- є функцією рН і вмісту важких металів (перш за все заліза), при цьому утворюються нетоксичні сульфіди, які нерозчинні у воді. Токсичність – поняття відносне. Необхідні біогенні речовини і мікроелементи (NH_4^+ , SO_4^{2-} , Ca^{2+} , Ni^{2+} та інші) стають інгібіторами лише при високих концентраціях.

Токсичність залежить від ступеня адаптації мікроорганізмів до даного токсиканта. Якщо концентрація токсикантів зростає досить повільно, то бактерії можуть успішно мобілізувати свої метаболічні системи. Доведено, що більшість мікроорганізмів успішно адаптуються в анаеробних умовах до високих концентрацій ЛЖК (6-8 г/л і більше), аміачного Нітрогену (5 г/л і більше). Після адаптації мікроорганізми здатні також розкласти велику кількість токсичних органічних сполук: феноли, хлорфеноли, формальдегід та інші.

4.3. Типи біогазових установок

У процесі метаногенезу можна переробляти найрізноманітнішу сировину: рослинну біомасу (відходи деревини, непридатні до їжі рослинні рештки сільгоспкультур, відходи переробної промисловості, спеціально вирощені культури – водяний геопіт, бурі водорості), рідкі відходи тваринницьких комплексів, промислові і побутові стоки, мул очисних споруд, сміття міських сміттєзвалищ тощо.

Устаткування для біометаногенезу з урахуванням їх об'ємів виробництва можна розділити на декілька категорій:

- 1) реактори для невеликих ферм сільської місцевості (1-20 м³);
- 2) реактори для ферм розвинених країн (50-500 м³);
- 3) реактори для переробки промислових стоків спиртової і цукрової промисловості (500-10000 м³);

4) реактори для переробки твердого сміття міських сміттєзвалищ ($1-20 \times 10^6$).

Метанотенки, які будують з металу або із залізобетону, можуть мати різноманітну форму (кубічну або циліндричну).

Серед діючих у розвинених країнах установок існують як середні, так і великі за об'ємами апарати (**дайджестери**), що забезпечені устаткуванням для очистки біогазу, електрогенераторами й очищувачами води. Такі установки можуть входити до складу комплексів з промисловими підприємствами (цукропереробними, спиртовими, молокозаводами), каналізаційними станціями, великими фермами. У разі, якщо головною метою процесу є утилізація відходів, до складу установок повинен входити блок для фракціонування та відділення великих твердих часток.



Рисунок 4.4 – Метантенки біогазової установки

Метанотенки можуть працювати в режимі повного перемішування, повного заміщення, як анаеробні біофільтри або реактори, а також в режимі контактних процесів. Найпростішою конструкцією метантенку є звичайна бродильна яма в ґрунті з фіксованим об'ємом газу.

Метантенк представляє собою герметичну ємність, частково занурену в ґрунт для теплоізоляції, яка має устаткування для дозованої подачі й підігріву сировини, а також *газгольдер* – ємність для збирання газу.

Для невеликої установки найбільш просте рішення – використовувати вивільнені паливні цистерни. Схема біореактора на базі стандартної паливної цистерни об'ємом 50 м^3 показана на рисунку 4.5. Внутрішні перегородки можуть бути з металу або цегли; їх основна функція – направляти потік гною і подовжити шлях його всередині реактора, утворюючи систему сполучених посудин. На схемі перегородки показані умовно; їх кількість та розміщення залежать від властивостей гною: плинності, кількості підстилки.

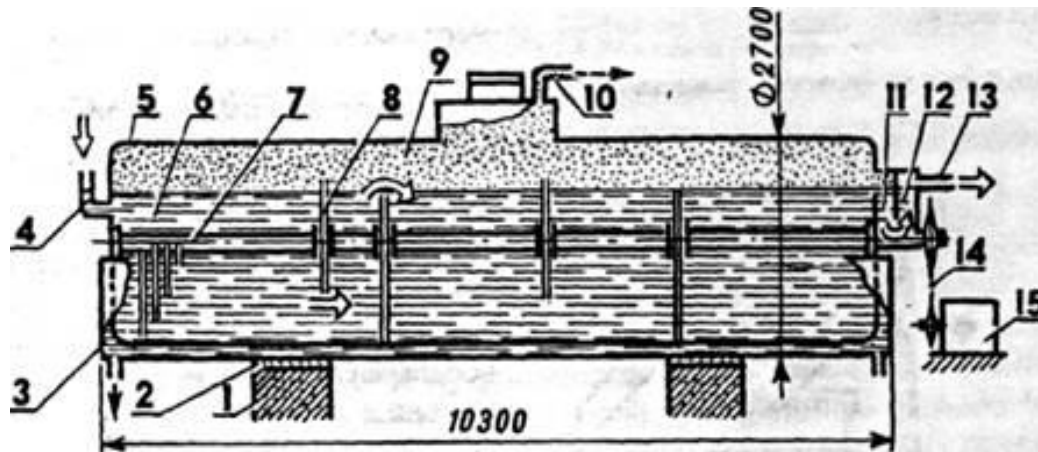


Рисунок 4.5 – Біореактор експериментальної газової станції:
 1 – бетонна підставка (2 шт.); 2 – теплоізоляційна «подушка» (2 шт.);
 3 – обігрівач («теплова сорочка» базової залізничної нафтоцистерни);
 4 – патрубок прийому сировини; 5 – корпус біореактора (цистерна);
 6 – сировина (рідкий гній); 7 – вал мішалки з лопатями; 8 – шлюзова перегородка (4 шт.); 9 – біогаз; 10 – газопровідний патрубок; 11 – перероблена біомаса; 12 – сифонний затвор; 13 – патрубок трубопроводу переробленої біомаси; 14 – ціпова передача; 15 – мотор-редуктор (220 В, 3кВт)

Дуже важливим у конструкції метантенку є забезпечення відповідного рівня перемішування досить гетерогенного вмісту апарату. Тому перемішування при метаногенезі повинно забезпечувати гомогенізацію зброджуваної маси, запобігати осіданню твердих часток і утворенню плаваючої кірки.

Залежно від типу висхідного матеріалу, що зброджується в метантенку, інтенсивність процесу, повнота переробки й склад біогазу суттєво варіюють. При переробці рідких відходів тваринницьких ферм співвідношення між твердими компонентами і водною фракцією повинно складати приблизно 1:1 (концентрація твердих речовин 8-11%). Суміш матеріалу засівають ацетогенними і метаногенними мікроорганізмами зі збродженої маси від попереднього циклу або з іншого метантенка.

Процес метаногенезу відбувається в широкому діапазоні температур:

від 0 до 20 °С – психрофільний режим;

від 20 до 40 °С – мезофільний режим

від 40 до 60°С – термофільний режим.

Підвищення температури прискорює процес метаногенезу в 2-3 рази порівняно з мезофільними умовами

Суттєвий вплив на швидкість метаногенезу має рН поживного середовища. Встановлено, що інтенсивне утворення метану відбувається

при рН = 6,8-7,4, при рН нижче 6,4 і вище 7,8 знижується метаболічна активність оточення метанових бактерій, а при рН=9 – припиняється.

Висока швидкість утворення біогазу досягається також при концентрації в середовищі летючих карбонових кислот у межах 5–500 мг/л, при відхиленні в той чи інший бік швидкість метаногенезу уповільнюється.

Рідкий або твердий шлам, що утворюються в процесі метаногенезу, вивозиться на поля і використовується в якості добрива. За умов метаногенерації патогенні ентеробактерії, ентеровіруси, паразитарні організми практично повністю гинуть. Твердий залишок (активний мул) може бути використаний в якості сировини для отримання біологічно активних речовин у процесах хімічного гідролізу або мікробіологічного синтезу.

З урахуванням конструктивних особливостей, які визначають ефективність і культуру виробництва, виділяють чотири рівня біогазових установок (БГУ).

1. *Найбільш простий технічний рівень* – зброджувана біомаса не підігрівається й не перемішується – реалізується в країнах зі спекотним кліматом (Африка, Південно-Східна Азія, Південна і Центральна Америка).

Приклад: БГУ «Габор» (КНР), у якій метантенк і газгольдер заглиблені в землю й сполучені між собою. Біомаса зброджується протягом 40 днів. Корисний об'єм камери 10 м³. Вихід біогазу 0,3-0,5 м³ на 1 м³ об'єму камери бродіння. У Китаї їх 7,2 млн. Біогаз цих установок використовується в побутових умовах (освітлення, приготування їжі). На БГУ великої потужності, кількість яких 35 тис., одержують електроенергію.

В Індії широко розповсюджені БГУ схожі на «Габор», вони призначені для задоволення побутових енергетичних потреб однієї сім'ї. Їх продуктивність – близько 1,72 м³ біогазу на добу. Таких установок близько 100 тис. Планується довести їх кількість до 560 тис.

2. *Другий рівень БГУ* – субстрат підігрівають, перед завантаженням субстрат подрібнюють, перемішують.

Установки такого типу є моделлю «Дормштадт». У них з 1 м³ об'єму метантанку отримують у 4 рази більше біогазу ніж на моделі «Габор». Перші БГУ такого типу мали конструктивні недоробки:

а) недостатня тепло- і гідроізоляція, викликана заглибленням в землю метантанка, можливість утворення застійних зон при перемішуванні біомаси, яка переробляється;

б) потреба в додаткових енергетичних витратах на руйнування поверхневої кірки.

3. *Біогазова установка (БГУ) з переробки біомаси в біогаз*, яка складається із ємності для збору й зберігання гною, ферментера (реактор, метантенк, камера бродіння), резервуару для одержання біогазу

(газгольдер, газозбірник), нагрівального й перемішувального пристрою, контрольно-вимірювальної апаратури та засобів автоматизації.

4. У біогазових установках «Липп», «Райки», «МББ», «Вима», вироблених у Німеччині, були внесені конструктивні зміни (створені двокамерні метантенки й двокамерний газгольдер), що дозволило впровадити двохступеневий процес зброджування біомаси.

У першій камері, куди надходить подріблена й підігріта біомаса, відбувається утворення органічних кислот, тут підтримується температура 35°C.

У другій камері, яка розташована в центрі метантанку відбувається термофільний процес метаногенезу. При цьому 1 м³ об'єму метантанку дає 7 м³ біогазу.

Спеціалісти Німеччини вважають, що БГУ можуть бути рентабельні тільки за умови, якщо на 1 людину приходиться більше 1 м³ біогазу. Біогазові установки «Липп», «Райки», «МББ», «Вима» дають 1,2-1,4 м³ біогазу. У США діють установки з добовим виходом біогазу 43-73 тис. м³.

4.4. Перспективи використання біогазу в Україні

За оцінками аналітиків, ринок біогазу продовжить стрімко розвиватися, заміщуючи інші енергоносії в загальній структурі енергетичного балансу країн.

Таблиця 4.2

Потенціал виробництва біогазу в ряді галузей АПК України

Вид діяльності	Загальне число підприємств	Загальний обсяг відходів, тис. т	Потенціал виробництва біогазу, млн. м ³ / рік
Всього по Україні	11667	39727	9543
Цукрові заводи	60	23263,5	975,5
Пивоварні	51	1016,8	121,8
Спиртові заводи	58	2705,0	116,8
Ферми ВРХ	5079	15431,6	385,8
Свинокомплекси	5634	5656,7	160,3
Птахофабрики	785	4721,5	378

В Україні є поодинокі приклади впровадження біогазових технологій. Перша установка була побудована 1993 року на свинофермі ПАТ «Запоріжсталь». Наступними стали компанії «Агро-овен», «Еліта», «Українська молочна компанія».

На цукровому заводі Рокитнянського району Київської області працює новий завод із переробки жому, кукурудзяного силосу, сорго на електричну та теплову енергію. Енергію постачають до навколишніх населених пунктів .

Таблиця 4.3

Діючі біогазові установки в Україні

Підприємство	Рік запуску	Види сировини	Електрична потужність, кВт	Постачальник технології
Свиноферма Комбінату «Запоріжсталь», Запоріжжя	1993	Свинячий гній		Bigadan (Данія)
Свиноферма корпорації Агро-Овен, Оленівка Дніпропетр. обл.	2003	Свинячий гній, органічні відходи	180	BTG (Голландія)
С/г компанія «Еліта», Терезине, Київська обл.	2009	Гній	250	LIPP, (Німеччина)
Ферма ВРХ «УМК», с. В.Круполь, Київська обл.	2009	Гній ВРХ, силос кукурудзи	625 + 330	Zorg, Україна, Німеччина
Коньячний завод м. Вознесенськ, Миколаївська обл.	2010	Силос кукурудзи	125	Zorg, Україна, Німеччина

Біогазова установка на комбінаті ПАТ «Запоріжсталь» була впроваджена для очищення стоків та зменшення споживання енергії. Теплова утилізація біогазу реалізується на власні потреби свиногомплексу комбінату.

На свиногомплексі корпорації «Агро-Овен» електроенергія, що виробляється у біогазовій установці, споживається на власні потреби установки та підприємства, при цьому когенераційна установка не підключена до загальної електромережі.

Експлуатація БГУ компанії «Еліта» була призупинена в 2011 році через нерентабельність роботи за відсутності «зеленого» тарифу. Єдиною біогазовою установкою, підключеною до мережі, є БГУ на фермі «Української молочної компанії».

У вересні 2011 року почалося будівництво біогазової установки на базі свиногомплексу в селі Копанки Івано-Франківської області. У 2012 році «Миронівський хлібопродукт» почав будувати біогазову установку на птахофабриці «Оріль-лідер» у Дніпропетровській області. Планувалось реалізувати амбітну біогазову програму з тридцяти БГУ компанією «Укрлендфармінг». Агропромхолдинг «Астарта-Київ» у 2012 році анонсував

будівництво установки на Глобинському цукровому заводі (Полтавська область) за рахунок кредиту ЄБРР.

Таким чином, впровадження біогазових технологій залишається справою флагманів АПК, що мають власні ресурси для роботи в умовах слабого фінансового ринку й відсутності інвестицій.

Питання для самоконтролю:

1. Що таке біометаногенез?
2. Що собою являє процес метанового бродіння?
3. Від яких факторів залежить хімічний склад біогазу?
4. Які біохімічні основи процесів метаногенезу?
5. Які мікроорганізми приймають участь у процесах метаногенезу?
6. Яку роль у процесах метаногенезу виконують бактерії гідролітичної групи?
7. Назвіть фізіолого-культуральні особливості й функціональне значення метаногенів у процесах біометаногенезу.
8. Які перспективи використання біогазу в Україні?
9. Які типи біогазових установок використовують для отримання біогазу?

Виберіть правильну відповідь:

1. Суміш метану (65%), CO, (30%), H₂S (1 %) і домішок CO, O₂ і H₂, яка утворюється в результаті діяльності мікроорганізмів, називають...

- A) біогазом;
- Б) паливним етанолом;
- В) природним газом.

2. Продуктом життєдіяльності яких мікроорганізмів є біогаз?

- A) *Methanobacterium, Methanosarcina, Methanospirillum;*
- Б) *Thiobacillus ferrooxidans, T. acidophilus, T. Organoparus;*
- В) *Sulfolobus brierleyi.*

3. Як називають спеціальне устаткування для одержання біогазу?

- A) дайджестерами;
- Б) аеротенками;
- В) ультрацентрифугами.

4. Анаеробні бактерії, аеробні мікроорганізми, найпростіші та інші організми – це характерний ценоз для...

- A) метантенків;
- Б) аеротенків;
- В) біоконвеєра.

5. Чи впливає рН середовища на зміну ступеня токсичності речовин, що впливають на процес метаногенезу?

- а) так, впливає;
- б) ні, ніяк не впливає.

6. Метанове бродіння (зброджування) являє собою...

А) безкисневу біологічну конверсію органічної речовини в біогаз, що складається в основному з метану та вуглекислоти;

Б) кисневу біологічну конверсію органічної речовини в біогаз, що складається в основному з метану та вуглекислоти;

В) безкисневу біологічну конверсію неорганічної речовини в біогаз, що складається в основному з метану та вуглекислоти.

7. Основна роль на другій стадії метанового бродіння належить:

А) гідролітичним бактеріям;

Б) р. *Clostridium*, р. *Bacteroides*;

В) метановим бактеріям (метаногенам).

8. Метанобактерії, що використовують ацетат, представлені:

А) р. *Bacteroides* і р. *Streptococcus*;

Б) р. *Clostridium* та р. *Butirivibrio*;

В) р. *Methanosarcina* та *Methanotrix*.

9. Найбільш інтенсивно утворення метану відбувається при реакції середовища:

А) рН = 2,0-4,2;

Б) рН = 6,8-7,4;

В) рН = 7,8-10,0.

Виконайте завдання:

1. Складіть схему біоконверсії органічних речовин за участі мікроорганізмів.

2. Проаналізуйте світовий досвід використання біогазу. Поясніть які існують причини повільного впровадження біогазових технологій в Україні.

3. Обґрунтуйте перспективи впровадження біоенергетичних технологій в Україні.

4. Поясніть терміни «метантенк», «газгольдер», «дайджестер».

5. Складіть схему «Типи біогазових установок».

6. Заповніть таблицю «Характеристика стадій процесу метаногенезу».

Таблиця

Характеристика стадій процесу метаногенезу

Назва стадії	Функціональна група мікроорганізмів	Продукти, що піддаються деструкції	Продукти, що утворюються
1.			
2.			

Тема 5. Біотехнологія виробництва етилового спирту і розчинників

Мета: сформувати знання про особливості біотехнології отримання етилового спирту, органічних розчинників і паливного етанолу, мікроорганізмів-продуцентів, що використовуються в промисловому виробництві; поглибити знання студентів щодо фізіології мікроорганізмів-збудників спиртового бродіння, хімізму спиртового бродіння, засвоєних з курсу «Мікробіологія».

План

1. Біотехнологія отримання етилового спирту.
2. Одержання паливного етанолу.
3. Біотехнологія отримання розчинників.

Основні терміни і поняття: етанол, бродильні технології, дріжджі, меляса, оцукрювання сировини, ректифікація, органічні розчинники.

5.1. Виробництво етилового спирту

Виробництво етанолу – це найбільше біотехнологічне виробництво за витратами сировини в світі. Однак за вартістю продукту займає 3 місце серед великотоннажних.

Етанол широко використовують у якості розчинника, як сировину для хімічного синтезу, у медицині. Етанол можна застосовувати як екстрагент і антифриз, він є субстратом для виготовлення барвників, мастильних матеріалів, миючих засобів, смол, синтетичних волокон тощо.

Одержання етанолу – одна з найстаріших біотехнологій. Добре вивчена біохімія спиртового бродіння. Енергія субстрату в процесі бродіння розподіляється таким чином: 90 % переходять в етанол і по 5 % у біомасу й тепло.

Спиртове бродіння здійснюють дріжджі-сахароміцети (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. rosei*), деякі міцеліальні гриби (*Aspergillus oryzae*), бактерії (*Zymomonas mobilis*, *Z. anaerobia*, *Sarcina ventricula*, *Ervinia amylovora*, *Clostridium thermocellum*). Проте в якості продуцентів у спиртовому виробництві використовують тільки дріжджі.

Сировина для виробництва спирту:

- крохмалевмісна сировина – зерно (жито, пшениця, кукурудза, ячмінь, овес, просо);
- картопля;
- меляса (відходи цукрової промисловості),
- солод, солодове молоко;
- сусло;
- гідролізат деревини.

Існує декілька технологій отримання етанолу. Виробництво спирту включає низку стадій.

1. Спочатку сировину подрібнюють і розварюють з метою гідролізу крохмалю. Оскільки крохмаль не зброджується дріжджами (у них відсутня амілаза), розварену масу обробляють амілолітичними ферментами солоду або мікроорганізмів (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Bacillus subtilis*, *B. amylolítica*). В останні роки використовують готові ферментні препарати амілаз.

Оцукрена у такій спосіб суміш містить вуглеводи (мальтозу, глюкозу, декстрини). Крім того, у ній є пептиди, амінокислоти, фосфорорганічні сполуки, мінеральні солі, мікроелементи.

2. Наступна стадія – зброджування оцукреної маси. З цією метою використовують чисті культури дріжджів, які вирощують у спеціальних дріжджових відділеннях. Для пригнічення розвитку в них бактерій зброджувальну суміш, охолоджену до 30°C, підкислюють сульфатною водою до рН 3,8-4,0.

Продуценти – дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* раса XII. Добре зброджують фруктозу, сахарозу, мальтозу, дещо слабше рафінозу і галактозу (нагромаджують до 11 % спирту в середовищі).

Вимоги до дріжджів-продуцентів:

- вони повинні мати високу бродильну активність;
- швидко й повністю зброджувати цукри;
- використовувати інші компоненти середовища в анаеробних умовах;
- бути стійкими до продуктів свого обміну (особливо до спирту);
- добре протистояти інфекції.

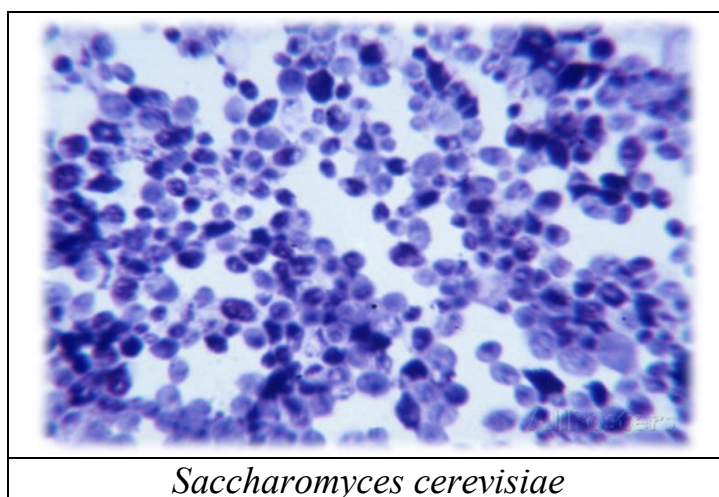


Рисунок 5.1 – Чиста культура *Saccharomyces cerevisiae*

Одержання етанолу з меляси

Схема двопоточного способу зброджування меляси передбачає приготування окремих середовищ для одержання дріжджів (вміст сухої речовини 8-12 %) і для зброджування (32-36 % сухої речовини).

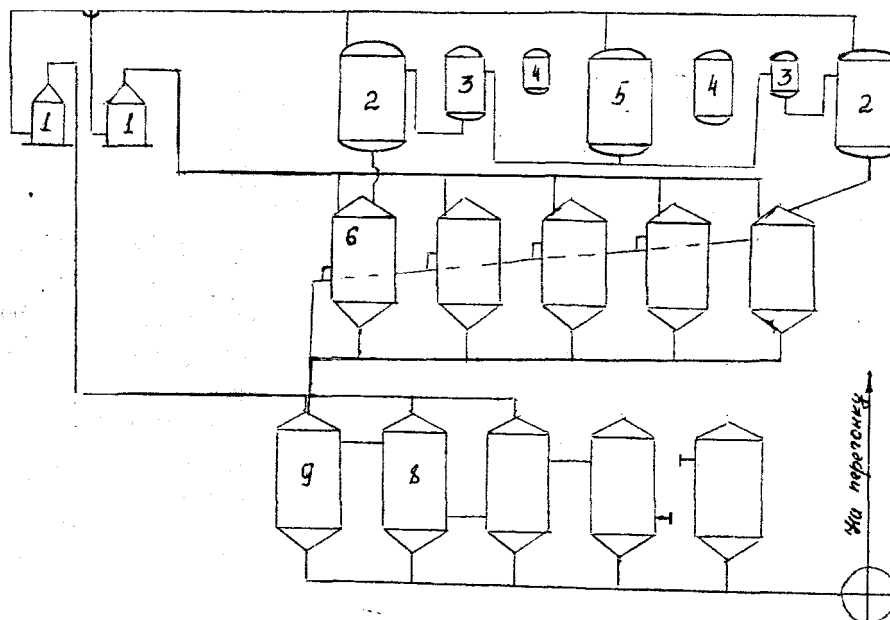


Рисунок 5.2 – Апаратурно-технологічна схема одержання етанолу з меляси: 1 – розсиропники; 2–4 – апарати чистої культури; 5 – стерилізатор; 6 – дріжджегенератор; 7 – насос; 8 – бродильний апарат; 9 – головний бродильний апарат

1. У дріжджегенераторах застосовують аерацію. Об'єм повітря, що подається – 3-4 м³ на годину. Це слабка аерація. Температура в дріжджегенераторах підтримується на рівні 28-30°C, а рН 4,2-4,5. Концентрація етанолу в дріжджегенераторах досягає 2,8-3,5%, дріжджів – 2,5-6,5% сухої речовини.

2. Вирощені дріжджі із дріжджегенератора за верхніми лініями відбору направляють до головного бродильного апарата, куди одночасно надходить поживне середовище з концентрацією сухої речовини 32–36 %.

3. Після заповнення головного апарата культуральна рідина послідовно проходить бродильні апарати і з останнього потрапляє на перегонку. Температура бродіння 29-31°C. Концентрація сухої речовини в першому бродильному апараті 7,5-8,5 %, у другому – 8-9 %, у третьому – 9-9,5 % і в останньому 5-6,5 %. Система працює без поновлення дріжджів 7-10 діб.

3. Перед перегонкою із бражки виділяють хлібопекарські або кормові дріжджі (рис. 5.2).

4. Спирт, отриманий у результаті дріжджевого бродіння, містить сивушні масла (пропанол, 2-бутанол, 2-метилпропанол), аміловий та ізоаміловий

спирти. Це побічні продукти обміну ізолеїцину, лейцину і валіну. Відділити сивушні масла можна тільки шляхом *ректифікації*.

Одержання технічного спирту

Технічний спирт одержують на гідролізатах деревини та інших рослинних відходах. Деревина листяних і хвойних порід містить від 40 до 75 % полісахаридів. Рослинну сировину гідролізують. Одержаний гідролізат містить 3,5 % цукри (переважно глюкозу), целобіозу і манозу, а також пентози – ксилозу, арабінозу, рамнозу. У результаті бродіння утворюється до 1,5 % етанолу. Гідролізний спирт (ректифікат) містить до 0,1 % метанолу, дещо більшу кількість кислот, складних ефірів, альдегідів.

Відходами целюлозного виробництва є сульфітні гідролізати, які використовують для одержання сульфітного етилового спирту. Гідролізний етанол може містити до 8 % метанолу.

Ямомото (Японія) довів, що одержаний із мікроміцетів роду *Rhizopus* ферментний препарат, який має високу амілазну та пектиназну активність, добре переводить крохмаль з розтертої маси картоплі в етанол. Процес відбувається при рН 4,2 і температурі 25°C. Тут не потрібно розварювати картоплю й оцукрювати масу.

Значний інтерес, як продуценти етанолу, представляють аеротолерантні бактерії *Zymomonas mobilis*. Вони, на відміну від дріжджів, характеризуються низькою чутливістю до етанолу. Крім того, гранична швидкість споживання глюкози й утворення етанолу в 2-3 рази вища. Ця бактерія здатна утилізувати глюкозу, сахарозу. Недоліком є повільне зростання біомаси, що понижує продуктивність системи. Значних успіхів при культивуванні *Z. mobilis* для одержання етанолу було досягнуто в Канаді, де в результаті селекції одержані штами, що дають 200 г/л. При одержанні етанолу хімічним шляхом із етилену продуктивність складає 80 г/л.

5.2. Одержання паливного етанолу

Етиловий спирт є гарним екологічно чистим паливом для двигунів внутрішнього згорання й альтернативою дефіцитному бензину. Використання чистого етанолу або в суміші з бензином (газохолом) суттєво знижує забруднення оточуючого середовища вихлопними газами. Тому в країнах з великими запасами природної рослинної сировини і відповідними ґрунтово-кліматичними умовами, що забезпечують високі врожаї, стає доречним орієнтувати виробництво моторного палива на процеси мікробіологічного бродіння.

У якості пального спирт почали використовувати в США і Німеччині в 30-40 рр. минулого століття. Попит на етанол у якості палива різко виріс у 70-ті роки, зокрема в Бразилії. У 1980 р. у США в продаж поступила суміш із 6-9 частин бензину й 1 частини етанолу («газохол»). У Японії наприкінці 90-х років

експорт нафти скоротився з 72 до 49 % за рахунок отримання спирту на базі іммобілізованих мікробних клітин.

Головним завданням, яке потрібно вирішувати при отриманні спиртів технічного призначення, це заміна крохмалевмісних субстратів дешевою сировиною нехарчового призначення. Для країн Латинської Америки такою сировиною можуть бути відходи цукрової тростини – багас, маніок, батат, солодке сорго, топінамбур. Для регіонів з помірним кліматом зі значними масивами лісів, доцільним є використання гідролізатів відходів деревини, а також соломи, торфу, рогозу тощо. Зокрема підраховано, що 1 т деревини може замінити близько 0,6 т зерна або 1,7 т картоплі, при цьому можна отримати до 180 л етанолу і 40 кг дріжджів.

Збільшити виробництво етанолу можна наступними шляхами:

1) використовувати безперервну ферментацію замість періодичної. Це підвищує продуктивність системи в 2 рази. Вихід етанолу збільшується за умови використання флокулюючих рас дріжджів, рециркуляції біомаси й іммобілізації клітин;

2) проведення вакуумної ферментації при розрідженні 32-35 мм рт. ст. для видалення етанолу;

3) здійснення флеш-ферментації, при якій частина культуральної рідини періодично потрапляє до вакуумної камери для видалення етанолу;

4) селекція етанолтолерантних штамів мікроорганізмів, здатних утворювати високі концентрації етанолу.

Економічні переваги виробництва етанолу залежать від низки умов: структури сільськогосподарських культур, собівартості сировини; капіталовкладень на будівництво заводів; цінової політики. Країни, що не мають виходу до моря, зацікавлені в заміні нафти на інші види палива.

5.3. Біотехнологія отримання розчинників

Органічні розчинники – **ацетон** і **бутанол** широко використовуються не тільки в хімічній промисловості, але й в інших областях народного господарства.

Ацетоно-бутилове бродіння є анаеробним процесом і викликається бактеріями *Clostridium acetobutylicum*.

Сировина для ацетоно-бутилового бродіння – меляса і рослинні гідролізати. Ацетон і бутанол одержують зброджуючи зернові, мелясно-зернові суміші або мелясу.

Технологічна схема отримання ацетону і бутанолу:

1. Якщо готують із зерна (кукурудзи), борошно грубого помелу спочатку змішують із водою (6-8 кг борошна на 100 л води). Потім суміш варять 2 години під тиском 200 кПа і стерилізують.

2. Охолоджену до 37-42⁰ С масу зброджують протягом 2-х діб при рН 5-7. У процесі бродіння з глюкози утворюється суміш, яка містить 6 частин

бутанолу, 1 частину етанолу й 3 частини ацетону. З 3-х кг крохмалю можна одержати 1 кг органічних розчинників.

3. На першому етапі ацетон-бутилового бродіння утворюються оцтова і масляна кислоти, водень і CO_2 . Потім масляна кислота відтворюється до бутилового спирту. Ацетон утворюється з ацетооцтової кислоти при її декарбоксілюванні.

4. Основну ферментацію проводять у періодичному, напівперіодичному і безперервному режимах. Через 12 годин рН з 6,0 знижується до 4,5-4,2. Встановлено, що при низьких значеннях рН активуються ферменти, що каталізують трансформацію ацетоацетил-СоА в ацетон.

5. Після завершення процесу ацетон-бутилово барду піддають сепаруванню, дистилат наполовину упарюють, після чого ацетон відділяють від етанолу і бутанолу перегонкою при різних температурах. Ацетон кипить при $56,2^\circ\text{C}$, етанол – $78,4^\circ\text{C}$, чистий бутанол – при $117,7^\circ\text{C}$.

Ацетон і бутанол широко застосовується в хімічній промисловості. Відходами виробництва є водень і діоксид вуглецю, а також ацетон-бутилова барда. Гази уловлюють і використовують для синтезу аміаку і метанолу. Барду після відділення розчинників концентрують десятиразово у вакуум-випарювальних апаратах і висушують у розпилювальних сушарках. Одержують сухий концентрат, що містить 60-100 мгк/л рибофлавіну. Вміст сухих речовин, переважно азотистих, у барді складає 3-5 %, тому її використовують для вирощування кормових дріжджів і отримання кормового препарату вітаміну B_{12} .

Ацетон-бутилова барда, крім ацетону, бутилового й етилового спиртів, містить ряд побічних продуктів, для розділення яких застосовують ректифікацію.

Розроблено метод біосинтезу органічних розчинників на основі синтетичного газу. Реалізований двох етапний безперервний процес. Спочатку із CO_2 утворюють органічні кислоти за допомогою *Butyribacterium methylotropicum*. Потім кислоти й водень газу перетворюється в бутанол, етанол, ацетон. На першій стадії процес регулюється вимірюванням рН. Він повинен бути в інтервалі 6,5-5,0. При більш низькому рН утворюється більше бутанолу, ніж ацетону. Одержано мутант, який дає вихід розчинників 22,7 %, концентрація бутанолу в середовищі 13 г/л.

Питання для самоконтролю:

1. Дайте характеристику основних продуцентів етанолу.
2. Яку сировину використовують для виробництва спирту?
3. Охарактеризуйте основні стадії промислового одержання спирту за допомогою дріжджів.
4. Поясніть, що таке технічний спирт? Яка технологія його отримання?
5. Для чого проводять ректифікацію спирту?
6. Обґрунтуйте економічні переваги виробництва паливного етанолу. Від яких умов це залежать?

7. Поясніть, за яких умов відбувається мікробіологічний синтез ацетону, бутанолу, масляної кислоти?
8. Назвіть продуцентів, що використовують для отримання розчинників.

Виберіть правильну відповідь:

1. Суміш етилового або метилового спирту з бензином, яку використовують для роботи автомобільного транспорту називають...

- А) біогазом;
- Б) паливним етанолом;
- В) природним газом.

2. Для виробництва спирту в якості сировини найчастіше використовують:

- А) кукурудзяний екстракт, соєву муку і гідролізати дріжджів;
- Б) крохмалевмісну сировину – зерно (жито, пшеницю, кукурудзу, ячмінь, овес, просо) і картоплю;
- В) цукровмісну сировину – мелясу, цукрові буряки;
- Г) гідролізати деревини;
- Д) відходи перероблення сільськогосподарських рослин.

3. Для виробництва технічного етанолу як сировину найчастіше використовують:

- А) кукурудзяний екстракт, соєву муку і гідролізати дріжджів;
- Б) крохмалевмісну сировину – зерно (жито, пшеницю, кукурудзу, ячмінь, овес, просо) і картоплю;
- В) цукровмісну сировину – мелясу, цукрові буряки;
- Г) гідролізати деревини;
- Д) відходи перероблення сільськогосподарських рослин.

4. Для виробництва спирту із крохмалевмісної сировини використовують:

- А) *Saccharomyces cerevisiae*;
- Б) *Escherichia coli*;
- В) *Aspergillus niger*.

5. Яким способом можна відділити сивушні масла від спирту, одержаного шляхом дріжджового бродіння?

- А) ректифікації;
- Б) рекомбінації;
- В) ізомеризації.

6. Сивушні масла, що містяться у спирті, отриманого в результаті дріжджового бродіння – це:

- А) суміш пропанолу, 2-бутанолу, 2-метилпропанолу,
- Б) аміловий та ізоаміловий спирти;
- В) побічні продукти обміну ізолеїцину, лейцину і валіну;
- Г) ароматичні сполуки.

7. Для виробництва спирту із крохмалевмісної сировини використовують:

- А) *Saccharomyces cerevisiae*;
- Б) *Escherichia coli*;
- В) *Aspergillus niger*.

8. Які методи використовують для перевірки якості та стану промислових дріжджів?

- А) проводять мікроскопічні дослідження;
- Б) визначають вміст глікогену у дріжджових клітинах;
- В) визначають кількість мертвих клітин;
- Г) визначають загальну кількість дріжджових клітин у 1 мл середовища;
- Д) визначають колі-титр.

9. Назвіть продуцентів, що використовують для отримання розчинників:

- А) *Clostridium acetobutylicum*;
- Б) *Butyribacterium methylotropicum*;
- В) *Saccharomyces cerevisiae*;
- Г) *Acetobacter aceti*.

Виконайте завдання:

1. Складіть технологічну схему виробництва спирту з меляси.
2. Складіть технологічну схему отримання розчинників.
3. Заповніть таблицю «Галузі застосування етанолу».

Таблиця

Галузі застосування етанолу

Продукт	Сировина, що використовується	Мікроорганізми -продуценти	Галузь застосування

Тема 6. Біогеотехнологія металів

Мета: ознайомити студентів із новітніми тенденціями у розвитку біотехнології металів з точки зору раціонального використання природних ресурсів; ролі мікроорганізмів, що використовуються в біологічному вилюговуванні кольорових металів, біосорбції металів із розчинів і збагаченні руд.

План

1. Новітні тенденції у розвитку біотехнології металів.
2. Бактерійне вилюговування металів (біогідрометалургія).
3. Біосорбція металів із розчинів.

4. Збагачення руд.
5. Акумулявання металів зі стічних вод.
6. Очищення вугілля, нафти і газу.

Основні терміни і поняття: біогеотехнологія, біогідрометалургія, біосорбція, поверхневе вилуговування, чанове вилуговування, збагачення руд.

6.1. Новітні тенденції у розвитку біотехнології металів

Біогеотехнологія металів – це процеси видобування металів із руд, концентратів, гірських порід і розчинів за допомогою мікроорганізмів або їх метаболітів. Складовими частинами є *біогідрометалургія* (бактерійне вилуговування металів), *біосорбція металів із розчинів і збагачення руд*.

Біогідрометалургія – це видобування окремих хімічних елементів із руд, концентратів, гірських порід і розчинів за допомогою мікроорганізмів або їх метаболітів. Видобування пов'язане з вилуговуванням металів слабкими розчинами сульфатної кислоти бактерійного і хімічного походження, а також розчинами, що містять Fe^{3+} , органічні кислоти, білки, пептиди, полісахариди й інші сполуки. В основі видобування лежить процес окиснення (розчинення) мінералів і переведення кольорових, рідкісних металів із нерозчинного у розчинний стан.

Важливість застосування біогеотехнології металів обумовлена вичерпністю доступних природних ресурсів мінеральної сировини та необхідністю розробки бідних родовищ. При цьому біологічні технології не спотворюють поверхню Землі, не отруюють повітря, не забруднюють водойми на відміну від відкритих способів видобутку корисних копалин.

Біогеотехнологічні методи, мікробіологічна адсорбція й бактерійне вилуговування, дозволяють отримати додаткову кількість кольорових металів за рахунок утилізації «хвостів» збагачувальних фабрик, шламів і відходів металургійних виробництв, а також переробки руд із морської води та стоків.

Ще за тисячоліття до нашої ери римляни, фінікійці вилучали мідь з рудничних вод. У середні віки в Іспанії, Англії застосовували процеси «вилуговування» для отримання міді з мінералів. На теперішній час процес бактерійного вилуговування досить широко застосовують у світі для отримання міді, значно менше – для вилуговування урану.

Незважаючи на давню історію існування біотехнологічних процесів видобування металів із руд і гірських порід, активна роль мікроорганізмів у цих процесах була доведена лише в 50-ті роки минулого століття. У 1947 році в США Колмер і Хінклі виділили з шахтових дренажних вод мікроорганізми, що окиснюють двоцвалентне залізо і відновлюють сірку, які були ідентифіковані як *Thiobacillus ferrooxidans*. Було з'ясовано, що дані залізоокиснювальні бактерії в процесі окиснення переводять мідь із рудних мінералів у розчин. У 1958 році було зареєстровано перший патент на отримання металів із концентратів за допомогою залізоокиснюючих бактерій.

Thiobacillus ferrooxidans досить широкопоширені в природі, здатні окиснювати сульфідний і сульфітний іони, Ферум (II), сульфідні мінерали міді, урану. Інші бактерії – *Leptospirillum ferrooxidans* – ефективно окиснюють двохвалентне залізо до трьохвалентного. Порівняно недавно були виділені й описані бактерії *Sulfobacillus thermosulfooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *T. acidophilus* та інші (рис. 6.1). Для цих літотрофних бактерій процеси окиснення природних неорганічних субстратів є джерелом енергії.

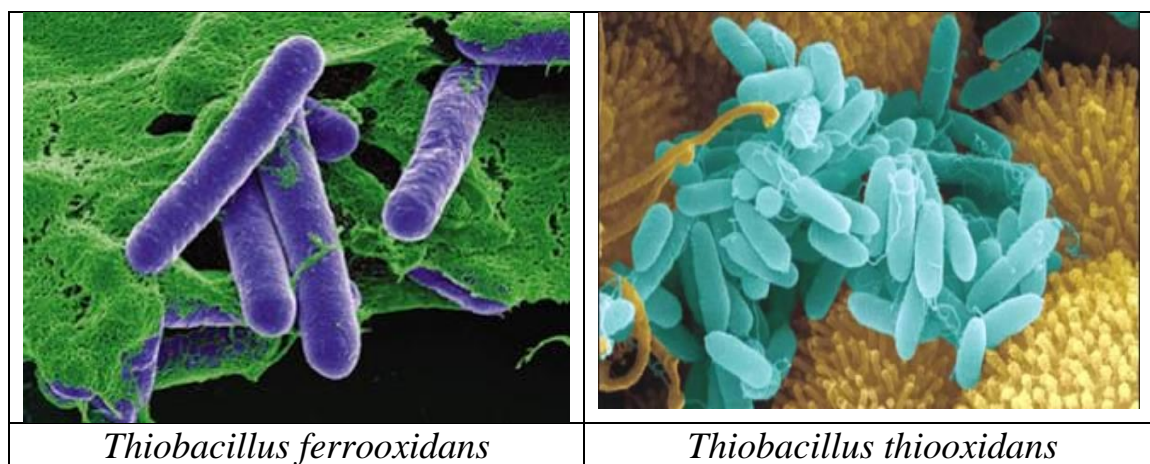


Рисунок 6.1 – Мікроорганізми, що використовують у біогідрометалургії

6.2. Бактерійне вилуговування металів (біогідрометалургія)

Бактерії, які вилуговують метали, переводять їх в ході окиснення в розчин, проте різними шляхами. Розрізняють «прямі» й «непрямі» методи бактеріального окиснення.

Прямий метод окиснення – процес окиснення заліза і сірки бактеріями. У результаті прямого окиснення окиснюються *пірит* і *сфалерит*. Іон трьохвалентного заліза, що утворюється в результаті окиснення двохвалентного заліза, є сильним окиснювачем, який переводить у розчин більшість мінералів (наприклад, *халькоцит*).

Непрямий метод окиснення – вилуговування, яке відбувається при участі іона Fe^{3+} , що утворюється в результаті життєдіяльності бактерій. Часто під час непрямого окиснення мінералів утворюється сірка, яка потім окиснюється бактеріями до сульфатної кислоти.

Бактерійне окиснення є складним процесом, який включає адсорбцію бактерій на поверхні мінералів, деструкцію кристалічних ґраток, транспорт до клітини мінеральних елементів і їх ферментативне окиснення. Даний процес реалізується за законами електрохімічної корозії, тому залежить від складу, структури й властивостей породи.

Після прикріплення до мінералів бактерії поширюються їхньою поверхнею, збільшуючи її гідрофільність, при цьому електродний потенціал породи (ЕП) знижується, а ОВП середовища (Еh) зростає. Чим більше різниця

між Eh середовища і ЕП породи, тим швидше протікають електрохімічні реакції на катоді й аноді. За відсутності бактерій, коли Eh середовища і ЕП піриту близькі, процеси окиснення не відбуваються.

Сульфідні мінерали ефективно окиснюються за наступних умов: мікроорганізми повинні бути адаптованими до умов конкретної породи, їх концентрація в середовищі повинна бути достатньо високою. Вилуговування проходить активніше, якщо руда попередньо тонко подрібнена, при постійному перемішуванні й аерації, а також рН і температура середовища, оптимальні для даного виду бактерій, адже процеси вилуговування взаємопов'язані зі швидкістю росту мікроорганізмів.

Технологія бактерійного вилуговування кольорових металів

Технологія бактерійного вилуговування кольорових металів передбачає їх виділення з *відвалів бідної руди* (купчаста) і з *рудного тіла* в місцях залягання відповідних мінералів (підземна).

Зрошення руди у відвалах чи рудному тілі здійснюють водними розчинами H_2SO_4 , що містять Fe^{3+} і бактерії (*Thiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Sulfolobus thermosulfidooxidans*). Найчастіше у відвалах присутні бактерії *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans*. Розчин подається через дренажну систему (при підземному вилуговуванні). У руді в присутності кисню і бактерій сульфідні мінерали окиснюються, а мідь або інші метали переходять із нерозчинного стану в розчинний.

Швидкість бактерійного вилуговування металів із руд і концентратів визначається *густиною біомаси бактерій*. Активне окиснення сульфідних мінералів відбувається при участі бактерій (1-5 г/л за сирою біомасою), що адаптовані до умов процесу. У місцях, де вміст сульфідних мінералів високий, внесення ззовні біомаси бактерій не потрібне. Однак при запуску процесу вилуговування металів у місцях з низьким вмістом таких сполук необхідно вносити клітини бактерій ззовні. Для цього біомасу бактерій вирощують на середовищі з Fe^{2+} в умовах постійного електрохімічного відновлення Fe^{3+} .

Fe^{3+} є сильним окиснювачем, який переводить у розчин багато мінералів, наприклад *халькозин* (містить мідь), *уранініт* (містить уран).

Розчин, що містить мідь або інший метал, надходить на цементаційну або інші установки, де за участі Fe^{2+} або певних розчинників відбувається його *сорбційна екстракція*, а потім знову на відвал, або в рудне тіло. Цей процес є замкнутим і екологічно чистим.

Виділення марганцю із руд і відходів відбувається за участю бактерій родів *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* та інших.

Виділяють три шляхи відновлення Mn^{4+} до Mn^{2+} гетеротрофними бактеріями:

- 1) відновлення органічними кислотами (мурашиною, щавлевою), які виділяють бактерії у середовище;
- 2) перекисний механізм відновлення (залежить від активності каталази бактерій, концентрації субстрату, рН середовища);

3) ферментативний шлях відновлення Mn^{4+} за участю гетеротрофних бактерій, що містять цитохроми *b*, *c* і *o*.

Найчастіше використовують перший шлях відновлення Mn^{4+} , при цьому в розчин переходить до 85 % марганцю з відвалів, до 90 % з оксидних руд, 60 % з карбонатних.

Поверхнєве вилуговування куп (кучугурів) і відвалів, у основному зводиться до вилучення металів із відходів гірничовидобувної промисловості або побічних бідних руд, переробка яких іншими способами не економічна (наприклад, вилучення міді з порід з низьким її вмістом). Такі відвали нагромаджуються у великих кількостях у місцях відкритих розробок руди і займають значні площі (рис. 6.2).

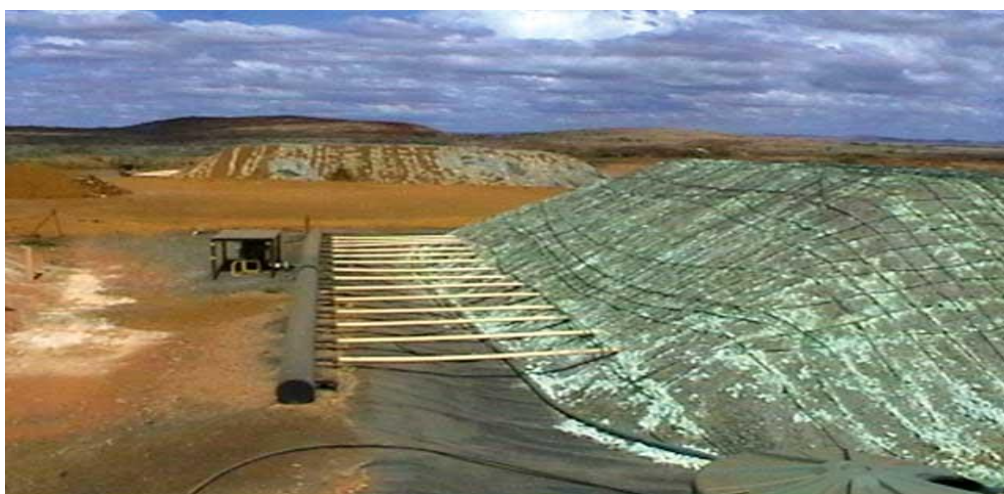


Рисунок 6.2 – Поверхнєве вилуговування металів із куп і відвалів

Вилуговування куп дещо відрізняється від вилуговування відвалів, адже вони містять більший вміст металів, вилучити які можливо за більш короткий термін – декілька місяців. Вилуговування у відвалах може тривати декілька років.

У купах і відвалах подрібнена руда знаходиться під нахилом на водонепроникній основі, поверхню зрошують вилуговуючою рідиною (слабкий розчин кислоти й іонів Fe^{3+}). Розчин, який містить вилугований метал, фільтрується крізь шар породи і збирається знизу. В середовищі розвиваються природні мікроорганізми, тому засів не проводять. Кисле середовище і наявність кисню сприяє підвищенню каталітичної активності *Thiobacillus ferrooxydans*.

Вилуговуюча рідина насосами подається у верхню частину купи руди, розбризкується по її поверхні, яка потім фільтрується крізь неї і стікає униз. Збагачені металами розчини спрямовуються в спеціальні ставки або водойми для вилучення металу. Вилучення проводять методом простого осадження або електролізу. Відпрацьовані розчини, що містять головно розчинне залізо, регенерують в окислювальних ставках і знову подають на відвали.

Чанове вилуговування – бактерійне вилуговування в апаратах, яке застосовують у гірничорудній промисловості для вилучення урану, золота, срібла, міді з *окисних руд* або з *упорних сульфідних концентратів*.

Виробництво більшості металів передбачає концентрування мінералу, що містить метал, із руди. Бактерійне вилуговування сульфідних концентратів має ряд переваг, адже може бути реалізоване безпосередньо в місцях отримання концентрату в районі розробки родовища без зайвих витрат на транспортування. Проте, лімітуючим моментом бактеріального вилуговування є досить низька швидкість протікання цих процесів, а також неповна розчинність деяких металів



Рисунок 6.3 – Чанове вилуговування металів

Чанове вилуговування з упорних сульфідних концентратів проводять у проточному режимі в серії апаратів великих об'ємів, що послідовно поєднані між собою, з перемішуванням, аерацією, при стабілізації температури, рН і концентрації мікроорганізмів у пульпі. Перед завантаженням у апарати концентрат подрібнюють і змішують зі слабким розчином сірчаної кислоти. Важливим моментом чанового вилуговування є наявність систем, що контролюють і стабілізують параметри протікання процесів. Схема чанового вилуговування сульфідних концентратів є замкнутою. Оборотні води після регенерації використовують у якості живильного середовища для бактерій і вилуговуючого розчину.

У промислових масштабах чанове вилуговування застосовують при переробці комплексних мідно-цинкових концентратів, які містять кілька мінералів (*халькопірит, пірит, сфалерит*).

Олововміщуючі концентрати містять *пірит, халькопірит, арсенопірит*, окисли олова. З цього комплексу мінералів бактерії окиснюють, перш за все, арсенопірит (FeAsS). Миш'як є небезпечною домішкою, яка значно утруднює

вилучення олова та золота з таких концентратів. Селективне бактерійне вилуговування миш'яку дозволяє отримати олов'яний і мідний концентрати.

Подібний метод застосовують при вилуговуванні золота з концентратів, що вміщують *пирит* і *арсенопирит*. Золото в таких концентратах тонко вкраплене в кристалічну решітку й вилучити його можна лише після її руйнування. Пірометалургійне спалювання таких концентратів, що містять Арсен, дуже забруднює навколишнє середовище небезпечними арсинами і дає низьку ступінь вилучення благородних металів, тому є малопридатним. Застосування бактерійного вилуговування дозволяє селективно вилучити миш'як із концентратів і перевести його у розчин. Після вилучення миш'яку з таких концентратів можна вилучити методом ціанування до 90 % золота та срібла.

6.3. Біосорбція металів із розчинів

Використання мікроорганізмів для вилучення металів із розчинів, крім екологічного значення, є важливим способом отримання економічно важливих металів.

Основними процесами вилучення металів із розчинів за участі мікроорганізмів є наступні: *біосорбція*, *осадження у вигляді сульфідів*, *відновлення шестивалентного хрому*.

Біосорбція – новий підхід до вирішення проблеми видобутку металів із розведених розчинів. За допомогою біосорбції навіть з розведених розчинів можливе 100 % вилучення свинцю, ртуті, міді, нікелю, хрому, урану і 90 % золота, срібла, платини, селену.

При біосорбції металів із розчинів мікроорганізми, як правило, нагромаджують їх у біомасі до певної концентрації. Механізм такої адсорбції часто пов'язаний з клітинними стінками мікроорганізмів.

Способи біосорбції можуть бути різноманітними, наприклад, пропускання розчину металів крізь *мікробний біофільтр*, що представляє собою живі мікробні клітини, які адсорбовані на вугіллі, або біосорбентів на основі мікробних полісахаридів. Біосорбент **М**, який містить живі клітини *Penicillium chrysogenum*, використовують в установках, що містять іонообмінні смоли, для вилуговування урану.

Після концентрування металів мікроорганізмами на наступній стадії слід вилучити метали з мікробної біомаси. Для цього існують різні способи: *недеструктивні* і *деструктивні*, засновані на екстракції шляхом порушення мікробних клітин, наприклад, із застосування кислот або лугів.

Вилуговування металів із розчинів на основі *осадження сульфідів* відомий давно. Сульфатвідновлювальні мікроорганізми виділяють сірководень, який практично повністю зв'язує розчинені метали, викликаючи їх осадження. Цей метод дозволяє вилучити до 98,5% міді.

Практичний інтерес представляє метод *відновлення шестивалентного хрому* в розчинах. Відомі види бактерій, які здатні в анаеробних умовах

відновлювати шестивалентний хром, що міститься в побутових стічних водах, до тривалентного, який далі осаджується у вигляді $\text{Cr}(\text{OH})_3$.

6.4. Біотехнологія збагачення руд

До перспективних напрямів біогеотехнології металів належить збагачення руд і концентратів з використанням сульфатредуючих бактерій за допомогою яких можливо розробити принципово нові процеси і вдосконалити існуючі.

При проведенні процесів флотації окиснених мінералів свинцю і сурми використання сульфатредуючих бактерій підвищує на 6-8 % вилучення мінералів у результаті сульфідізації окислів; у процесах флотації *церуситу* (PbCO_3), вилучення свинцю зростає на 20-25 %. Застосування біотехнологічних методів дозволяє збільшити сировинні ресурси, забезпечує комплексне використання металів.

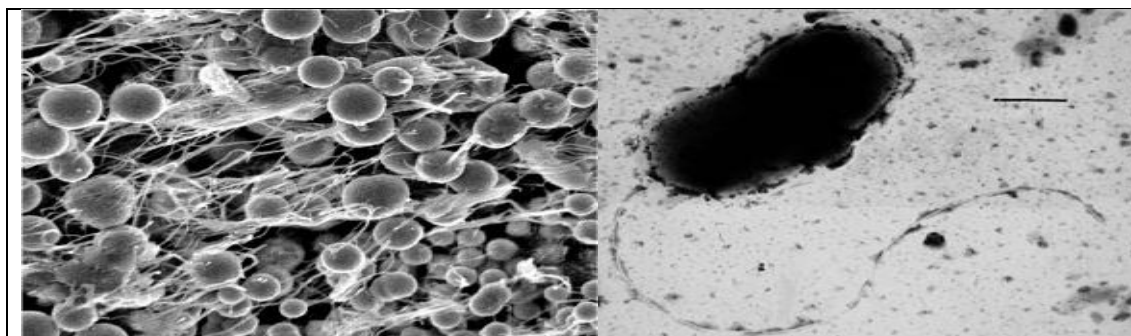


Рисунок 6.4 – Сульфатвідновлювальні бактерії

6.5. Акумуляція металів зі стічних вод

Мікроорганізми відіграють велику роль в акумуляції металів зі стічних вод, що є важливим як для біометалургії, так і для їх очищення. Для вирішення цієї проблеми використовують мікроорганізми, які здатні сорбувати і осаджувати іони металів.

Видалення металів з розчинів може відбуватися:

1) шляхом адсорбції іонів металів або на поверхні або всередині клітин мікроорганізмів;

2) шляхом хімічного перетворення.

Адсорбція металів на поверхні клітин обумовлена присутністю в клітинних стінках мікроорганізмів груп PO_4^{3-} , COOH^- , HS^- , OH^- . Адсорбція відбувається швидко, зворотно і не залежить від температури й енергетичного метаболізму. Так, клітини *Saccharomyces cerevisiae* і *Rhodothorula arrhizus* адсорбують уран зі стічних вод у кількості 10-15 % і 18,5 % від сухої біомаси відповідно, а клітини *Pseudomonas aeruginosa* здатні внутрішньоклітинно акумулювати уран до 56 % сухої біомаси.

Вважають, що нагромадження заліза й марганцю пов'язане із захистом клітини від токсичної дії перекису водню, який утворюється при аеробному рості бактерій. Відкладення оксидів металів відбувається в асоціації з екстрацелюлярними полімерами (кислими полісахаридами, білками або поліліпосахаридними комплексами), які інкрустуються металами.

У клітинах мікроорганізмів, здатних акумулювати метали, виявлені внутрішньоклітинні компоненти, які мають високу специфічність до металів (наприклад, білок **металотіанін**, що утворює хелатуючі ділянки у вигляді SH-груп).

Іншим мікробіологічним процесом осадження металів зі стічних вод є хелатування металів сульфатвідновлювальними мікроорганізмами, які утворюють нерозчинні металосульфати (бактерії рр. *Desulfurella*, *Desulfovibrio*). Сірководень, який утворюється в процесі життєдіяльності сульфатвідновлювальних мікроорганізмів практично повністю осаджує метали із розчинів, що містять мідь у формі ціаніду. Вони також можуть використовувати різні метали як акцептори електронів, переводячи їх в менш токсичні малорозчинні форми.

Основним механізмом видалення важких металів з розчину за участю сульфатвідновлювальних мікроорганізмів є утворення сульфідів. Відомі два підходи:

1) біологічна і хімічна системи працюють незалежно, щоб захистити клітину від впливу високої кислотності і підвищеної концентрації важких металів;

2) спочатку використовують сульфатвідновлювальні мікроорганізми для перетворення сульфату в сульфід, а потім надлишок сульфіду, що є токсичним для бактерій, окиснюють у спеціальному реакторі з утворенням сірки, яку можна використовувати у хімічній промисловості.

Для біосорбції металів із розчинів і очищення стічних вод від нітратів використовують денітрифікуючі бактерії (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*).

Хромвідновлювальні бактерії рр. *Pseudomonas*, *Aeromonas* переводять високотоксичні сполуки шестивалентного хрому в менш токсичну тривалентну форму в стічних водах гальванічних виробництв.

6.6. Очищення вугілля, нафти і газу

Сірка присутня у вугіллі у вигляді піриту (до 10 %) і органічних сполук. Таке вугілля не можна спалювати, оскільки при згорянні утворюється сірчистий газ, що належить до сильних забруднювачів атмосфери. Піритну сірку можна видалити з кам'яного вугілля за допомогою *Thiobacillus ferrooxidans* (до 97%) і *Sulfolobus acidocaldarius* (до 90 %).

Мікроорганізми-метанотрофи здатні знижувати концентрацію метану у вугільних шахтах, який там нагромаджується і є дуже вибухонебезпечним. Для цього суспензію бактерій закачують у вугільний пласт через систему свердловин. У відпрацьованих свердловинах, де припинено видобування вугілля, необхідно наносити на поверхню породи суспензію метанотрофних

бактерій. За рахунок окисної дії метанотрофів за 2-4 тижні усувається до 60-70 % метану.

Очищення нафти від сірки здійснюють шляхом окиснення дибензотіофену за допомогою бактерій *Pseudomonas alcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. putida*.

Підраховано, що при використанні сучасних технологій в середньому 40-60 % нафти не піднімається на поверхню землі. Для підвищення видобутку нафти із родовищ перспективно використовувати мікроорганізми або їх метаболіти, які знижують в'язкість нафти, чим сприяють її видобутку.

Збагачення нафтових свердловин мікроорганізмами можливе:

1) шляхом стимуляції ендогенної мікрофлори при додатковому внесенні необхідних поживних речовин, закачування повітря для аеробних мікроорганізмів, або внесення меляси для анаеробів;

2) закачуванням у свердловину селекційні штами мікроорганізмів, здатних утворювати поверхнево-активні речовини, гази, біополімери;

3) одержанням і використанням продуктів життєдіяльності мікроорганізмів, які сприяють повнішій віддачі нафти нафтоносними пластами (біополімери, спирти, кетони, кислоти, біоповерхневі речовини).

Використання біоповерхнево-активних речовин сприяє зниженню міжповерхневого натягу в системі «вода – нафта», що збільшує рухливість нафти.

Питання для самоконтролю:

1. Назвіть новітні тенденції у розвитку біотехнології металів.
2. Що собою являє бактерійне вилуговування металів?
3. Охарактеризуйте технологію бактерійного вилуговування кольорових металів.
4. Наведіть схему бактерійного вилуговування металів.
5. Назвіть основні процеси вилучення металів з розчинів.
6. Що таке біосорбція металів?
7. Які мікроорганізми використовують для збагачення руд?
8. Назвіть способи видалення металів з розчинів.
9. Які мікроорганізми здатні акумулювати метали зі стічних вод?

Виберіть правильну відповідь:

1. Процес видобування металів із руд, концентратів, гірських порід і розчинів за допомогою мікроорганізмів чи їх метаболітів називають:

- А) бактерійним вилуговуванням металів;
- Б) висолюванням;
- В) адсорбцією металів на носіях.

2. Виберіть бактерії, які окиснюють Fe^{2+} і одночасно відновлюють сульфуровмісні сполуки й активні при вилуговуванні міді та урану:

- А) *Thiohacillus ferrooxidans*;
- Б) рід *Stibiobacter*;

В) *Sulfolobus brierleyi*.

3. Назвіть мікроорганізми, що активно екстрагують метали з мінералів:

А) *Thiobacillus ferrooxidans*, *T. acidophilus*, *T. organoparus*;

Б) *Sulfolobus brierleyi*;

В) *Methanobacterium*, *Azotobacterium*;

Г) *Methanosarcina*, *Bacillus*;

Д) *Methanospirillum*, *Pseudomonas*.

4. Як називають процес добування металів із розведених розчинів за допомогою мікроорганізмів?

А) біосорбцією;

Б) бактерійним вилюговуванням металів;

В) висолюванням.

5. На видобуток яких сполук поширюється процес вилюговування за участю мікроорганізмів?

А) цинку, ванадію, марганцю, золота;

Б) вугілля, позбавленого сірки;

В) свинцю, ртуті, цинку, міді, нікелю;

Г) кобальту, марганцю, хрому, урану.

6. Назвіть переваги бактерійного вилюговування в порівнянні з пірометалургійними технологіями:

А) здатність переробляти бідні руди і відходи, використання яких звичайними методами економічно не вигідне;

Б) вибірковість виділення одного металу зі складних руд;

В) менші енерговитрати і збереження чистоти довокілля.

7. За допомогою яких мікроорганізмів видаляють піритну сірку з кам'яного вугілля?

А) *Thiobacillus ferrooxidans*;

Б) *Sulfolobus acidocaldarius*;

В) *Methanobacterium*, *Methanosarcina*;

Г) *Methanospirillum*;

Д) *Pseudomonas alcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. putida*.

8. За допомогою яких мікроорганізмів видаляють сірку з нафти?

А) *Thiobacillus ferrooxidans*;

Б) *Sulfolobus acidocaldarius*;

В) *Methanobacterium*, *Methanosarcina*;

Г) *Methanospirillum*;

Д) *Pseudomonas alcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. putida*.

9. Які мікроорганізми можуть адсорбувати метали зі стічних вод?

А) *Saccharomyces cerevisiae*;

Б) *Rhodothorula arrhizus*;

В) Бактерії родів *Desulfuricans*, *Desulfovibrio*;

Г) Бактерії *Pseudomonas aeruginosa*.

Тематичний розділ 3. Екологічна біотехнологія

Тема 7. Біологічні методи очищення стічних вод

Мета: сформувати знання про сучасні досягнення біотехнології в очищенні промислових і побутових стоків, методи контролю за якістю води, біологічні методи очистки стічних вод.

План

1. Очисні споруди, принципи та методи їх роботи.
2. Екстенсивні способи очищення стічних вод.
3. Інтенсивні способи очищення стічних вод.

Основні терміни і поняття: стічні води, процеси аеробного очищення, процеси анаеробного очищення, хімічне споживання кисню, біохімічне споживання кисню, муловий індекс, активний мул, аеротенки, метантенки, біофільтрація, рециркуляція, біоконвеєр.

7.1. Очисні споруди, принципи та методи контролю їх роботи

Кількісний і якісний склад мікрофлори різних природних джерел води різноманітний. Він залежить, насамперед, від забруднення води. Особливо різноманітний склад мікроорганізмів у стічних водах. Загальна кількість у 1 мл активного мулу стічних вод становить 10-20 млрд. клітин.

У зв'язку з бурхливим розвитком промисловості і ростом населення міст різко зросла кількість різноманітних стічних вод (**СВ**), які неочищеними спускають у відкриті водойми. Саме цей фактор є основним джерелом забруднення води.

Стічні води можна поділити на дві категорії:

1. Води, які містять нетоксичні органічні речовини (побутові відходи разом з фекаліями; води підприємств харчової та целюлозної промисловості). Вони не несуть загрози для гідробіонтів.
2. Води, які містять токсичні продукти, а також радіоактивні речовини (відходи з підприємств металургійної та хімічної промисловості, ксенобіотики). Вони створюють умови для гідробіонтів, несумісні з життям.

За походженням стічні води поділяються на природні, побутові і промислові.

Промислові та побутові стічні води є постійним джерелом забруднення довкілля. Тому їх очищення й утилізація є важливою складовою сучасної біотехнології. Застосування тільки хімічних методів очищення стічних вод і їх зливу до водойм без попереднього біологічного очищення абсолютно виключне. Метод такого очищення базується на використанні специфічних біологічних угруповань, що мають назву **активний мул**.

Хімічний склад СВ постійно змінюється, тому для їх очищення необхідно застосовувати складні угруповання мікроорганізмів, що включають різні бактерії, водорості, найпростіші тощо. Шляхом узгодженого метаболізму вони поглинають домішки з води. У різних очисних спорудах використовують активний мул індивідуального складу.

Способи біологічного очищення стічних вод класифікують по-різному.

Розрізняють:

- екстенсивні (пасивні) та інтенсивні (активні) методи очищення;
- за використанням методів очищення – фізичні, фізико-хімічні, біологічні;
- всі процеси які йдуть за участі бактерій – аеробні й анаеробні.

Процеси аеробного очищення :

- ріст бактерій у суспензії (процеси активного мулу, нітрифікація та керовані лагуни);
- ріст бактерій на несучій поверхні (за допомогою різних біофільтрів).

Процеси анаеробного очищення:

- ріст бактерій у суспензії (процеси анаеробного засвоєння органічних сполук);
- ріст бактерій на несучій поверхні (за допомогою анаеробних біофільтрів).

Методи контролю за якістю води

Методи контролю за якістю води: біологічні, хімічні, фізико-хімічні.

1. Методи біологічного контролю: спостереження за якісним і кількісним складом мікрофлори активного мулу, біоплівки (особливо грибної, що закупорює отвори між наповнювачами, зменшує аерацію і призводить до загибелі біоплівки);

2. Хімічні методи контролю: хімічне споживання кисню (ХСК), біохімічне споживання кисню (БСК), муловий індекс (МІ).

Хімічне споживання кисню – характеризує загальний вміст у воді органічних та неорганічних речовин, які здатні реагувати зі сильними окислювачами, і виражається в одиницях кількості кисню, який втрачається на їх окислення.

Біохімічне споживання кисню – кількість кисню (мг), яка необхідна для окислення органічних речовин, що містяться у 1 л стійкої води в результаті аеробних процесів.

Муловий індекс – показує об'єм, який займає 1 г активного мулу після повторного відстоювання. Його зростання свідчить про набухання активного мулу, тобто про негативні зміни його структури.

7.2. Екстенсивні способи очищення стічних вод

До екстенсивних способів належить очищення **СВ** у біологічних ставках, полях зрошення і полях фільтрації, які забезпечують ефективність очищення води до 99,9 %. У таких випадках додаткова дезінфекція, як правило, не потрібна.

Біологічні ставки – належать до споруд біологічного очищення, у яких під дією природного біоценозу активного мулу проходить окислення органічних забруднень. Як правило, вода, що виходить зі ставків, не містить патогенну мікрофлору.

Ставки можуть застосовуватись як для попереднього, так і для глибинного очищення стічних вод, які вже пройшли біологічне очищення. Розрізняють ставки з природною і штучною аерацією. Найбільш ефективно окислювальні процеси в ставках відбуваються в літній період. Крім того, у цей час вода, що виходить зі ставків, не містить патогенної мікрофлори. Бактерицидну дію щодо патогенів проявляють метаболіти одноклітинних водоростей і вищої водної рослинності. Застосування штучної аерації значно пришвидшує процеси очищення води. Біологічні ставки застосовуються для очищення **СВ** заводів органічного синтезу, нафтохімічних підприємств.

Поля фільтрації – використовують винятково для очищення **СВ**. На них подають максимальну кількість рідини.

Поля зрошення – призначені для вирощування сільськогосподарської продукції, тому вода на них подається за необхідності (періодично, через 5-6 діб). **СВ** підвищують якість ґрунту, вони містять доступні для рослин форми азоту, фосфору, калію.

Недоліками цих споруд є низька окиснювальна здатність, сезонність роботи, потреба у великих територіях, некерованість процесу тощо.

7.3. Інтенсивні способи очищення стічних вод

Очисні споруди з аеробними процесами

Традиційний метод штучного біологічного очищення **СВ** за допомогою активного мулу аеротенків (запропонований ще в 1914 р. Е. Ардерном і В.Т. Локкетом).

Аеротенки – резервуари, у яких **СВ**, що очищається, і активний мул насичуються повітрям і перемішуються (рис. 7.1 – 7.2).

СВ після ретельного механічного очищення від різного сміття, піску, домішок, що осідають чи спливають, потрапляє в споруду (глибина 4-6 м, довжина 50-250 м, ширина – 3-11 м.), де за постійної аерації очищається гідробіоценозом активного мулу. Після тривалого очищення (6–24 і більше годин) вода надходить у **вторинний відстійник**, у якому звільняється від активного мулу, а потім потрапляє для третинного фізико-хімічного доочищення (іноді після хлорування) у проміжні водойми (ставки) і, нарешті, у

річку чи інше джерело. Частину активного мулу, що осідає, повертають до аеротенка.

Проблему за такої технології створює надлишковий мул, який містить віруси, мікроорганізми, яйця гельмінтів, а також іони і солі важких металів, біологічно стійкі, токсичні та мутагенні сполуки, які пригнічують життєдіяльність мікроорганізмів активного мулу. Порушення роботи аеротенка переважно пов'язують із розбуханням мулу, коли флокули погано осаджуються у вторинному відстійнику, внаслідок чого вони виносяться разом з очищеною водою. Основною причиною цього явища є розвиток нитчастих бактерій або плісневих грибів, які заважають осадженню флокулів мулу.

Біологічне очищення вважають повним, якщо біохімічне споживання кисню повністю очищеної води становить менше 20 і неповним – більше 20 мг/л.

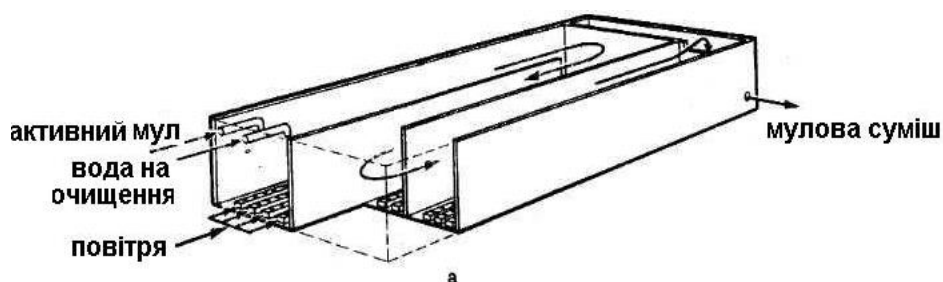


Рисунок 7.1 – Схема аеротенка-витискувача

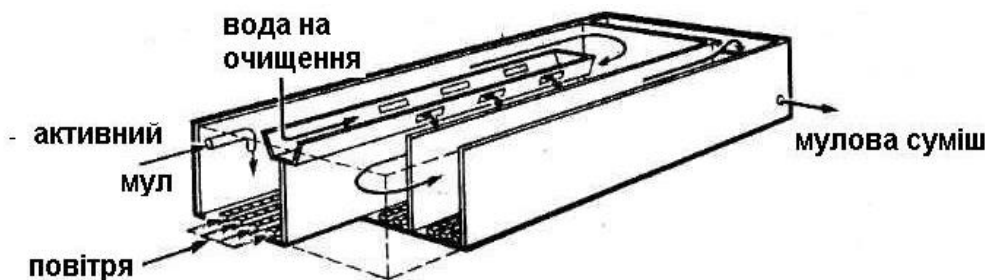


Рисунок 7.2 – Схема аеротенка з розподіленою подачею стічної води та регенератором активного мулу

Іншим способом очищення води з аеробними процесами, які належать до інтенсивних, є **біофільтрація**. Для очищення виробничих СВ у штучних умовах застосовують **біологічні фільтри** (рис. 7.3).

Найважливішою складовою частиною біофільтру є завантажувальний матеріал. За типом завантажувального матеріалу всі біофільтри поділяють на дві категорії:

- з об'ємним завантаженням (краплинні, високо навантажувальні, баштові);

- з площинним завантаженням (з жорстким засипним, жорстким блоковим і м'яким завантаженням).

У біофільтрах з об'ємним завантаженням використовують гравій, керамзит, з площинним – шифер, листи пластмаси, синтетичні тканини.

Пропускна здатність біофільтрів визначається площею поверхні сорбційних процесів біоплівки і можливістю вільного доступу повітря.

Для того, щоб не відбувалося замулювання поверхні біофільтра, застосовують **рециркуляцію**.

Рециркуляція – це повернення частини очищеної води для розведення вихідної **СВ**. Це збільшує вміст розчинного кисню в суміші, що подається на біофільтр; вирівнює концентрацію біоплівки за висотою споруди, вирівнює піки концентрації забруднень, значно зменшує навантаження на біофільтр.

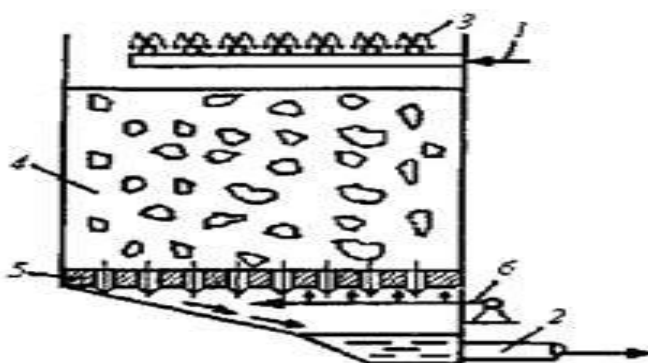


Рисунок 7.3 – Схема біофільтра: 1, 2 – труби для подачі й відведення води; 3 – розприскувачі; 4 – фільтраційне навантаження; 5 – дренаж; 6 – подача повітря

Біофільтри класифікують на кілька категорій:

1. **Краплинні біофільтри** – використовують для очищення **СВ** різних виробництв.

2. **Занурюючі біофільтри** – очищають **СВ** каніфольно-екстракційних заводів, термічної переробки сланців, виробництва каучуку.

СВ у резервуарі аерується внаслідок занурення і обертання валу з дисками, на яких наростає біоплівка (товщиною до 4 мм). Це сприяє підтримуванню активного мулу в суспендованому стані.

Мікрофлора мулу представлена бактеріями родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Sarcina*, *Nocardia*.

3. **Біотенки – біофільтри**. Це споруда, що складається з корпусу і розміщених всередині нього один над одним шарів наповнювачів. Стічна вода стікає униз. При цьому **СВ** омиває зовнішні частини елементів, на яких утворюється біоплівка.

На відміну від активного мулу, у якому якісний склад мікроорганізмів практично однаковий, в усіх частинах очищення, на різних рівнях біофільтра створюється специфічні мікробоценози, що сильно відрізняються за кількісним і якісним складом, що обумовлює поетапне очищення води. Спочатку

утилізуються речовини, що більш легко засвоюються мікроорганізмами, потім – важкодоступні речовини.

Використання активного мулу і біофільтрів – інтенсивні методи очищення, які значною мірою залежать від температури, рН середовища, концентрації розчинного кисню.

Очисні споруди з анаеробними процесами

До очисних споруд з анаеробними процесами відносяться анаеробні біофільтри, метантенки, септикенки та двоярусні відстійники (рис. 7.4).

1. Анаеробні біофільтри – закриті резервуари, через які вода профільтровується потоком без кисню. Анаеробні біофільтри за принципом роботи займають проміжне місце між звичайними біофільтрами і метантенками. Біоплівка в них закріплена на матеріалі завантаження, а процеси окислення супроводжуються метаноутворенням.

При анаеробному очищенні забруднених **СВ**, що складається в основному з осадів, частіше використовують метантенки, септикенки і двохярусні відстійники (система решіток і первинних відстійників).

У спорудах проходить мікробіологічне розкладання органічної речовини в анаеробних умовах, при цьому:

- відбувається зміна фізичної структури осаду і полегшується його висушування;
- зменшення маси осаду шляхом перетворення органічних речовин у газу бродіння і розчинні солі жирних кислот;
- утилізація горючих газів бродіння в паливо;
- утворення добрива;
- поліпшення санітарної безпеки осаду (важливо при використанні його як добрива на полях).

Залишок твердої фази **СВ** називається **септичним мулом**, його використовують як добриво та паливо.

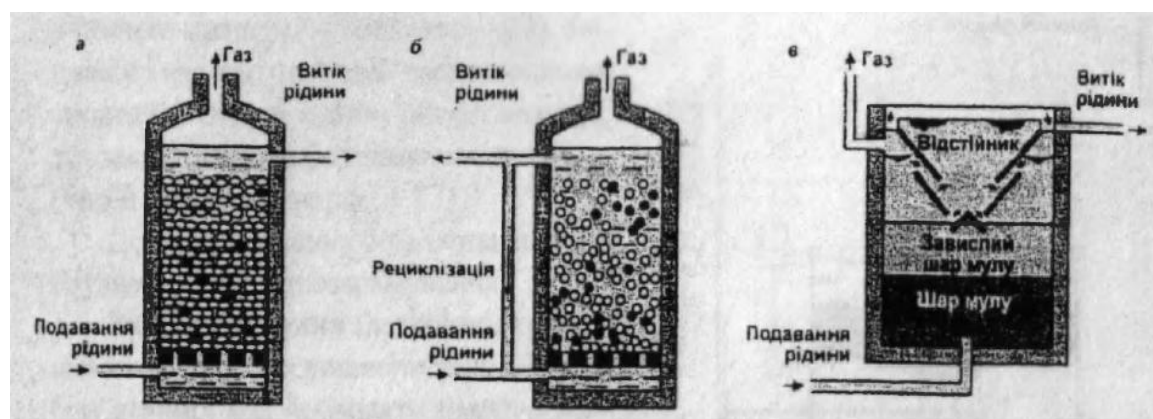


Рисунок 7.4 – Біореактори для анаеробного очищення стічних вод:
 а – анаеробний біофільтр; б – циклічний анаеробний біофільтр; в – анаеробний біореактор

2. **Метантенки** використовують для першого ступеня очистки висококонцентрованих СВ. У них відбувається інтенсивний метаногенез. Цей спосіб зброджування органічних відходів є найбільш перспективним у вирішенні екологічних і енергетичних проблем, що дає змогу агропромисловим комплексам перейти на самостійне енергопостачання завдяки **одержанню біогазу**. У метантенках здійснюється тільки збродження осадів з первинних відстійників, надлишкового активного мулу і біоплівки.

Метантенк – це закрита камера різної конструкції, завантажена муловим осадом з відстійників (рис. 7.4). Процес відбувається завдяки швидкому перемішуванню і штучному підігріву цієї маси до $+30-35^{\circ}\text{C}$, внаслідок чого в ній розвиваються мезофільні мікроорганізми. Підвищення температури до $+50-55^{\circ}\text{C}$ не тільки підвищує розпад, але й призводить до глибшого розвитку термофільних анаеробних мікроорганізмів, які мають швидкий обмін речовин унаслідок високої активності ферментів.

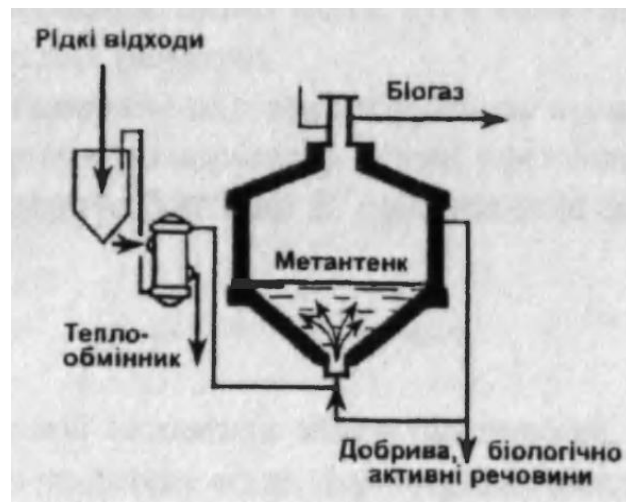


Рисунок 7.5 – Схема метантенка

3. **Септикенки і двохярусні відстійники** призначені для одночасного осадження речовин зі стічної рідини і анаеробного розкладу вихідного осаду (рис. 7.6).

При розкладанні осадів розрізняють дві фази: кислу (водневу) і лужну (метанову).

У **кислій фазі** (водневій) карбоновмісні речовини розкладаються з утворенням легких кислот (оцтова, молочна, масляна), спиртів, ацетону, CO_2 , і H_2 . У **лужній фазі** (метаногеновій) в основному відбуваються процеси, пов'язані з накопиченням метану. За участю анаеробних метанових бактерій відбувається метанове бродіння, у результаті якого утворюються CH_4 і CO_2 . Крім цього, метан утворюється в результаті відновлення CO_2 , коли донором Гідрогену є масляна кислота або молекулярний водень – продукти розкладання речовин у кислій фазі.

Септиктенк, або перегнівач – це горизонтальний відстійник через який повільно протікає концентрована **СВ**, а осад, що випадає, перегниває протягом тривалого часу.

Процес очищення **СВ** у ньому відбувається значно повільніше. **СВ** підлягає освітленню протягом 1-4 діб, а осад зберігається 6-12 місяців. Гази, які виділяються при розкладанні осаду під час бродіння, піднімаються у вигляді бульбашок, забираючи у верхні шари частинки осаду, що злипаються й утворюють на поверхні септиктенка прошарок, який потім ущільнюється. На прошарку поселюються плісеневі гриби, які пронизують його своїми гіфами. Це сприяє встановленню анаеробних умов і частково зберігає тепло, що забезпечує оптимальні умови для мікроорганізмів, які здійснюють анаеробний розклад органічної частини осаду.

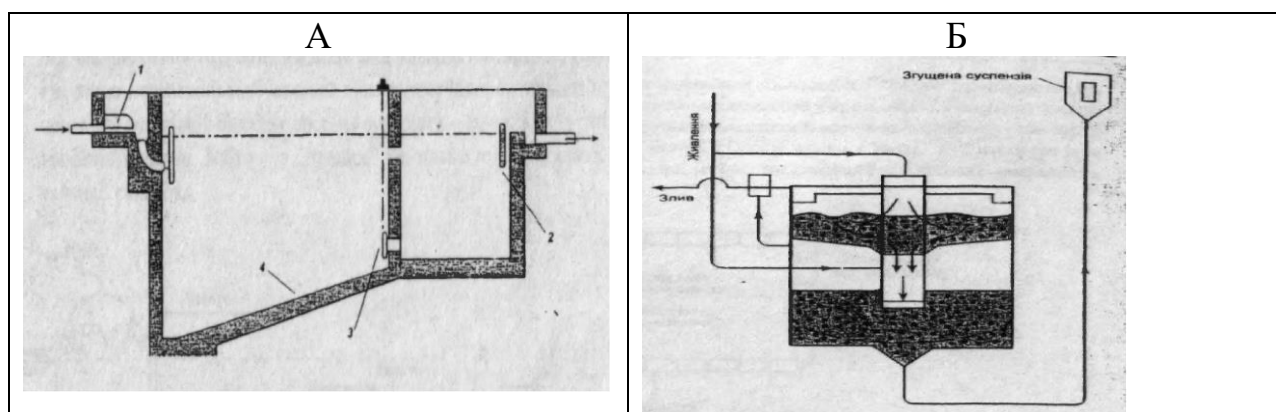


Рисунок 7.6 – Схема септиктенка (А) і двох'ярусного відстійника (Б).

Двох'ярусні відстійники (емшери, або емшерські басейни) – призначені для виділення осаду зі **СВ** і одночасно для його анаеробного розкладу тим же комплексом мікроорганізмів, що і в метантенку. В емшерах цей процес закінчується швидше, ніж у септиктенку, але повільніше, ніж у метантенку. **СВ** повільно протікає горизонтальним коридором, суспендовані частини осідають, провалюються крізь щілини і попадають у нижню частину відстійника, де проходить їх біохімічне розкладання. Мул, який перегнив, періодично виводиться з дна відстійника через мулову трубу, а на його місце всмоктується мул із шару, розміщеного вище.

Біоконвеєр

Біоконвеєр – прямотечійна багатоступінчаста система очищення води (рис. 7.7). Технологічна суть **біоконвеєра** полягає в тому, що на шляху води, яку потрібно очистити, розміщуються гідробіонти – анаеробні бактерії, аеробні мікроорганізми (копіотрофи, оліготрофи), найпростіші, фільтратори, хижачки. Дані групи організмів населяють резервуари зі стічними водами і, перебуваючи на своїх «робочих місцях», використовують з води розчинені у ній органічні

сполуки і біомасу відмерлих організмів. У результаті на виході отримують чисту воду і в сотні разів меншу кількість біомаси.

Важливим є те, що в біоконвеєрі, на відміну від біологічного очищення іншими способами, кожен гідробіонт вільний у своєму виборі «місця проживання». Це дуже важливо, оскільки тільки вільний організм працює з максимальної продуктивністю.

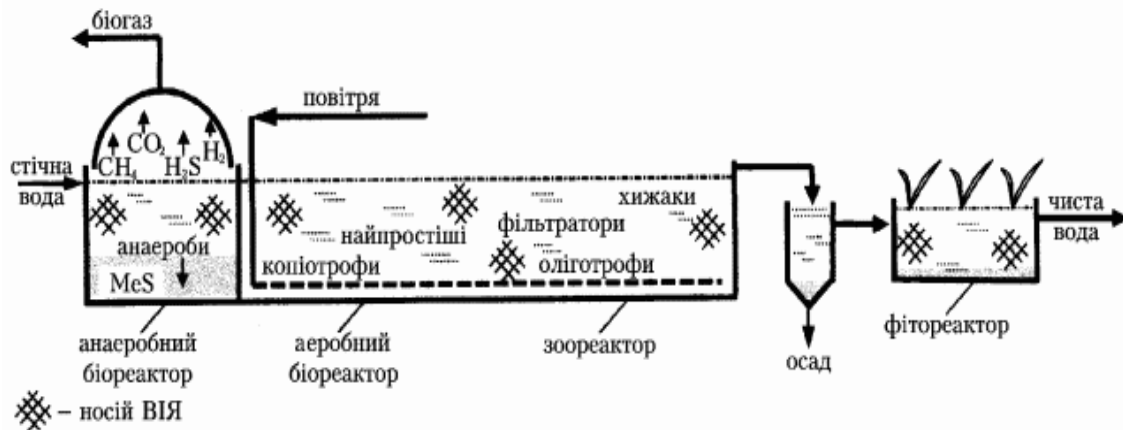


Рисунок 7.7 – Біоконвеєр: 1 – стічна вода; 2 – анаеробний біореактор; 3 – аеробний біореактор; 4 – зоореактор; 5 – осад; 6 – фітореактор; 7 – чиста вода; 8 – біогаз; 9 – повітря; 10 – носій типу «вія»

Основні переваги такої схеми очищення:

- У біоконвеєрі можна очищати будь-які (природні, зливові, побутові, промислові стічні) води, що містять надзвичайно отруйні сполуки або речовини, очистити воду від яких неможливо не тільки традиційними біологічними, а й різноманітними фізико-хімічними методами. Це розчинені органічні сполуки, навіть гранично токсичні, канцерогенні чи мутагенні, за будь-яких концентрацій.

- Біоконвеєр дає змогу доводити якість очищеної води до будь-якого заданого ступеня чистоти.

- Біоконвеєр знімає проблему надлишкової біомаси, оскільки вона споживається і мінералізується в трофічному ланцюгу. Причому, що більша кількість трофічних рівнів задіяна в біоконвеєрі, то менша біомаса залишається в очищеній воді. Досить мати в очисній споруді трофічний ланцюг у 2-3 ланки, щоб зменшити кількість надлишкової біомаси в 100-1000 разів.

- Регулярні волокнисті насадки з іммобілізованими мікроорганізмами-деструкторами дають змогу організувати відповідний трофічний ланцюг гідробіонтів, що різко (на порядок) зменшує кількість надлишкової біомаси, бо вона споживається і мінералізується у трофічному ланцюгу, а її зольність при цьому зростає майже вдвічі. Така біомаса легко осідає, добре віддає воду, займає невеликий об'єм і не становить екологічної небезпеки.

Отже, проточна система очищення води за допомогою іммобілізованих на регулярних волокнистих насадках мікроорганізмів-деструкторів найнебезпечніших забруднень, а також більш організованих гідробіонтів – седиментаторів, хижаків, фільтраторів – дає змогу очищувати будь-які промислові стічні води й одержувати воду бажаного ступеня чистоти.

Питання для самоконтролю:

1. Охарактеризуйте очисні споруди за принципами їх роботи.
2. Чим відрізняються побутові та промислові стічні води?
3. Назвіть методи контролю за якістю води.
4. Які показники використовують для контролю якості очищення води?
5. Назвіть екстенсивні способи очищення стічних вод.
6. Які існують інтенсивні способи очистки стічних вод?
7. Поясніть принцип роботи аеротенків і метантенків.
8. Які переваги інтенсивних способів очистки?
9. Назвіть переваги очистки стічних вод у біоконвеєрі.

Виберіть правильну відповідь:

1. Метод біологічного очищення промислових і побутових стічних вод базується на використанні специфічних біологічних угруповань:

- А) біофільтри;
- Б) мікробіоценоз;
- В) активний мул.

2. У яких очисних спорудах на різних рівнях створюються свої ценози мікроорганізмів, що відрізняються за своїм кількісним і якісним складом?

- А) біофільтрах;
- Б) мікробіоценозах;
- В) активному мулі.

3. Виберіть ряд особливо токсичних для мікроорганізмів активного мулу важких металів:

- А) Sb > Ag > Cu > Hg > Co > Ni > Pb > Cr > Cd > Zn > Fe;
- Б) Sb > Ag > Cu > Hg > Co;
- В) Sb > Cd > Zn > Fe > Co > Ag > Cu > Hg > Co.

4. Назвіть інтенсивні методи очищення, які значною мірою залежать від температури, рН середовища, концентрації розчинного кисню:

- А) використання активного мулу і біофільтрів;
- Б) біологічні ставки;
- В) поля зрошення, поля фільтрації;
- Г) метантенки та септиктки;
- Д) біоконвеєр.

5. Назвіть екстенсивні способи очищення стічних вод:

- А) використання активного мулу і біофільтрів;
- Б) біологічні ставки;

- В) поля зрошення, поля фільтрації;
- Г) метантенки;
- Д) септиктенки.

6. Для очищення висококонцентрованих стічних вод використовують очисні споруди, що мають назву...

- А) метантенки;
- Б) аеротенки;
- В) біологічні ставки;
- Г) біоконвеєр.

7. Як називають показник, що характеризує кількість кисню (мг), яка необхідна для окиснення органічних речовин, що містяться в 1 л стічної води в результаті аеробних біологічних процесів?

- А) біохімічний показник кисню;
- Б) хімічний показник кисню;
- В) муловий індекс.

8. Муловий індекс показує:

А) об'єм, який займає 1 г активованого мулу;
 Б) загальний вміст у воді органічних і неорганічних речовин, які здатні реагувати зі сильними окиснювачами, і виражається в одиницях кількості кисню, який витрачається на їх окиснення;

В) кількість кисню (мг), яка необхідна для окиснення органічних речовин, що містяться в 1 л стічної води в результаті аеробних біологічних процесів.

9. До очисних споруд з аеробними процесами належать:

- А) метантенки;
- Б) аеротенки;
- В) біоконвеєр;
- Г) двоярусні відстійники;
- Д) септиктенки.

10. Які методи очистки застосовують для знезаражування стічних вод м'ясокомбінатів?

- А) озонування;
- Б) радіаційний;
- В) електролізу.

Виконайте завдання:

1. Складіть класифікацію методів очистки стічних вод.
2. Складіть класифікацію очисних споруд за принципами їх роботи.

Тема 8: Утилізація твердих відходів

Мета: сформувати знання про методи екобіотехнології для утилізації агровідходів і твердих побутових відходів як альтернативу вирішення проблеми енергозбереження та раціонального природокористування.

План

1. Утилізація агровідходів.
2. Утилізація гною.
3. Утилізація твердих побутових відходів.

Основні терміни і поняття: агровідходи, тверді побутові відходи, компостування, біодеградація, біоконверсія, термофільний режим, мезофільний режим.

Сільське господарство і м'ясопереробна промисловість – базові галузі народного господарства. В даний час у світі тільки зерна виробляється близько 2,0 млрд. т, м'яса – близько 200 млн. т. Значні масштаби випуску продукції обумовлюють досить істотну кількість відходів сільського господарства (рослинництво, тваринництво) і м'ясопереробки. Зокрема, маса післяжнивних пожнивних залишків, коренів зернових (жито, пшениця, овес) і картоплі зазвичай дорівнює 3-6 т/га. Значно більше залишають трави: однорічні (вика, люпин та ін.) – 8-12 т/га, багаторічні (конюшина, люцерна, тимофіївка та ін.) – 12-25 т/га.

Пошук альтернативних методів утилізації відходів є актуальним і сьогодні. Запропоновані наступні способи:

- компостування;
- вивезення на поля нативного посліду, гною або стоків;
- переробка гною й посліду на корм;
- застосування біоенергетичних методів і нових технологій утилізації посліду;
- створення рибоводно-біологічних ставків тощо.

8.1 Утилізація агровідходів

Компостування відходів

Вторинна сировина агропромислового комплексу, яка є відходами агрогосподарств (кукурудзяні качани, лушпиння соняшника, соняшникові та кукурудзяні стебла, рисова та пшенична соломи, біомаса водойм), має органічну природу (крохмаль, целюлоза, білки, жири, пектин, лігнін) і може бути перероблена на нові корисні продукти методами екобіотехнології.

Природні біополімери надходять у довкілля з рослинними матеріалами зеленої біомаси. Потрапляючи в ґрунт, вони беруть участь в утворенні гумусових речовин, потрапляючи у відходи – піддаються гниттю. У розкладанні та мінералізації природних біополімерів беруть участь аеробні та анаеробні мікроорганізми-гідролітики, котрі синтезують ферменти, що можуть піддавати гідролізу біополімери до простих цукрів чи жирних кислот (під час підготовчого метаболізму). Продукти гідролізу можуть надходити до клітин гідролітиків та супутніх мікроорганізмів та метаболізуватися до CO_2 та H_2O . Мікроорганізми-деструктори природних високомолекулярних сполук здатні розкладати не тільки природні полімери, а й синтетичні полімерні матеріали.

Залежно від якості твердих відходів (тверді побутові та тверді промислові, тверді агротехнічні та відходи тваринницьких ферм), їх кількості та технічних можливостей вони можуть бути утилізовані з використанням **біодеградації** або **біоконверсії** (компостування). Тверді відходи населених пунктів (побутові та промислові) і сільського господарства (рослинні та тваринні) утворюють целюлозовмісні субстрати, придатні для компостування.

У процесі примусової біодеструкції складних компонентів твердих целюлозовмісних відходів з погляду біотехнології проходить *твердофазна ферментація*.



Рисунок 8.1 – Компостування відходів агропромислового виробництва

Біоконверсія целюлозо-лігнінових матеріалів – довготривалий процес, дуже поширений в природі, де переважно відбувається повільне розкладання органічних матеріалів. У природних умовах *біодеградація целюлози* проходить через утворення ароматичних сполук, які утворюються при повільному розкладанні *танінів* і *лігніну*, переважно завдяки позаклітинним мікробним ферментам. Оскільки лігніни і таніни становлять значну частину ґрунтового органічного матеріалу, *біометаногенез* цих полімерів – важливий процес у вуглецевому циклі біосфери.

Можливості використання твердих відходів природного походження (біополімерів) із застосуванням екологічної біотехнології шляхом біоконверсії для збагачення ґрунту вивчають ще з 1976 р. Компостування твердих відходів є процесом очищення, що робить низькоактивні тверді відходи менш

шкідливими для навколишнього середовища, а також слугує способом отримання стабільного продукту біологічного окиснення. Гуміфіковані продукти швидко урівноважуються з природною екосистемою і не призводять до серйозних порушень у ній, як це буває в разі внесення неперероблених відходів.

Біохімізм процесу компостування агровідходів

Біокомпостування рослинних відходів – *твердофазний екзотермічний процес* біологічного і біохімічного розкладу високомолекулярних й олігомерних природних речовин з можливим впливом целюлолітичних ферментів мікроорганізмів. Одночасно відбувається синтез деяких низькомолекулярних речовин, зокрема ацетальдегіду, і оцтової кислоти, аж до утворення діоксиду вуглецю і води.

Компостування є процесом синтетичним і деструктивним одночасно. Органічні відходи промислового, сільськогосподарського або комунального походження є сумішшю фракцій цукрів, білків, жирів, геміцелюлози, целюлози, лігніну і неорганічних солей в широкому інтервалі концентрацій:

Склад *фракцій рослинних відходів* залежить від віку рослини, їх типу і середовища. Свіжа зелена сировина містить багато водорозчинних речовин, білків і солей, при дозріванні компосту солі повертаються в ґрунт, низькомолекулярні сполуки перетворюються на високомолекулярні, особливо на геміцелюлозу, целюлозу і лігнін. Склад *відходів тваринництва* залежить від виду тварини й від складу кормів.

Фактично всі мікроорганізми, наявні в компості, можуть засвоювати утворені при цьому фрагменти полімерів, але тільки незначна група вищих грибів може здійснювати гідроліз найстійкішого до дії ферментів лігніну і розкласти його.

Двохстадійна технологія біодеградації

При закладанні твердої біомаси на компостування передбачається *двохстадійний механізм біодеградації* компонентів відходів:

- на першій стадії – переважно анаеробна деградація;
- на другій стадії – переважно аеробна деградація.

Перші стадії компостування проходять дуже швидко, за декілька днів або тижнів, залежно від типу системи компостування.

Так, наприклад, у ході процесу компостування пшеничної соломи в присутності нітриту амонію за рахунок безперервної утилізації полімерів геміцелюлози і целюлози на 50 % біохімічні зміни відбуваються за 60 днів. Особливо швидке зменшення частки сухих речовин спостерігається у перші 5 днів, у середньому по 2,7 % за добу, тоді як за наступні 30 днів – в середньому 1,3 % за добу. Проте біодеградація целюлози сповільнюється у разі зменшення популяції грибів після того, як температура підвищується понад 55 °С. Знизити

температуру можна за допомогою примусової вентиляції впродовж процесу компостування.

Зміна температури під час компостування – важливий чинник розвитку мікрофлори та проходження біодеградації рослинних відходів. Оптимальна рекомендована температур – 55°C.

Процес компостування за температурним режимом розділяють на чотири стадії:

- 1) мезофільна – ($t = 20 - 40$ °C; $pH = 5 - 6$; $t = 1-2$ дні);
- 2) термофільна – ($t = 40 - 60$ °C; $pH = 8 - 9$; $t = 2-3$ дні);
- 3) охолодження – ($t = 40 - 20$ °C; $pH = 9 - 8$; $t = 1-3$ тижні);
- 4) дозрівання – ($t = 20$ °C; $pH = 8$; $t = 2-4$ місяці).

Характеристика стадій компостування

I стадія – мезофільна – на початку процесу відходи зберігаються при температурі середовища, pH в них слабкокислое (мікроорганізми, наявні у відходах, починають швидко розмножуватися, температура піднімається до 40°C, і середовище підкислюється за рахунок утворення органічних кислот).

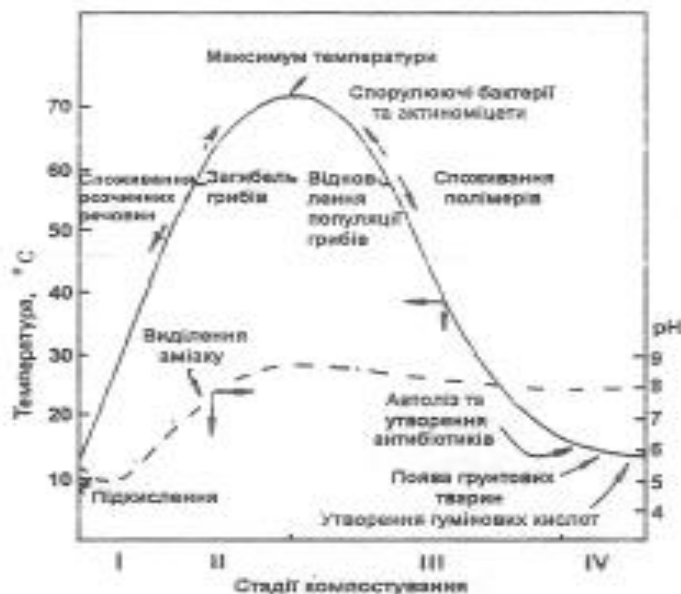


Рис. 9. Зміна температури та pH компостування в купі

II стадія – термофільна – якщо температура перевищує 40°C, починають гинути вихідні мезофіти і переважати термофіли, що піднімає температуру до 60°C, гриби починають втрачати свою активність. Після 60°C біохімічну реакцію продовжують спороутворювальні бактерії та актиноміцети, pH середовища стає лужним за рахунок виділення аміаку під час розкладу білків, що супроводжується швидким розкладом субстратів (цукрів, крохмалю, жирів, білків) та подальшим зниженням швидкості реакції після того, як залучаються стійкіші субстрати. Швидкість тепловиділення дорівнює швидкості тепловтрати, що відповідає досягненню температурного максимуму,

і купа компосту досягає стабільного стану. У деяких випадках під час компостування старих відходів спостерігається декілька температурних максимумів.

III стадія – охолодження – компост після температурного максимуму охолоджується. Легкозасвоювані сполуки вже розпалися, основна потреба в кисні задоволена, компостований матеріал перестає приваблювати мух та паразитів і втрачає поганий запах, оскільки легкодоступні азот і сірка зв'язані новими мікроорганізмами, рН поволі знижується, але залишається лужним. Термофільні гриби з холодніших зон знову захоплюють весь об'єм і разом з актиноміцетами споживають полісахариди, геміцелюлозу і целюлозу, руйнуючи їх до моносахаридів, які потім можуть утилізуватися мікроорганізмами. Швидкість тепловиділення стає дуже низькою, температура падає до температури навколишнього середовища.

IV стадія – дозрівання – завершення втрати маси і тепловиділення, що триває декілька місяців, супроводжуючись складними реакціями між залишками лігніну з відходів і білками відмерлих мікроорганізмів з утворенням гумінових кислот, але без розігрівання. Не відбуваються анаеробні процеси при зберіганні, не вилучається азот з ґрунту, доводячи кінцеве рН компосту до слабколужного.

Високу температуру часто вважають необхідною умовою успішного компостування, проте за дуже високої температури процес біодеградації пригнічується через інгібування росту мікроорганізмів, серед яких дуже мало видів, що зберігають активність при температурі понад 70°C. Порогом пригнічення біодеградації стає температура близько 60°C, яка сприяє знищенню термочутливих патогенних мікроорганізмів. При швидкому компостуванні не можна допускати високих температур протягом тривалого періоду. Тому необхідно підтримувати умови, за яких, з одного боку, пригнічується розвиток патогенної мікрофлори, а з іншого – розвиватимуться мікроорганізми, відповідальні за деградацію біополімерів.

Утилізація гною

Відходи промислового тваринництва і, особливо, птахівництва сильно забруднюють навколишнє середовище. У багатьох країнах діють загальнодержавні та регіональні програми щодо зменшення негативного тиску цих відходів на екологію.

Традиційний шлях утилізації гною – використання його для поліпшення родючості ґрунту. Наявність N, P, K, C дає збільшення гумусу (1 т гною = 40-50 кг гумусу). Щорічно в Прибалтиці (Латвія) вносять 10-20 т гною на 1 га. Однак, внесення гною вимагає витрат на суворе додержання санітарно-гігієнічних і екологічних вимог, а також необхідність підвищення рентабельності галузі.

Особливо гостро проблема утилізації гною постала у зв'язку із введенням до експлуатації крупних тваринницьких комплексів. Концентрація тварин на обмеженому просторі неминуче супроводжується накопиченням великої

кількості гною; на прилеглих до тваринницьких комплексів площах має місце позитивний баланс деяких важких металів.

Поява проблем з утилізації гною і необхідністю отримання все більшої кількості палива (газ, нафта, вугілля) призвело до об'єднання цих проблем у процесі одержання біогазу. Утилізація гною шляхом інтенсифікації процесу мінералізації органічних речовин у ґрунті або водоймищі, а також уведення гною до раціону сільськогосподарських тварин, як спосіб його утилізації, відходять на другий план.

8.2. Виробництво біогазу як спосіб утилізації агровідходів

Для одержання біогазу можна використовувати відходи рослинництва (солома ярих і озимих злакових культур, бурякове і картопляне бадилля, відходи переробки льону тощо).

Вихід біогазу, як відомо, залежить від якості сировини, що визначається хімічним складом останнього. Для збільшення кількості азоту до маси, яка утилізується, вносять відходи, що містять високі його концентрації – курячий послід або свинячий гній.

При утилізації біомаси за допомогою анаеробної ферментації утворюється:

- 1) метан (біогаз);
- 2) нерозкладені органічні речовини (шлам), розкладені органічні речовини, кількість сухої речовини в шламі знижується на 50 % до біомаси за рахунок бактерій, що входять до його складу, CH_4 і CO_2 ;
- 3) надосадова рідина (не має неприємного запаху), містить органічної речовини на 80 % менше вихідної кількості, її можна зливати до каналізації або використовувати для вирощування рослин.

Енергетична цінність 1 м³ біогазу, який складається на 50 % із метану, досягає 18 МДж, а при 70 % вмісту метану – 25 МДж. Для порівняння – енергетична цінність 1 м³ природного газу – 34 МДж.

Попередні розрахунки показують, що з 1 т рослинної біомаси, змішаної з відходами, можна отримати 350 куб. м газів (метан, водень) з енергоємністю 2.1×10^6 ккал, 430 л рідкого палива з енергоємністю 3.08×10^6 ккал і тверде паливо, еквівалентне 0.2×10^6 ккал енергії. Крім того, з 1 т такої сировини можна отримати 0,8–0,9 т незаражених добрив.

При утилізації гною в термофільних умовах ($t = 54-55^\circ\text{C}$) швидкість утворення біогазу в 2,5-3 рази вище, ніж при мезофільному режимі ($32-35^\circ\text{C}$). Проте, найчастіше перевагу надають мезофільному режиму, адже при цьому досягається економія енергії, необхідної для нагрівання поживного середовища. Крім того, мезофільна асоціація метаногенів є менш чутливою до складу поживного середовища. З іншого боку є дані, що при термофільному режимі частка метану знижується. Тривалість процесу ферментації біомаси, у тому числі й гною, при мезофільному режимі не менше 14 діб. У більшості випадків процес метаногенезу відбувається протягом 24-28 діб і більше. Максимальний вихід біогазу на стадії найбільш

інтенсивного метаногенезу значною мірою залежить від хімічного складу біомаси, який визначається видом тварин, а отже, й раціоном, який вони отримують. Так, з 1 кг сухої речовини біомаси гною одержують 0,4-0,6 м³ біогазу.

На біогазових установках, що працюють в умовах виробництва, з 1 кг сухої речовини гною великої рогатої худоби одержують 0,2-0,5 м³, а з такої ж кількості свинячого гною – 0,3-0,7 м³ біогазу (реактор працює в мезофільному режимі). З біомаси курячого посліду виходить більше біогазу, ніж з гною великої рогатої худоби або свиней. При проектуванні біогазової установки виходять з того, що від однієї корови масою 500 кг за добу отримують з гною 4,8 кг сухої органічної речовини, з якої при 30-добовій переробці в реакторі утворюється 1-2,4 м³ біогазу.

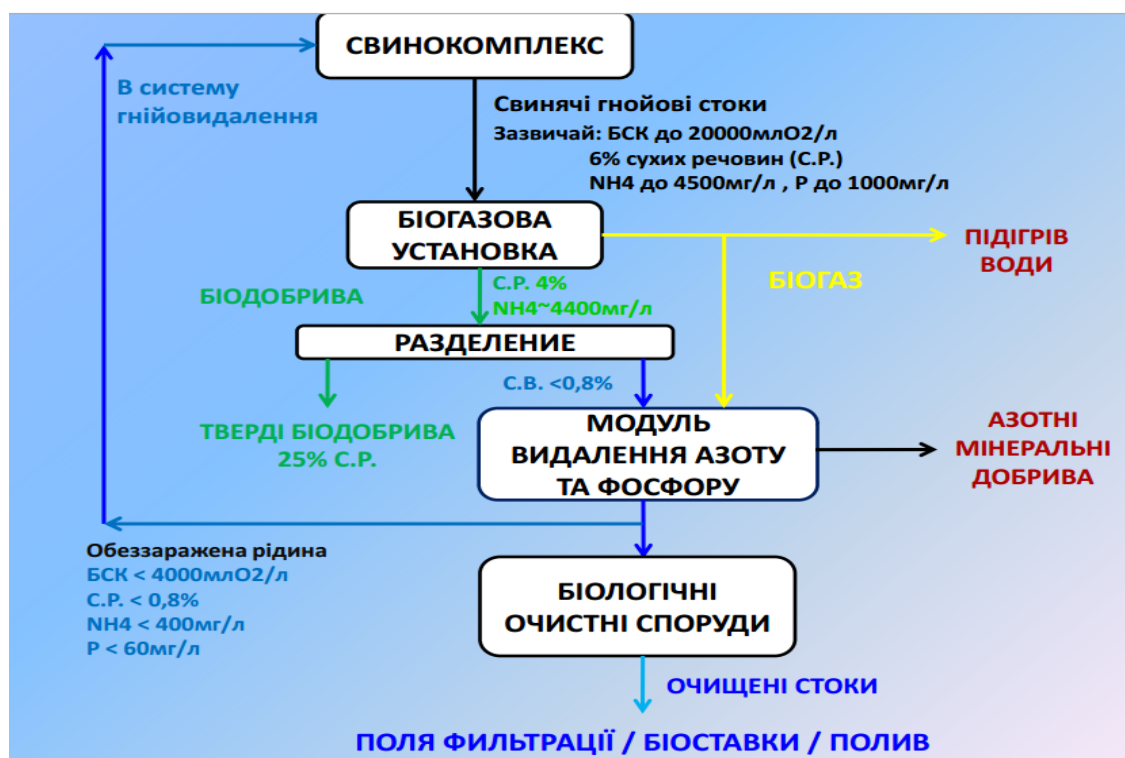


Рисунок 8.2 – Схема утилізації відходів свинокомплексу

Сьогодні в сільській місцевості, де особливо відчутний нинішній паливно-енергетичний дисбаланс, однаково необхідні всі види палива: газоподібне – для опалення, рідке – для функціонування транспорту, тверде – для отримання теплоносіїв.

Головне, що біогазова технологія переробки та знезараження відходів тваринництва себе окупає не тільки газом і виробленим екологічно чистим добривом. Екотехнології забезпечують екологічне благополуччя, адже інакше довелося б будувати гноєсховища, очисні споруди, витратити великі кошти й дуже багато енергії.

Біореактор об'ємом 50 м³ дає на добу 100 м³ біогазу, з яких на частку «товарного» газу припадає в середньому близько 70 м³ (решта йде на підгрів

реактора), що становить 25 тис. м³ на рік – кількість, еквівалентну 16,75 т рідкого палива.

Якщо капітальні вкладення в будівництво установки розподілити на 15-річний термін її експлуатації і врахувати експлуатаційні витрати та витрати на ремонт (1 % від вартості обладнання), то економія від заміни біогазом рідкого палива буде суттєвою.

При такому підрахунку не враховується запобігання забрудненню навколишнього середовища, а також збільшення врожайності культур у результаті застосування одержуваного високоякісного добрива.

8.3. Утилізація твердих побутових відходів

У галузі переробки і ліквідації відходів біотехнологічні методи найширше застосовуються для утилізації комунальних відходів і мулу із систем біологічної очистки стоків.

Традиційно тверді побутові відходи (ТПВ) складаються на міських сміттєзвалищах. Не зважаючи на зростаючий попит на вторинне використання сировини, ліквідація сміття на сміттєзвалищах суттєво дешевше інших способів їх переробки. Проте, коли з'ясувалося, що при анаеробній переробці відходів у значних кількостях утворюється біогаз, основні зусилля були спрямовані на відповідну організацію звалищ і отримання метану на місці їх переробки (табл. 8.1).

Дослідження хімічного складу відходів показали, що фракції, які піддаються біодеградації, складають біля 70 % від загальної кількості відходів. У розвинених країнах склад ТПВ стає більш однотипним, проте існує тенденція збільшення частки паперу і пластмас на тлі скорочення частки матеріалів органічного і рослинного походження.

З огляду на те, що на звалищах постійно відбувається нашаровування нового матеріалу, процес біодеструкції відходів супроводжується зміною градієнтів температури, рН, потоків рідини, ферментативної активності, а також формуванням складної асоціації мікроорганізмів. Процеси біодеградації залежать від спектру хімічних речовин матеріалу звалищ і доступності їх для мікроорганізмів, які розвиваються на поверхні часточок, особливо наявності градієнтів концентрацій донорів і акцепторів електронів і водню.

На *початковій стадії* біодеградації твердих відходів домінують аеробні процеси, у ході яких під впливом мікроорганізмів (бактерій, грибів, актиноміцетів) та безхребетних (кліщів, нематод) окиснюються компоненти, що деградують найшвидше.

Оцінюють ступінь деградації відходів за співвідношенням вмісту целюлози до лігніну, яке у неперероблених відходах становить 4,0; у відходах, що активно розкладаються – 0,9-1,2; у повністю стабілізованих – 0,2.

Підвищення температури сприяє прискоренню процесів деструкції органічної речовини, проте, при цьому знижується розчинність кисню, що сприяє зниженню тепловіддачі й накопиченню вуглекислоти. Це, у свою чергу, стимулює розвиток спочатку факультативних, а потім облигатних анаеробів.

Таблиця 8.1

Діючі системи збору та утилізації біогазу на полігонах ТПВ

Полігон	Кількість ТПВ, млн. тонн	Площа полігону, га	Період експлуатації полігону	Початок збору біогазу	Технологія утилізації
Алушта	1,0	3,2	1960	2008	ФУ* HOFGAS-Ready 500
Ялта	1,3	5,0	1973-2010	2008	ФУ HOFGAS-Ready 800
Львів	4,0	26,0	1957	2009	ФУ HOFGAS-Ready 2000
Маріуполь	2,5	14,0	1967-2009	2010	ФУ HOFGAS-Ready 800, ДВЗ 170 кВт
Кременчук	2,8	15,0	1965	н/д	ФУ Haase
Луганськ	2,0	11,6	1979-2010	2011	ФУ Biogas Ltd, UK, 600 m ³ /h
Запоріжжя	3,2	11,0	1952	2011	ФУ Haase
Вінниця	3,0	10,0	1980	2012	ФУ Haase
Київ	10,0	36,0	1986	2012	ДВР TEDOM 5x189 кВт

Примітка: * - факельна установка

У результаті процесів біодеградації матеріалу звалищ утворюються два типи продуктів:

1) *фільтраційні води*, що потрапляють у ґрунт, які містять мікроорганізми, хімічні сполуки (амонійний азот, леткі жирні кислоти, аліфатичні, ароматичні і ациклічні сполуки, терпени, мінеральні елементи, метали);

2) *гази* (метан, оксид вуглецю тощо).

Для запобігання фільтрації води застосовують малопроникні засипки, спеціальні загорожі навколо звалищ. Проте, найбільш ефективним способом вважається організація збору води і її керована анаеробна переробка за допомогою крапельних біофільтрів, аеротенків або аераційних ставків.

Найбільш успішним українським біогазовим проектом є проект на Київському полігоні № 5, реалізований компанією ЛНК. На полігоні працює лінійка з п'яти біогазових двигунів компанії TEDOM зі встановленою потужністю 177 кВт кожний. Так, наприклад, вже в 2012 році вироблено, поставлено в мережу та продано за економічно обґрунтованим тарифом,

визначеним НКРЕ, 3,26 ГВт/год електроенергії. Компанія нарощує потужність цього проекту – у липні-серпні 2013 року було заплановано введення в експлуатацію газопоршневої установки виробництва компанії GE Jenbacher потужністю 1 063 кВт.

Таблиця 8.2

Існуючі проекти БГУ в промисловості та муніципальному господарстві України

Підприємство	Рік запуску	Види сировини	Кількість вивини	Постачальник технології
Бортницька станція аерації	1965	Стічні води	25000 м ³ /год.	Україна
ВАТ «Рубіжанський картонно-тарний комбінат»	2011	Стічні води	250 м ³ /год.	Європа/Україна
Лужанський спиртовий завод	2009	Стічні води	250 м ³ /год.	Україна
Львівський полігон ТПВ	2008	ТПВ	8 млн.т	Україна/ Швейцарія
Маріупольський полігон ТПВ	2009	ТПВ	2,5 млн.т	Україна/ Швейцарія
Запорізький полігон ТПВ	2011	ТПВ	8 млн.т	Україна/ Німеччина
Луганський полігон ТПВ	2011	ТПВ	3 млн.т	Україна/ Великобританія
Київський полігон ТПВ №5	2012	ТПВ	10 млн.т	Україна/ Словенія

Біогаз, що утворюється при деградації матеріалу звалищ, є цінним енергоносієм, але може викликати негативні явища в навколишньому природному середовищі (сморід, підкислення ґрунтових вод, зниження урожайності сільськогосподарських культур). Обмежити витік газу можна за допомогою різних методів (траншеї, заповнені гравієм, системи екстракції газу, створення над територією звалищ укриття із плівок).

Питання для самоконтролю:

1. Поясніть схему двостадійної біодеградації агровідходів.
2. Назвіть основні стадії компостування і участь мікрофлори в процесах біодеструкції.
3. Які продукти утворюються при біодеградації твердих відходів на сміттєзвалищах?

Виконайте завдання:

1. Складіть схему двохстадійної біодеградації агровідходів.
2. Заповняйте таблицю «Характеристика стадій компостування»
3. Обґрунтуйте переваги екотехнологій порівняно з традиційними способами утилізації твердих відходів.
4. Заповніть таблицю «Характеристика стадій компостування»

Таблиця

Характеристика стадій компостування

Стадія компостування	Процеси, що відбуваються	Мікрофлора	Продукти, що утворились

Тема 9: Біотехнологія очистки газоподібних відходів і ґрунту

Мета: сформувати знання про традиційні й новітні біотехнології очистки газоподібних відходів і ґрунту, забруднених поллютантами.

План

1. Біотехнологія очистки газоподібних відходів.
2. Методи очистки ґрунту.

Основні терміни і поняття: біоплівка, біореактори, біоскрубери, іммобілізовані мікробні клітини, активний мул.

9.1. Біотехнологія очистки газоподібних відходів

Очистка газоподібних відходів є обов'язковим етапом для промислових виробництв, що виділяють токсичні й біологічно активні сполуки в атмосферу. Наприклад, підприємства з виробництва барвників, необхідно очищувати від органічних розчинників, підприємства хімчисток і знежирювальних процесів – від хлорвміщуючих вуглеводнів; овочевих складів – від етилену, що утворюється при зберіганні овочів.

У якості сорбентів для очистки таких газоподібних відходів використовують деревне вугілля або ґрунт, на поверхні яких утворюються плівка з аеробних бактерій, що активно руйнують дані сполуки. Найчастіше використовують синтетичні носії, подрібнену деревину або кору дерев, торф або ґрунт. Крізь шар такого носія, який попередньо зволожують, пропускають забруднене повітря. При цьому утворюється *біоплівка*, що являє собою складний комплекс мікроорганізмів.

Для очистки газоподібних відходів, що містять токсичні сполуки також використовують спеціальні установки, у яких гази пропускають крізь рідину в

промивних камерах. Там відбувається інтенсивний газо- і водообмін. Після чого промивні води додатково очищують шляхом мікробного окиснення.

Для біологічної очистки застосовують три типи установок: *біофільтри*, *біоскрубери* і *біореактори з омивним шаром*.

Таблиця 9.1

Класифікація установок біологічної очистки повітря

Тип установки	Робоче тіло	Водний режим	Основна стадія видалення домішок з повітря	Джерело мінеральних солей
Біофільтр	Фільтруючий шар – іммобілізовані мікробні клітини на природних носіях	Циркуляція води відсутня	1) десорбція матеріалом фільтруючого шару 2) деструкція мікробними клітинами.	Матеріал фільтруючого шару
Біоскрubber	Вода, активний мул	Циркуляція води	1) абсорбція в абсорбері водою; 2) деструкція в аеротенку	Мінеральні речовини вносяться у воду
Біореактор з омивним шаром	Іммобілізовані на штучних носіях мікробні клітини	Циркуляція води	1) дифузія через водну плівку до мікроорганізмів 2) деструкція в біошарі	Мінеральні речовини вносяться у воду

1. Біофільтри

Принципова схема для біологічної очистки була запропонована в 1941 р. Прюссом. Перший у Європі біофільтр було побудовано в Німеччині в 1980 році, а в 1984 році тільки у Німеччині було 240 установок.

Основним елементом біофільтра для очистки повітря є **фільтрувальний шар**, який сорбує токсичні сполуки з повітря. Потім ці речовини в розчиненому стані дифундують до мікробних клітин, де підлягають деструкції. У якості носія для фільтрувального шару використовують компост, торф тощо. Ці матеріали містять у своєму складі різні мінеральні солі й сполуки, необхідні для розвитку мікроорганізмів. Тому до біофільтрів не вносять будь-які домішки.

Повітря, що очищується, подається вентилятором до системи, проходить крізь фільтрувальний шар (знизу вгору, або навпаки). При цьому повітря повинне проходити крізь усю масу фільтрувального шару. Необхідно: однорідність шару, вологість 40–60%. Зволоження матеріалу забезпечується розбризкуванням води на поверхні фільтрувального шару. У матеріалі не

повинно бути різких градієнтів температури і рН середовища, для цього повітря, що подається на біофільтр, підігрівають.

2. Біоскрubber

Принцип роботи біоскрубера принципово відрізняється тим, що процес очищення повітря реалізується *у дві стадії у двох різних установках*.

На *першому етапі* в адсорбері токсичні речовини і кисень розчиняються у воді. У результаті повітря очищується, а забруднена вода відводиться для подальшого очищення. Типи адсорберів: *барботажні, насадочні, розпилювальні, форсункові*. Метою конструктивних удосконалень адсорберів є збільшення площі поверхні розподілу фаз, що обумовлює ефективність адсорбції.

На *другій стадії* забруднена вода надходить до аеротенку, де вона піддається регенерації. У ході очистки складні органічні сполуки окиснюються мікроорганізмами активного мулу до кінцевих продуктів з утворенням біомаси.

3. Біореактор з омивним шаром

Робочим тілом цієї системи є іммобілізовані мікроорганізми. Біошар біореактора являє собою гранули з іммобілізованими мікробними клітинами, що омивається водою, яка містить мінеральні сполуки. Забруднене повітря проходить крізь біошар, при цьому сполуки, що підлягають деструкції, дифундують у біоплівку, яка вкриває частинки біокатализатора, і потім окиснюються мікроорганізмами. Швидкість деструкції лімітується швидкістю дифузії речовин із газової фази в рідинну (залежить від природи речовини, концентрації), а також швидкістю реакцій, що протікають у мікробних клітинах. Періодично (один раз на декілька місяців) біошар очищують від надлишку біомаси і наповнюють свіжими гранулами.

Біоскрубери порівняно з біофільтрами займають меншу площу, адже являють собою башти декілька метрів заввишки. Проте експлуатаційні витрати більші, адже процес біоочистки води потребує суттєвих витрат. Застосування біоскруберів є ефективним при наявності в повітрі добре розчинних токсичних речовин. Ефективність очищення повітря в біоскруберах вища порівняно з біофільтрами.

Найбільш ефективними для очистки повітря є біореактори з омивним шаром. Такі малогабаритні установки досить ефективні для очистки повітря тваринницьких комплексів. Ступінь очистки в реакторі з іммобілізованими на активованому вугіллі мікроорганізмами від ацетону, бутанолу, етилацетату становить 90 %.

Відомі інші способи комплексної очистки повітря, наприклад, на основі ростучої суспензії мікроорганізмів. Пропускання повітря, що насичене сірководнем, сірчанам ангідридом парами сірки, крізь інтенсивну культуру мікроводорості *Chlorella*, яка має велику поверхню контакту суспензії з повітрям (очистка 100 %).

Спосіб комплексної очистки стоків і забрудненого повітря від аліфатичних кислот, спиртів, альдегідів, вуглеводнів у аеротенках з активним мулом (для фармацевтичних виробництв).

Для детоксикації цианіду в промислових викидах запропоновані біологічні методи, що включають використання різноманітних реагентів, від активного мулу до специфічних ферментів, що руйнують цианіди.

9.2. Методи очистки ґрунту

Ґрунт є важливим компонентом біосфери, що піддається техногенному забрудненню. Біля 50 % забруднень на Землі пов'язані з нафтою. Серед мікроорганізмів відомі активні деструктори нафтопродуктів, що належать до родів *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*.

Зазвичай забруднення ґрунту починається з поверхні, далі поллютанти проходять крізь горизонти ґрунту до шару, що межує із водоносним горизонтом. Залежно від щільності забруднюючого матеріалу можливі різні варіанти процесу. Деякі компоненти можуть накопичуватись на поверхні водного середовища й мігрувати з ним, інші здатні розчинятись у ґрунтових водах. Такі компоненти, як смоли, здатні потрапляти до нижнього шару води та переноситись досить повільно. Тому існують різні механізми очистки.

Розроблено 5 основних **способів очистки забрудненого ґрунту**.

1) Ґрунт залишають на місці, відкачують ґрунтові води, які очищують, а потім їх знову повертають у ґрунт. При цьому в ґрунті можуть залишатись поллютанти з низькою розчинністю.

2) Ґрунт обробляють на місці шляхом внесення окиснювачів (NO_3 , O_2), субстратів або емульсифікаторів для посилення переносу ліпофільних забруднень або їх доступність для біологічних об'єктів. Такий спосіб обробки є маловитратним, але триває декілька років.

3) Ґрунт видаляють і складають у купи або вали, крізь які встановлюють труби для аерації з метою інтенсифікації аеробних процесів розкладання. Така обробка теж триває декілька років і залежить від типу забруднення.

4) Ґрунт відділяють і промивають, інколи з додаванням поверхнево активних речовин. Екстраговані забруднення послідовно розкладаються шляхом біологічної очистки промивних вод.

5) Ґрунт видаляють повністю і прожарюють у спеціальних печах. Це найбільш дорогий спосіб очистки, який призводить до повної стерилізації ґрунту.

Вибір способу очистки ґрунту залежить від типу забруднення, площі й глибини його поширення. Наприклад, на ділянках, що забруднені такими дуже окисненими сполуками, як пентахлорфенол (застосовується при консервації деревини), нітроароматичні сполуки (використовують при отриманні вибухових речовин), алкани і алкени (хлороформ, тетрачлоретилен – використовують при хімічній очистці одягу, знежирення в промисловості) необхідно вносити донори електронів для посилення процесів відновлення. Такими донорами є метанол, етанол, меляса. У разі забруднення вуглеводнями такої необхідності нема.

Найбільш важко піддаються очищенню ґрунти, забруднені ароматичними вуглеводнями й рідкими вуглеводнями, оскільки вони практично нерозчинні у

воді. Розчинність у воді є лімітуючим фактором розщеплення. Здатність певних сполук активно розкладатися мікроорганізмами також залежить від комплексоутворення. Так, комплексні сполуки розкладаються повільніше ніж малокомпонентні субстрати. Комплексні сполуки можуть частково перетворюватись у активовані (часто гідроксильовані) похідні, які ковалентно зв'язуються з органічною речовиною ґрунту, наприклад, із гуміновими речовинами ґрунту, і стають недоступними для мікроорганізмів.

Питання для самоконтролю:

1. Назвіть методи очистки забрудненого повітря.
2. Які установки застосовують для очистки газоподібних відходів, що містять токсичні сполуки?
3. Охарактеризуйте принцип дії установок для очистки повітря.
4. Чим відрізняються за принципом дії біофільтри і біоскрубер?
5. Який тип установок є найбільш ефективними для очистки повітря?
6. Назвіть способи очистки забрудненого ґрунту.
7. Який спосіб очистки ґрунту є найбільш ефективним?

Виберіть правильну відповідь:

1. Які типи установок застосовують для очистки газоподібних відходів, що містять токсичні сполуки?

- А) біофільтри;
- Б) біоскрубери;
- В) біореактори з омивним шаром;
- Г) метантенки.

2. Основним елементом (робочим тілом) біофільтра для очистки повітря є:

- А) фільтрувальний шар, який сорбує токсичні сполуки з повітря;
- Б) вода й активний мул;
- В) іммобілізовані на штучних носіях мікробні клітини.

3. Тип установки для біологічної очистки повітря, робочим тілом якої є іммобілізовані мікроорганізми на штучних носіях – це:

- А) метантенки.
- Б) біоскрубери;
- В) біореактори з омивним шаром;
- Г) біофільтри.

4. Тип установки для біологічної очистки повітря, робочим тілом якої є іммобілізовані мікроорганізми на природних носіях – це:

- А) метантенки.
- Б) біоскрубери;
- В) біореактори з омивним шаром;
- Г) біофільтри.

5. Назвіть мікроорганізми-деструктори нафтопродуктів:

- А) р. *Bacillus*;

- Б) р. *Rhodococcus*, *Micrococcus*;
 В) р. *Acinetobacter*, *Pseudomonas*.

6. Які ґрунти складніше піддаються очищенню?

- А) забруднені вуглеводнями;
 Б) забруднені ароматичними вуглеводнями;
 В) забруднені рідкими вуглеводнями;
 Г) правильні відповіді б), в).

7. При якому типі забруднення ґрунту необхідно вносити донори електронів (метанол, етанол, мелясу)?

- А) рідкими вуглеводнями;
 Б) ароматичними вуглеводнями;
 В) вуглеводнями.

8. При якому типі забруднення ґрунту не потрібно вносити донори електронів (метанол, етанол, мелясу)?

- А) хлороформом;
 Б) нітроароматичними сполуками;
 В) вуглеводнями.

9. Принцип роботи біоскрубера від інших установок відрізняється тим, що...

- А) робочим тілом є мікроорганізми, іммобілізовані на природних носіях;
 Б) робочим тілом є мікроорганізми, іммобілізовані на штучних носіях;
 В) очищення повітря реалізується у двох різних установках (у адсорбері й аеротенку);
 Г) циркуляція води відсутня.

10. Чим відрізняється принцип роботи біофільтра від інших установок?

- А) робочим тілом є мікроорганізми, іммобілізовані на природних носіях;
 Б) робочим тілом є мікроорганізми, іммобілізовані на штучних носіях;
 В) очищення повітря реалізується у двох різних установках (у адсорбері й аеротенку);
 Г) циркуляція води відсутня.

Виконайте завдання:

1. Складіть технологічну схему очистки газоподібних відходів.
2. Заповніть таблицю «Біотехнологія очистки забрудненого ґрунту».

Таблиця

Біотехнологія очистки забрудненого ґрунту

Спосіб очистки ґрунту	Біотехнологія очистки
1.	
2. ...	

Тема 10. Біотехнологічні альтернативи у сільському господарстві

Мета заняття: сформувати знання про біотехнологічні основи виробництва бактерійних добрив, бактеріальних, грибних і вірусних препаратів проти комах і гризунів, сучасних біотехнологій захисту рослин.

План

1. Біотехнологія виробництва бактерійних добрив.
2. Виробництво біоінсектицидів і препаратів проти гризунів
3. Виробництво мікробних засобів захисту рослин.

Основні терміни і поняття: біологічна азотфіксація, бактеріальні препарати, бактерійні добрива, біоінсектициди, біогербіциди, фунгіциди, регулятори росту рослин, засоби захисту рослин

10.1 Біотехнологія виробництва бактерійних добрив

Використання мікроорганізмів у якості *біопестицидів* – перспективний напрям сучасної біотехнології, який має суттєві досягнення. У теперішній час бактерії, гриби, віруси знаходять все більш широке використання в якості промислових біопестицидів. Біотехнологія виробництва цих препаратів досить різноманітна, як різноманітними є природа і фізіологічні особливості мікроорганізмів-продуцентів. Проте існує ряд універсальних вимог, що висуваються до біопестицидів:

- селективність і висока ефективність дії (висока вірулентність для комах);
- безпечність для людини і корисних представників фауни і флори;
- тривалість зберігання і зручність використання (порошок, рідини тощо);
- гарне змочування і прилипання (мати адгезивні властивості);
- низька собівартість виробництва і висока якість.

У різних країнах виробляють понад 100 видів біопрепаратів, що знайшли застосування в рослинництві для захисту рослин від гризунів і комах, зокрема ентомопатогенні препарати (ендобактерин, інсектин, токсобактин, боверин, вирин), а також гербіциди, фунгіциди, бактерійні добрива (нітрагин, азотобактерин, форфобактерин), що належать до трьох груп: це бактеріальні, грибні та вірусні препарати.

Використання біологічних засобів захисту рослин, стимуляторів росту рослин і тварин, мікробних добрив дозволяє знизити дози хімічних засобів захисту і мінеральних добрив, що призводить до підвищення якості та

безпеки сільськогосподарської продукції і створенню екологічно чистих технологій.

Біодобрива

Мікроорганізми відіграють значну роль у підвищенні родючості ґрунту, адже в процесі росту і розвитку мікрофлора ґрунту покращує його структуру, збагачує поживними речовинами, сприяє більш повному використанню добрив.

Інтенсивне рослинництво збіднює запаси азоту в ґрунті, адже значна частина його виноситься з ґрунту разом з врожаєм. Здавна для відновлення і покращення ґрунту існувала практика використання бобових рослин, здатних у симбіозі з азотфіксувальними мікроорганізмами поповнювати запаси азоту в результаті *діазотрофності* (утилізація атмосферного азоту).

Відомі три способи фіксації молекулярного азоту:

1. Спонтанна фіксація в атмосфері при електричних розрядах.
2. Промисловий синтез аміаку з азоту (процес Габера-Боша).
3. Біологічна фіксація азоту за участю бактерій.

Загальна кількість фіксованого азоту становить $2,4 \times 10^8$ т на рік. З них 2/3 – результат біологічної фіксації, 1/4 – промислової фіксації, решта – спонтанної.

Уперше бульбочкові бактерії на коренях бобових рослин описали Лахман (1858 р.) і Воронін (1866 р.), а чиста культура азотфіксаторів була отримана Бейеринком у 1888 році. Виноградський у 1893 р. вперше виділив і описав анаеробну спороносну бактерію, що фіксувала молекулярний азот, і назвав її на честь Луї Пастера *Clostridium pasteurianum*. У 1901 році Беєринк відкрив вільноживучу азотфіксувальну бактерію *Azotobacter*. Висока продуктивність азотфіксації *Azotobacter* стала використовуватись для інтродукції цих бактерій у ґрунті з метою відновлення ресурсів азоту.

Практичне використання також знайшли симбіотичні бактерії роду *Rhizobium*, що розвиваються в бульбочках бобових рослин. Зараз активно розробляються технології внесення цих мікроорганізмів у ґрунт і для інокуляції насіння.

Найпростіший спосіб інокуляції, який було розроблено наприкінці ХІХ ст. і застосовується дотепер, заснований на використанні ґрунту після вирощування бобових культур. Проте цей метод має суттєвий недолік – необхідність перемішувати великі об'єми ґрунту (100-1000 кг/га), а також можливість поширення захворювань. Більш ефективним виявилось використання для інокуляції насіння спеціальних препаратів азотфіксувальних бактерій.

Для обробки насіння і ґрунту при посіві використовують інокулят, який містить життєздатні клітини бактерій. Виготовляють такі *види інокуляту*:

- 1) пляшкову або агарову культуру на скошеному щільному середовищі; культуру на основі торфу;
- 2) рідку культуру;

- 3) ліофілізовану культуру;
- 4) заморожені концентрати.

Препаратами обробляють насіння або вносять у ґрунті при посіві. У 1 г торф'яного інокуляту має бути близько 10^8 життєздатних клітин. Перед обробкою торф'яний препарат розводять водою і обробляють насіння з розрахунку 5 г інокуляту на 1 кг насіння.

Найчастіше виготовляють препарати на основі торфу, оскільки торф забезпечує добрий захист бактерій при пакуванні та збереженні їхніх властивостей на насінні. Крім торфу, як носії використовують пил бурого вугілля, бентоніт. Як адгезини до препаратів додають цукри.

До носіїв, що використовуються для приготування азотфіксувальних бактерій, висувають такі вимоги:

- вони мають бути нетоксичними для бактерій;
- мати гарні адсорбуючі та адгезивні властивості;
- містити достатню кількість органічних речовин;
- добре піддаватися висушуванню і розпилюванню;
- мати низьку собівартість.

Бульбочкові бактерії роду *Rhizobium*, розвиваючись у кореневій системі бобових рослин, у симбіозі з ними фіксують атмосферний азот, забезпечують азотне живлення рослин. Згідно сучасних уявлень азотфіксація є відновлювальним процесом перетворення газоподібного азоту в аміак, який в подальшому асимілюється рослинами з утворенням амінокислот. Азотфіксувальні бактерії мають специфічний фермент *нітрогеназу*, у активному центрі якої відбувається активування інертної молекули N_2 і відновлення до NH_3 .

Бульбочкові бактерії відрізняються вибірковою здатністю щодо рослини-хазяїна. Процес азотфіксації відбувається лише в бульбочках на коренях бобових рослин, що утворюються в результаті проникнення бактерій через кореневі волоски до кореня. Взаємозв'язок бактерій з рослинами залежить від комплексу умов: фізіологічного стану і умов росту рослин, фізіологічного стану і вірулентності бактерій; від температури і вологості ґрунту, наявності біогенних елементів, необхідних для розвитку бактерій і рослин.

Перша комерційна різновидність культури для інокуляції насіння (товарна назва «Nitragin») була запатентована у Великій Британії Ноббе і Хилтнером у 1896 р. Для різних бобових випускалися 17 варіантів культури. У 20-ті роки минулого століття випускалося багато різновидів інокулятив, серед яких були чисті культури, суміш бактерій з піском або торфом, а також культури, вирощені на щільному агарі або рідкому середовищі.

На основі симбіотичних азотфіксувальних бактерій роду *Rhizobium* виготовляють сухий препарат **ризобін** і **торф'яний ризобін**, а також **нітрагін**.

Нітрагін – препарат, що містить бактерії, які здатні перебувати в симбіозі з бобовими рослинами. Виготовляють нітрагін двох видів: сухий і ґрунтовий.

Сухий нітрагін – порошок бульбочкових бактерій з наповнювачем (бентоніт і торф). Вологість препарату – 5-7%, титр – 9 млрд. клітин/г.

Грунтовий нітрагін – це культура бактерій у стерильному ґрунті. В 1 г. препарату міститься не менше 300 млн. клітин бактерій.

Технологічна схема отримання нітрагіну:

1. Вирощування посівного матеріалу на агаризованих середовищах.
2. Вирощування в колбах.
3. Підготовка інокуляторів у стерильних середовищах.
4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі впродовж 18-20 годин за температури +30°C.
5. Підготовка ферментера і середовища.
6. Вирощування у ферментері при гарній аерації впродовж 48-72 годин (+30°C, рН 6,5-7,2).
7. Обробка захисними засобами (20 % меляси і 1 % тіосечовини).
8. Змішування з наповнювачем (торф, бетоніт).
9. Висушування, фасування і пакування.

На основі вільноживучих азотфіксувальних бактерій *Azotobacter chroococcum* виготовляють бактерійний препарат **азотобактерин**. Для його виробництва *A. chroococcum* культивують на середовищі з сахарозою або мелясою при активному аеруванні. Використовують також моно-, ди-, трисахариди, органічні кислоти і спирти, а також вносять P, S, Ca, Mg, Mo, Fe, солі амонію. Оскільки клітини азотобактеру є маложиттєздатними, засів ферментера здійснюють великим об'ємом інокуляту (10 %).

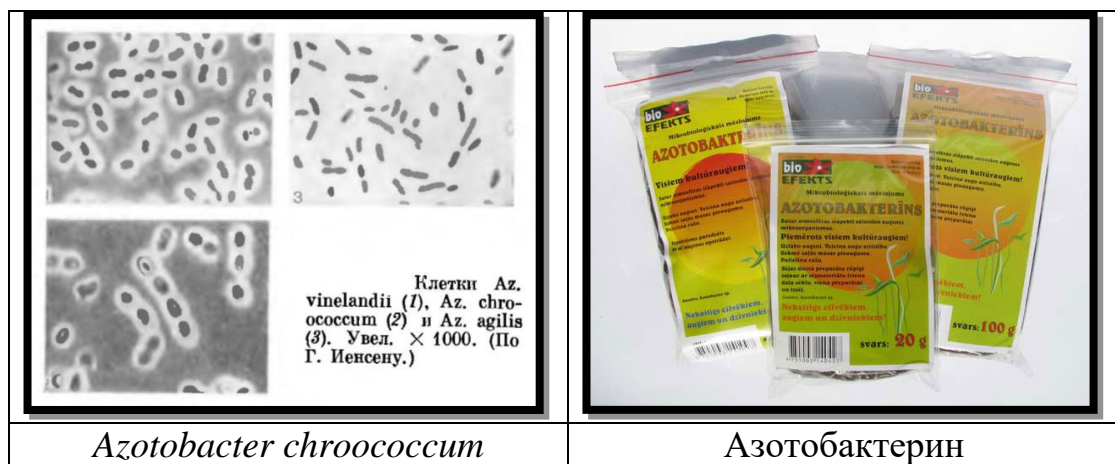


Рисунок 10.1 – Чиста культура *Azotobacter chroococcum* і готовий препарат азотобактерин

Препарат виготовляють у двох формах: сухий і ґрунтовий (торф'яний) азотобактерин. Сухий азотобактерин використовують для обробки овочевих культур.

Пакети з торфом стерилізують радіаційним способом. Культуру азотобактера вирощують методом глибинного культивування і додають в пакет із стерильним торфом із таким розрахунком, щоб 1 г препарату містив 40-50 млн. життєздатних клітин. Мішки поміщають до термостату й вирощують у них

культуру азотобактера при 25-27°C протягом 4-6 діб до вмісту не менше 180-200 млн. клітин азотобактера в 1 г препарату. Потім мішки герметично запаюють і зберігають в холодильнику при 7-12°C. Отримані препарати зберігають свою активність протягом 3-4 місяців.

Перспективними є препарати на основі бактерій *Azospirillum lipoferum*, що живуть на коренях тропічних трав, які виділяють для бактерій аспартат, лактат, піруват, сукцинат.

Крім бактерійних препаратів, що сприяють азотному живленню рослин, виготовляють також препарати для забезпечення рослин *доступними формами фосфору* на основі бактерій *Vacillus megaterium*, клітини яких перетворюють складні фосфаторганічні сполуки і мінеральні фосфати в доступну для рослин форму

Фосфобактерин – це препарат у вигляді порошку, який містить в 1 г не менше 8-10 млрд. життєздатних спор культури *Vacillus megaterium*.

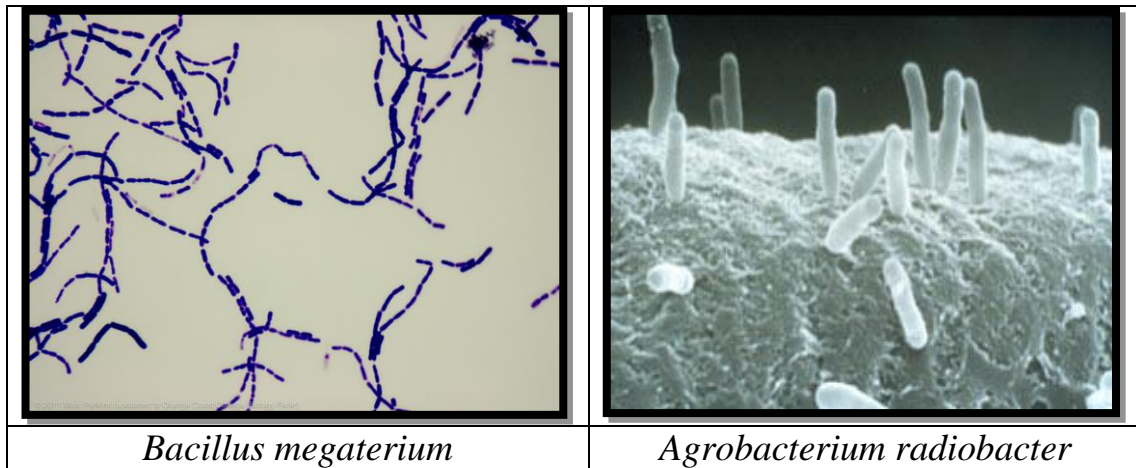


Рисунок 10.2 – Чисті культури *Bacillus megaterium* і *Agrobacterium radiobacter*

Технологічна схема отримання фосфобактерину подібна, як для виготовлення препаратів нітрагіну. Культуру культивують до стадії спороутворення глибинним способом у стерильних умовах на середовищі з мелясою, кукурудзяним екстрактом, амоній сульфатом, крейдою впродовж 30-48 годин за температури 28-30°C і рН 6,5-7,5. Для виділення клітин використовують центрифугування. Отриману біомасу висушують у розпилювальній сушарці за температури 65-75°C до вологості 2-3 %, змішують з каоліном, фасують по 50-500 кг у водонепроникні герметичні мішки. Термін зберігання при кімнатній температурі становить 1 рік. Культура повинна бути стійкою до фагів. У 1 г препараті має бути 8 млрд. життєздатних клітин.

Фосфобактерин – це препарат стимулювальної дії, він не замінює мінеральних фосфорних добрив. Його застосовують на чорноземних ґрунтах.

Різоагрін – біопрепарат, що стимулює ріст на основі штаму *Agrobacterium radiobacter*, рекомендується для передпосівної обробки насіння зернових. Володіє потужною стимулюючою дією на рослини за рахунок

посилення мінерального живлення. В першу чергу відбувається посилення фосфорного харчування за рахунок мобілізації орґанофосфатів ґрунту. Також мікроорґанізми, що входять до складу біопрепарату володіють високою конкурентоспроможністю до фітопатогенних грибів, що підвищує стійкість рослин до хвороб.

10.2. Виробництво біоінсектицидів і препаратів проти гризунів

Біоінсектициди або ентомопатогенні препарати містять спори або вегетативні клітини мікроорґанізмів і продукти їх життєдіяльності, які патогенні для комах та кліщів. Промислове виробництво біоінсектицидів почалось порівняно недавно. Відомо понад 90 видів бактерій, що інфікують комах, проте більшість промислових штамів належить до роду *Bacillus*, основна маса препаратів (понад 90%) виготовлена на базі *Bacillus thuringiensis* (**Bt**). Випускають препарати проти 160 видів комах. Такі препарати не виявляють негативного впливу на людину і тварин.

Мікроорґанізми-патогени виділяють з організму загиблих під час епідемії комах. Найбільш вживаними для виготовлення препаратів є бактерії роду *Bacillus* (*B. thuringiensis*, *B. popilliae*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus*). Вони патогенні для лускокрилих комах.

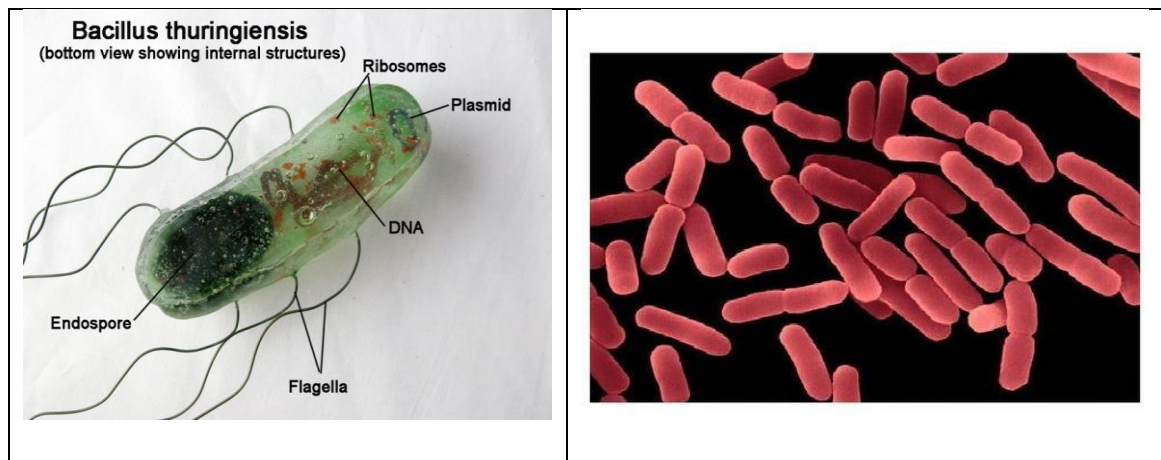


Рисунок 10.3 – Чиста культура *Bacillus thuringiensis*

Вперше ці бактерії були виділені **Л. Пастером** з гусені тутового шовкопряда, які він назвав *Bacillus bombycis* – «бактерії з незвичайними ядрами» – які спричиняли параліч у гусені. Пізніше з'ясувалося, що то були не ядра, а кристали ендотоксину, які назвали параспоральними тілами. У 1911 році **Е. Берлінер** детально описав цю бактерію і назвав її *Bacillus thuringiensis*.

Відомо понад 20 серотипів *B. thuringiensis*, що відрізняються біохімічними і серологічними властивостями й ентомоцидністю. Ця бактерія утворює спори, проростання яких у тілі комахі призводить до його розривання. Бактерії патогенні для 130 видів комах. Токсичними є продукти цих бактерій: *термостабільний екзотоксин*, *термолабільний ендотоксин*, *протоксин* і

специфічні ферменти, які в лужному середовищі шлунку гусені гідролізуються протеїназами комах і спричинюють параліч шлунку або тіла комах.

На основі бактерій *Bacillus thuringiensis* (**Bt**), здатних утворювати спори, кристали і токсичні речовини в процесі росту, випускають у різних країнах препарати проти комах (понад 20), що мають різну назву: ентобактерин, інсектин тощо.

Технологія отримання біопестицидів на основі ентомопатогенних бактерій являє собою типовий приклад періодичної гомогенної аеробної глибинної культури, яка культивується в суворо стерильних умовах, що контролюються. Основу поживного середовища складають дріжджополісахаридна суміш і піногасник (кашалотовий жир). Тривалість ферментації 28-30⁰С у режимі перемішування і аерації впродовж 35-40 годин до накопичення в культуральній рідині 5-10% спор і кристалів від загальної кількості (при титрі культури не менше 1 млрд. спор в 1 мл). Далі спори і кристали відділяють в процесі сепарування і зневоднення. Товарна форма препарату – сухий порошок, а також стабілізована паста. На базі пасти в процесі висушування в розпилювальній сушарці отримують сухий продукт (вологість 10 %, титр 100-150 млрд. спор/г). Препарат стабілізується каоліном. Готовий продукт вістить 30 млрд. спор/г.

Ентобактерин, лепідоцид (аналог – дипел) – містять спори, ендотоксин і наповнювачі. Ефективний проти лускокрилих комах: яблуневої і плодової молі, шовкопрядів, капустяної молі, капустяного білана тощо. Застосовується для захисту плодкових дерев.

Бітоксисацилін – містить спори, ендотоксин, термостабільний екзотоксин. Препарат застосовують для захисту картоплі, томатів, баклажанів від колорадського жука; льону – від совок, овочевих культур – від совок, біланів, молі; плодкових і лісових рослин – від комплексу листогризучих лускокрилих шкідників.

Дендробацилін – містить спори й ендотоксин. Застосовується проти сибірського шовкопряда, а також шкідників овочевих і плодкових культур.

Бактокуліцид – містить ендотоксин, що вибірково вбиває лише личинок комарів.

Окрім *Bacillus thuringiensis* використовують й інші види бактерій, серед яких: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas septica*, *Vibrio leonardia*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis*, *Diplococcus spp.*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus sphaericus* та *Bacillus moritai*.

На основі бактерій *Bacillus subtilis* створено препарат **фітоспорин** проти бактерійних і грибкових фітопатогенів.

Грибні препарати

Перспективними для виготовлення ентомопатогенних препаратів вважають гриби, які мають ряд переваг: вони уражують велике коло комах; мають різноманітні шляхи передачі інфекції, добре зберігаються в навколишньому середовищі у вигляді спор, склероціїв, спорангіїв; здатні

продукувати широкий спектр біологічно активних речовин – токсинів, які викликають загибель комах. Гриби можуть інфікувати не через кишковий тракт, а через кутикулу, що нехарактерне для інших мікроорганізмів.

Грибні ентомопатогенні препарати спричиняють загибель комах внаслідок утворення токсинів (боверин), розвитку міцелію по всьому тілі комахи або активного спорношення. Зараження може відбуватись на різних стадіях розвитку (у фазі лялечки, імаго).

Для виготовлення препаратів використовують гриб *Beauveria bassiana*, який уражує понад 70 видів комах, зокрема яблуневу плодожерку, колорадського жука, совку озиму тощо. Захворювання, що викликають боверії, називають кам'яниця (так виглядає личинка, уражена грибом).

Препарати **боверин** і **біотрол** готують на основі конідій даного гриба. Отримання **боверина** можливе як екстенсивним поверхневим, так і більш економічним глибинним способом ферментації. Проте глибинне культивування є досить складним технологічним завданням.

Глибинне культивування. Культивування гриба реалізується в суворо стерильних умовах при 25-28⁰С впродовж 3-4 діб. Поживне середовище містить дріжджі, крохмаль, NaCl, CaCl₂. Велике значення має концентрація азоту, адже його дефіцит уповільнює швидкість росту, проте надлишок – стимулює утворення гонідій (гіфальні тільця), а не конідій (спор). Оптимальна концентрація амінного азоту становить 10-15 мг%. Титр конідіеспор в культурі – 0,3-1,3 млрд./мл. Культуральну рідину сепарують з утворенням пасти з вологістю 70-80% і титром спор 8 млрд./г. Пасту висушують розпилюванням у сушарці до вологості 10 % і титру 8x10⁹ клітин/г. До готового препарату додають речовину-прилипач і стабілізують каоліном.

Поверхнєве культивування гриба потребує значних виробничих площ і більш трудомістке. Спосіб реалізується в різних варіантах:

1) на рідкому середовищі без дотримання стерильності, аерації та перемішування; утворення спор спостерігається через 7-10 діб, а на 18-25 добу спорносну плівку, що утворилася, знімають.

2) на твердому середовищі в умовах асептики, з використанням сусл-агара, картоплі, зерна пшениці або кукурудзи. Утворення конідіеспор завершується на 12-15 добу.

Отриманий матеріал висушують, подрібнюють і змішують з тальком або торфом. Готова форма препарату – сухий дрібнодисперсний порошок конідіеспор, змішаний з каоліном (титр – 1,5 млрд. конідій/г). Препарат є ефективним проти листогризух садових шкідників, шкідників лісу, яблуневої плодожерки, личинок колорадського жука. Застосовують боверин шляхом обприскування рослин з розрахунку 1-2 кг/га.

Відомі сотні видів ентомопатогенних грибів, але найбільш перспективними вважаються дві групи – мускарідні гриби з родини *Euascormycetes* і ентомотрофні з родини *Entomophthoraceae*.

Основну увагу привертають наступні грибні патогени: збудник білої мускариди (рід *Beauveria*), збудник зеленої мускариди (рід *Metarrhizium*).

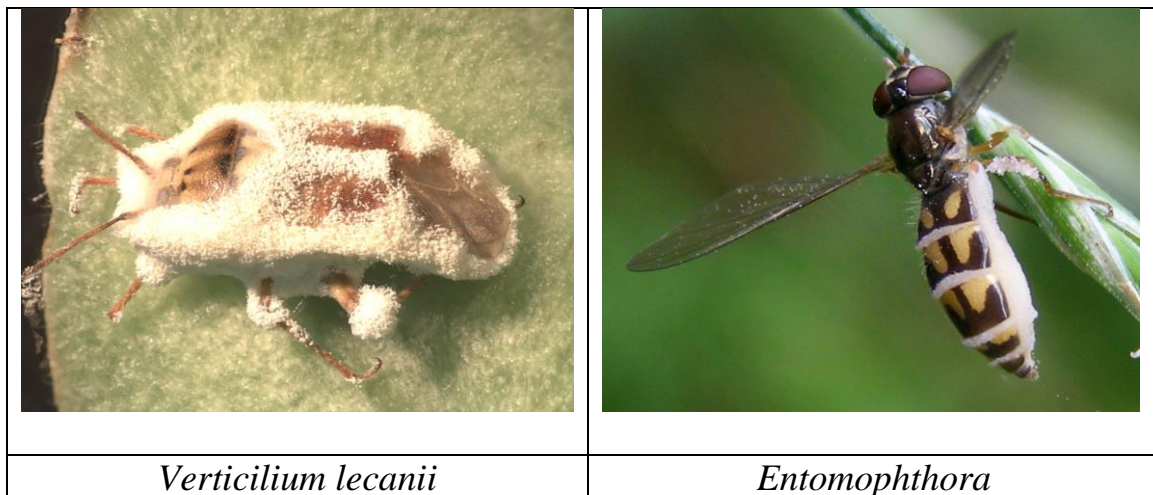


Рисунок 10.4 – Комахи, уражені ентопатогенними грибами

Збудник зеленої мускарини (рід *Metarrhizium*) – це найбільш відомий ентомопатогенний гриб, описаний більше 100 років тому як зелений мускаринний гриб. На його основі були отримані перші препарати біопестицидів у промислових масштабах. Цей гриб уражує комах з багатьох груп, включаючи слинового пасовищного клопа і шкідника цукрової тростини.

Для інфікування сарани в США використовують австралійський мікроскопічний гриб *Entomophthora praxibuli*. Сарана гине протягом 7-10 днів після застосування препарату. Спори гриба після зимівлі в ґрунті здатні вражати наступні покоління комах.

Вірусні препарати

Дуже перспективними для захисту рослин є ентомопатогенні препарати створені на базі вірусів (**вірини**). Віруси високовірулентні й вузькопецифічні, добре зберігаються в природі. Проте, вони є практично повністю безпечними для людини і усієї біоти. Інфікуються комахи вірусами при живленні. Тільця-включення, що потрапили в кишковок, руйнуються в лужному середовищі. Віріони, що звільнилися, проникають через стінку кишковока до клітин і реплікуються в ядрах.

Перший вірусний інсектицид, створений компанією «Сандоз» у 70-ті роки, був призначений для боротьби з бавовняними хробаками.

У відповідності з рекомендаціями Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я 1973 р. особлива увага при вивченні вірусів була звернена на одну групу – **бакуловіруси**. У цій групі відсутні віруси, патогенні для хребетних.

Бакуловіруси – це дволанцюгові ДНК-віруси, до яких належать віруси ядерного поліедрозу (ВЯП), віруси гранульозу (ВГ). Видові назви ентомопатогенних вірусів, що інфікують комах складаються з назви групи і господаря (наприклад, поліедроз шовкопряда непарного, гранульоз совки

озимої), або включають місце локалізації вірусу в тілі комахи-господаря (ядерний поліедроз, цитоплазматичний поліедроз). Поліедрози уражують переважно лялечки (гусінь) лускокрилих, двокрилих і прямокрилих.

Технологічна схема отримання вірусних препаратів

Процес виготовлення вірусних препаратів включає етапи:

1. Виготовлення їжі (суміш агару, сахарози, казеїну, проростків пшениці, солей) і вирощування гусені.
2. Відбір здорової гусені.
3. Зараження гусені та виділення вірусів (7-14 днів).

На основі бактерії *Salmonella enteritidis* готують препарати проти гризунів **бактороденцид**, який випускається у двох формах – зерновий (на основі зерна пшениці, ячменю або вівса) і амінокістковий (на залишках кісток). Зерновий бактороденцид застосовують проти польових видів мишоподібних гризунів, амінокістковий – проти щурів і мишей, що мешкають у житлових будинках. Препарат безпечний як для людини, так і для домашніх й диких тварин.

10.3. Виробництво мікробних засобів захисту рослин

Пестициди (гербіциди) – хімічні препарати для боротьби з бур'янами, складають біля 50 % сумарного ринку хімікатів для сільського господарства. Альтернативою хімічним пестицидам, які негативно впливають на навколишнє середовище, є виготовлення **мікробних пестицидів (біогербіцидів)**, до яких належать мікроорганізми-патогени рослин, ферменти, а також напівпродукти, що отримують шляхом біоконверсії. Найчастіше використовують грибні фітопатогени і грибні фітотоксини. На основі *Alternaria cassiae* і *Fusarium lateritium* розроблено препарати, які застосовують при боротьбі з бур'янами, що ростуть на соєвих і арахісових полях.

Поряд із гербіцидами, для захисту рослин застосовують препарати для **боротьби зі збудниками захворювань**. На базі бактерій роду *Pseudomonas* (*P. fluorescens*) отримано препарати, що пригнічують розвиток понад 40 видів мікроорганізмів, що уражують пшеницю, жито, ячмінь, а також проводять захист насіння сорго і кукурудзи від антрактозу і ризоктоніозу, а бавовника і сої – від вілту тощо.

Для боротьби зі фітофторозом яблунь застосовують препарати на базі ґрунтової бактерії *Enterobacter aerogenes*. Проти фітопатогенів роду *Ervinia*, які спричиняють гниль картоплі, ефективними є *Pseudomonas fluorescens*.

Флавобактерин – біофунгіцид для захисту основних сільськогосподарських культур від комплексу грибних і бактеріальних хвороб. Найбільш ефективний проти збудників хвороб зернових культур (борошниста роса, коренева гниль), картоплі (ризоктоніоз, парша звичайна, фузаріоз), винограду (оїдіум), соняшнику (прикоренева склеротинія). До складу препарату входять бактерії роду *Flavobacterium*, що продукують високоактивний

антибіотик «флавоцин» з широким спектром дії на фітопатогенні гриби і бактерії (рис. 10.5).

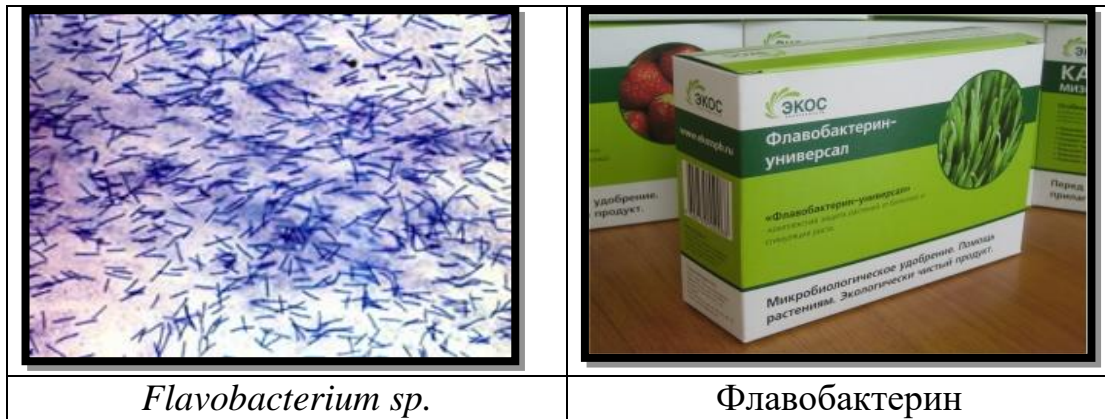


Рисунок 10.5 – Чиста культура *Flavobacterium sp.* і готовий препарат флавобактерин

Захист багатьох овочевих культур від захворювань, що викликаються певними видами мікроскопічних грибів, забезпечується застосуванням препаратів на базі культур *Trichoderma polysporum*, *T. viride*.

На основі мікробного синтезу налагоджено промислове виробництво **стимуляторів росту рослин – гіберелінів**. Цей процес здійснюють з використанням аскоміцетного гриба *Fusarium moniliforme*.

Виділяють гіберелін з фільтрату культуральної рідини. Процес відбувається у дві фази. На *першій фазі* проходить нагромадження біомаси, на *другій* – утворення продукту. Субстратом для вирощування продуцента є середовище, що містить сахарозу і соєву муку. Головною умовою є співвідношення азоту і вуглецю. Висока продуктивність культури відмічена при нестачі азоту і при високому рівні джерела вуглецю.

Питання для самоконтролю:

1. Які організми здатні фіксувати молекулярний азот?
2. Які бактерійні добрива отримують у промислових умовах?
3. Що таке біоінсектициди?
4. Які мікроорганізми використовують для виготовлення біоінсектицидів?
5. Чим відрізняється механізм дії біоінсектицидів бактерійного і грибного походження?
6. Назвіть мікроорганізми, які синтезують речовини-регулятори росту рослин.
7. У чому переваги застосування біопестицидів порівняно з хімічними пестицидами?

Виберіть правильну відповідь:

1. Біологічні засоби боротьби зі шкідниками сільського господарства, використання яких ґрунтується на здатності мікроорганізмів викликати інфекційні захворювання комах-шкідників рослин, називають:

- А) інсектицидами;
- Б) пестицидами;
- В) ентомопатогенними препаратами.

2. Продуцентами ентомопатогенних препаратів є:

- А) бактерії, гриби, віруси;
- Б) віруси, рослини;
- В) гриби і бактерії;
- Г) бактерії і тварини.

3. На основі яких мікроорганізмів одержані препарати інсектин, ентеробактерин, дендробацилін, біоспор?

- А) *Bacillus thuringiensis*;
- Б) вірусів;
- В) *Beauveria bassiana*.

4. *Beauveria bassiana* використовують для виготовлення препаратів:

- А) боверину та біотрону;
- Б) ентеробактерину;
- В) інсектину, дендробациліну;
- Г) біоспору.

5. На основі яких мікроорганізмів одержані препарати вірини?

- А) *Bacillus thuringiensis*;
- Б) вірусів;
- В) *Beauveria bassiana*.

6. Які препарати бактерійних добрив виготовляють на основі бактерій роду *Rhizobium*?

- А) ризобін;
- Б) нітрагін;
- В) фосфобактерин;
- Г) азобактерин.

7. Бактерійний препарат азобактерин виготовляють на основі бактерій:

- А) роду *Rhizobium*;
- Б) роду *Azotobacter*;
- В) роду *Bacillus*.

8. Бактерійний препарат фосфобактерин виготовляють на основі бактерій:

- А) роду *Rhizobium*;
- Б) роду *Azotobacter*;
- В) роду *Bacillus*.

9. Препарат бактороденцид, який застосовують проти гризунів, виготовляють на основі бактерій:

- А) *Salmonella enteritidis*;
- Б) *Azotobacter chroococcum*;
- В) *Bacillus megaterium*.

10. Які мікроорганізми використовують для одержання стимуляторів росту рослин (гіберелінів)?

- А) *Fusarium mortiforme*;
- Б) *Azotobacter chroococcum*;
- В) *Bacillus megaterium*.

Виконайте завдання:

1. Порівняйте механізм дії ентомопатогенних бактерійних і грибних препаратів.

2. Заповніть таблицю «Бактерійні препарати сільськогосподарського призначення».

Таблиця

Бактерійні препарати сільськогосподарського призначення

Група/ назва препаратів	Продуценти	Застосування/Спектр дії	Технологія виробництва
Біодобрива			
1.			
2.			
3. ...			

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Основна

1. Пляцук Л.Д., Черниш Є.Ю. Екологічна біотехнологія : принципи створення біотехнологічних виробництв : навчальний посібник. Суми : Сумський державний університет, 2018. 293 с.
2. Трохимчук І.М., Плюта Н.В., Логвиненко І.П., Сачук Р.М. Біотехнологія з основами екології: навчальний посібник. Київ : Видавничий дім «Кондор», 2019. 304 с.

Додаткова

1. Рильський О.Ф., Домбровський К.О., Дударева Г.Ф. Промислова біотехнологія. Курс лекцій для студентів 5–6 курсів біологічного факультету денного та заочного відділень. Запоріжжя : ЗНУ, 2010. 126 с.
2. Костюченко Н.І. Біотехнологічні аспекти раціонального природокористування: навчальний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра напряму підготовки «Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування». Запоріжжя : ЗНУ, 2018. 116 с.
3. Dombrovskiy K.O., Rylskiy A.F., Gvozdiak P.I., Sherstoboieva O.V., Petrusha Yu.Yu. Distribution of inorganic nitrogen compounds in purification of storm wastewater of the engine-building manufactory. *Naukovyi Visnyk Natsionalnoho Hirnychoho Universytetu*. 2020. № 2. P. 112–118.
4. Dombrovskiy K.O., Gvozdyak P.I. Biological afterpurification of industrial Sewage from hexamethylene diamine using Periphyton communities on the «VIYa» fibrous carrier and on the root system of *Eichhornia crassipes*. *Hydrobiol. Journal*. 2018. Vol. 54. № 4. P. 63–71.
5. Яворська Г.В., Гудзь С.П., Гнатуш С.О. Промислова мікробіологія : навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2008. 256 с.
6. Северин Л.І., Петрук В.Г., Безвозюк І.І., Васильківський І.В. Природоохоронні технології. Частина 1. Захист атмосфери : навчальний посібник. Вінниця : ВНТУ, 2012. 388 с.
7. Петрук В.Г., Северин Л.І., Васильківський І.В., Безвозюк І.І. Природоохоронні технології. Частина 2 : Методи очищення стічних вод : навчальний посібник. Вінниця : ВНТУ, 2014. 258 с.

8. Петрук В.Г., Васильківський І.В., Безвозюк І.І., Петрук Р.В., Турчик П.М. Природоохоронні технології. Частина 3 : Методи переробки осадів стічних вод : навчальний посібник. Вінниця : ВНТУ, 2013. 324 с.
9. Горова А.В., Лисицька С.М., Павличенко А.В., Скворцова Т.В. Біотехнології в екології : навчальний посібник. Дніпропетровськ : Національний гірничий університет, 2012. 184 с.
10. Капрельянц Л.В. Теоретичні основи біотехнології : навчальний посібник. Харків : Факт, 2020. 291 с.
11. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія [Текст] : підручник. Київ : НУХТ, 2009. 336 с.
12. Герасименко В.Г., Герасименко М.О., Цвіліховський А.І. та ін. Біотехнологія [Текст] : підручник. Київ : ІНК ОС, 2006. 647 с.
13. Царенко О.М., Несветов О.О., Кадицький М.О. Основи екології та економіка природокористування [Текст] : навч. Посібник. Суми : Університетська книга, 2001. 324 с.
14. Романенко В.Д., Крот Ю.Г., Киризія Т.Я. та ін. Природні і штучні біоплато : фундаментальні і прикладні аспекти : монографія [Текст]. Київ : Наук. думка, 2012. 110 с.
15. Кляченко О.Л., Мельничук М.Д., Іванова Т.В. Екологічні біотехнології : теорія і практика : навчальний посібник. Вінниця : ТОВ «Нілан-ЛТД», 2015. 254 с.
16. Ігнатюк О.А. Основні екологічні принципи та концепції : навчальний посібник. Київ : ВПІ ВПК «Політехніка», 2006. 268 с.
17. Пляцук Л.Д., Черниш Є.Ю., Яхненко О.М., Аблєєва І.Ю., Макаренко Н.О., Чубур В.С. Розвиток екологічно безпечних технологій конверсії фосфорвмісної сировини природнього і техногенного походження. *Екологічні науки*. 2018. №1 (20). Т.1. С. 135–139.
18. Niu J. et al. The shift of microbial communities and their roles in sulfur and iron cycling in a copper ore bioleaching system. *Scientific Reports*. 2016. №6. P. 34–44.
19. Крот Ю.Г. Использование высших водных растений в биотехнологиях очистки поверхностных и сточных вод. *Гидробиол. журн.* 2006. Т. 42, № 1. С. 47–57.
20. Гриб И.В. Формирование биообрастаний на искусственных субстратах систем третичной доочистки сточных вод. *Гидробиол. журн.* 2005. Т. 41, № 3. С. 15–28.

Навчальне видання
(українською мовою)

Домбровський Костянтин Олегович

ПРИРОДООХОРОННІ ТЕХНОЛОГІЇ

Навчальний посібник
для здобувачів ступеня вищої освіти магістра
напряму підготовки «Екологія та охорона навколишнього середовища»

Рецензент *О.М. Войтович*
Відповідальний за випуск *О.Ф. Рильський*
Коректор *К.О. Домбровський*