

Винахід належить до біотехнології та мікробіології, зокрема до біопрепаратів, що складаються з ефективних мікроорганізмів для екологічно безпечного розкладання (деградації) органічних мас, і може бути використаний для швидкої, ефективної переробки органічних відходів, включаючи очищення побутових та промислових каналізаційних стоків, компостування органічних відходів, розкладання (деградації) гною тварин та посліду птахів, очищення ґрунтів від органічного забруднення. Біопрепарат за винаходом також може використовуватися для очищення водойм, знешкдження запахів та очищення каналізаційного обладнання в побутових умовах та різних галузях промисловості (у тому числі харчової промисловості) і сільського господарства.

З рівня техніки відомий біопрепарат "Байкал-ЕМ-1" (Державної реєстрації № 05-9395 (9796-9799)-0369(0386)-1, ТУ 9291-001-50710575-00, виробник ПО "ЕМ-Кооперація", Москва, РФ). Цей препарат містить молочнокислі, фотосинтезуючі, азотфіксуючі бактерії, дріжджові гриби. Він призначений для відновлення родючості ґрунту, як біодобавка в корм тварин і птахів, а також для утилізації органічних вихідних речовин. Головним недоліком зазначеного біопрепарату є деяка монотонність складу, а також те, що пропонується застосовувати один і той же препарат з різною метою: у рослинництві - для підвищення родючості ґрунту, підвищення опору хворобам і шкідливим рослинам; в тваринництві та птахівництві - для профілактики та лікування шлунково-кишкових захворювань; для ферментації органічних відходів. Така поліфункціональність знижує ефективність біопрепарату в кожному з зазначених вище напрямків, оскільки максимальна ефективність досягається індивідуальним підбором ефективних мікроорганізмів з відомими корисними властивостями.

Також з рівня техніки є відомими штам *Rhodotorula* sp. CB-1 IMB Y-5041 за патентом України № 95212 на винахід, дата публікації 11.07.2011, особливістю якого є висока активність до розкладу жирів рослинного та тваринного походження в присутності білків та здатність росту на мінімальних поживних середовищах, що робить його придатним до застосування в складі консорціуму мікроорганізмів для очищення побутових і промислових систем каналізації від жирових забруднень. Штам *Bacillus* sp. BC-1 за патентом України № 62564 на корисну модель, дата публікації 12.09.2011, який є продуцентом, що ефективно руйнує складні білкові сполуки, підтримує стабільність процесу біосинтезу ферментів та здатний швидко рости на мінеральних середовищах з концентрованими органічними відходами. Штам *Cellulomonas* sp. 3-1 IMB B-7303 за патентом України № 62219 на корисну модель, дата публікації 25.08.2011, який має високу активність до розкладу целюлози в присутності жирів та білків, має здатність росту на мінімальних поживних середовищах та придатний до застосування в складі консорціуму мікроорганізмів для очищення побутових і промислових систем каналізації від паперу, компостування рослинних відходів. Основними недоліками кожного з вищезазначених штамів мікроорганізмів є вибіркова активність відносно органічних мас конкретного типу і виду, що обмежує їхню придатність для широкого застосування в процесах екологічно безпечного розкладання органічних відходів.

Найбільш близьким за технічним результатом до винаходу, що заявляється, є біопрепарат за патентом РФ № 2347808 на винахід, дата публікації 27.02.2009, який містить суміш суспензій бактерій родів *Bacillus* та додатково містить суміш суспензій штамів родів *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Cellulomonas*, *Erwinia*, *Arthrobacter*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*. Основними недоліками зазначеного біопрепарату є тривалість процесу виготовлення, оскільки до його складу входять живі клітини і спори непатогенних штамів природних бактерій, а також дуже повільна за часом дія. Крім того, не для всіх видів органічних відходів ефективність композиції штамів бактерій вища за ефективність окремих штамів бактерій.

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу розробки біопрепарату з ефективних мікроорганізмів для розкладання органічних відходів, що представляє багатовидову, поліфункціональну композицію, до складу якої входить суміш штамів мікроорганізмів, здатних підвищити коефіцієнт корисної дії у процесі очищення екології та прискорити розклад органічних мас у мікробіологічний спосіб.

Поставлена задача вирішується тим, що пропонується біопрепарат з мікроорганізмів для деградації органічних відходів у вигляді суміші штамів бактерій, де суміш складається зі штамів бактерій, в наступному ефективному складі та співвідношенні компонентів, мас. %:

<i>Cellulomonas</i> sp. 3-1	5-80
<i>Rhodotorula</i> sp. CB-1	5-80
<i>Bacillus</i> sp. BC-1	5-80.

Доцільно біопрепарат наносити на носій.

Доцільно носій для біопрепарату вибирати з групи, що включає кукурудзяну крупу, пшеничні висівки.

В результаті досліджень винахідниками був виявлений синергізм у спільній дії суміші (комбінації) штамів бактерій *Rhodotorula* sp. CB-1, *Bacillus* sp. BC-1 та *Cellulomonas* sp. 3-1. Для його підтвердження було проведено ряд досліджень за наступною методикою:

- для кожного штаму були окремо проведені експерименти на трьох субстратах: білки (джерело - білковий гідролізат), жири (джерело - тригліцериди олеїнової кислоти) та целюлоза (джерело - мікрोकристалічна целюлоза);

- для цих самих субстратів були проведені експерименти для комбінації всіх трьох штамів.

В результаті проведених експериментів отримали наступні дані:

1. Розкладання білків

При використанні тільки *Bacillus* sp. BC-1 розкладання білків становило 70 % через 24 години. При комбінації всіх трьох штамів це значення підвищилось до 90 %, що демонструє підсилений ефект завдяки діяльності інших штамів, які покращують умови для протеолітичної активності *Bacillus* sp. BC-1;

2. Розкладання жирів:

При самотійному *Rhodotorula* sp. CB-1 досягали 65 % розкладання жирів через 24 години. При використанні в комбінації з іншими штамами ефективність розкладання підвищилася до 85 %. *Bacillus* sp. та *Cellulomonas* sp. допомагають зменшити в'язкість середовища, що полегшує доступ ліполітичних ферментів до жирів;

3. Розкладання целюлози:

Штам *Cellulomonas* sp. 3-1 самотійно розщеплював до 60 % целюлози через 24 години. У комбінації з іншими штамами це значення збільшилось принаймні до 80 %. Поліпшення доступу до целюлози стало можливим завдяки діяльності *Rhodotorula* sp. та *Bacillus* sp., які сприяли розщепленню жирів і білкових часток, що ускладнювали доступ до целюлози.

Синергізм чітко виявився у кожному з проведених експериментів. Суміш (комбінація) штамів значно підвищувала ефективність розкладання різних органічних мас у порівнянні з дією кожного штаму бактерій окремо. Це підтверджує, що їхнє об'єднання має синергічний ефект, оскільки комбінована дія перевершувала суму індивідуальних ефектів кожного штаму.

Досягнуті результати в розкладанні органічних мас завдяки синергізму між штамами бактерій показали, що об'єднання цих трьох штамів не є очевидним для фахівця у галузі мікробіології або біотехнології, оскільки, незважаючи на те, що кожний з цих штамів відомий своєю специфічною активністю, їх сумісне застосування забезпечує неочевидні переваги. Фахівець у цій галузі міг би передбачити, що штами можуть працювати поодиноко для досягнення певних результатів у розкладанні конкретних субстратів. Проте, важко або неможливо було передбачити, що їхнє об'єднання може привести до значного підвищення ефективності завдяки поліпшенню доступу до субстратів і зменшенню взаємних перешкод між ними. Іншими словами, синергічний ефект не міг бути передбачений за допомогою простого аналізу індивідуальних властивостей штамів, а став можливим тільки за рахунок ретельного експериментального аналізу.

Важливими факторами для використання комбінації зазначених штамів бактерій є докази стабільності та відсутності або зменшення взаємного впливу між штамами. Було досліджено взаємодію між штамами для перевірки, чи не інгібують вони один одного. Результати показали, що при одночасному культивуванні *Bacillus* sp. BC-1, *Cellulomonas* sp. 3-1 та *Rhodotorula* sp. CB-1, їхня життєдіяльність не знижувалась. Навпаки, середовище, створене одним штамом, покращувало умови для інших. Жоден із штамів не демонстрував ознак пригнічення росту або активності інших штамів протягом 48 годин інкубації. Цей результат вказує на те, що композиція є стабільною, і штами підтримують один одного без негативного взаємного впливу. Для того, щоб довести відсутність або примусове зменшення негативного взаємного впливу між штамами *Cellulomonas* sp. 3-1, *Rhodotorula* sp. CB-1 та *Bacillus* sp. BC-1, було проведено серію експериментів з метою оцінки їхньої здатності співіснувати в одній композиції без пригнічення життєдіяльності один одного.

1. Експериментальна методика:

- Культивування в спільних та індивідуальних середовищах: Кожен штам був культивований окремо та в спільному середовищі для порівняння життєдіяльності при різних умовах.

- Аналіз життєздатності: Вимірювалася кількість життєздатних клітин (CFU/мл) кожного штаму через певні інтервали часу для оцінки їхнього росту як в ізолюваному середовищі, так і в спільному.

- Активність ферментів: Аналізувалася активність ключових ферментів (протеази, ліпази, целюлази) в обох умовах, щоб визначити, чи впливає взаємодія штамів на їх ферментативну активність.

2. Результати експериментів:

- Відсутність взаємного пригнічення: У спільному середовищі життєздатність кожного штаму не знижувалася порівняно з їх ростом у чистих культурах. Через 48 годин після інокуляції було зафіксовано рівні CFU, співмірні з контрольними групами, що свідчить про відсутність негативного впливу одного штаму на інший.

- Стабільність ферментативної активності: Активність ключових ферментів для кожного штаму (ліпази для *Rhodotorula* sp., протеази для *Bacillus* sp. та целюлази для *Cellulomonas* sp.) залишалася стабільною або навіть підвищувалася у спільній культурі. Це вказує на те, що штами не пригнічували ферментативну активність один одного.

3. Примусове зменшення взаємного впливу:

- Оптимізація середовища: Було встановлено, що шляхом регулювання умов культивування (наприклад, оптимізації pH, температури, концентрації поживних речовин) можна примусово зменшити можливий негативний вплив між штамми.

Наприклад:

- При підтримці pH на рівні 7.0 спостерігалася найвища сумісність штамів, оскільки ця нейтральна середовище була оптимальною для всіх трьох бактерій.

- Внесення достатньої кількості кисню у середовище дозволило уникнути анаеробних умов, що могло би призвести до пригнічення росту деяких штамів.

4. Механізми уникнення конкуренції:

- Різні джерела поживних речовин: Оскільки кожен штам має свої власні субстрати для живлення (целюлоза для *Cellulomonas* sp., жири для *Rhodotorula* sp. та білки для *Bacillus* sp.), конкуренція за поживні речовини мінімізується, і вони можуть співіснувати без негативного впливу на ріст та активність один одного.

- Міжштамова кооперація: Важливо зазначити, що діяльність одного штаму створює умови, які можуть навіть полегшити діяльність іншого штаму. Наприклад, *Cellulomonas* sp. сприяє розщепленню целюлози, що дозволяє *Bacillus* sp. та *Rhodotorula* sp. легше дістатися до білків та жирів.

5. Висновки:

Результати дослідження чітко демонструють відсутність негативного взаємного впливу між штамми у спільному середовищі. Завдяки використанню оптимальних умов культивування та їх природній відмінності у метаболізмі, ці штамми не тільки не пригнічують один одного, а й доповнюють дії кожного, забезпечуючи синергійний ефект. Цей результат підтверджує, що розроблена композиція штамів є стабільною, ефективною і готовою до практичного застосування без необхідності коригування їхньої активності через можливу взаємну конкуренцію.

Можливість практичного використання біопрепарату за винаходом, що пропонується, ілюструють приклади його виготовлення та використання для різних органічних субстратів.

Приклад 1: Композиція для очищення каналізаційних стоків

Пропорції штамів:

<i>Cellulomonas</i> sp. 3	1: 30 %
<i>Rhodotorula</i> sp. CB	1: 40 %
<i>Bacillus</i> sp. BC	1: 30 %

Процес приготування:

Культивування: кожний штам культивують окремо в оптимальних умовах (температура 28-30 °C, pH 7.0). Для *Cellulomonas* sp. використовують середовище з додаванням целюлози, для *Rhodotorula* sp. - середовище з додаванням жирних компонентів, для *Bacillus* sp. - білкове середовище.

Сушіння: після досягнення максимального росту кожного штаму їхні культури фільтруються, а потім наносяться на носій (наприклад, кукурудзяну крупу або пшеничні висівки). Суміші сушать до вологості не більше 10 %.

Змішування: Висушені культури змішують у зазначених пропорціях для отримання рівномірної композиції. Отримана композиція пакується в герметичні контейнери для наступного зберігання.

Призначення: Цю композицію використовують для очищення каналізаційних стоків, де спостерігалася накопичення жирів, білків та рослинних залишків. Високий вміст *Rhodotorula* sp. забезпечує ефективне розщеплення жирів, в той час як *Bacillus* sp. допомагає з білками, а *Cellulomonas* sp. сприяє розкладанню целюлози. Композиція швидко знижує рівень органічного забруднення та видаляє зловонні запахи. Протягом перших 48 годин після застосування композиції спостерігалася значне зниження жирних відкладень (на 70 %) та майже повне усунення неприємних запахів. Крім того, частково були розкладені целюлозні залишки, що сприяло підвищенню пропускної здатності каналізаційної системи.

Приклад 2: Композиція для компостування органічних відходів

Пропорції штамів:

<i>Cellulomonas</i> sp. 3	1: 50 %
<i>Rhodotorula</i> sp. CB	1: 25 %
<i>Bacillus</i> sp. BC	1: 25 %

Процес приготування:

Культивування: Культивування кожного штаму проводять в окремих ферментерах з відповідними поживними середовищами, як у прикладі 1. Для *Cellulomonas* sp. використовують середовище, багате на целюлозу, що стимулює максимальну активність целюлаз.

Сушіння: Культури висушують до вологості 10 % та наносять на носій (наприклад, кукурудзяна крупа).

Змішування: Після сушіння культури змішують у зазначених пропорціях та пакують в спеціальні контейнери для застосування у компостуванні.

Призначення: Ця композиція оптимізована для компостування органічних відходів, багатих на рослинні матеріали, целюлозу та невелику кількість жирів та білків. Високий вміст *Cellulomonas* sp. забезпечує ефективне розкладання целюлози, що є основним компонентом багатьох рослинних відходів. *Bacillus* sp. і *Rhodotorula* sp. підтримують процес компостування, переробляючи білки та жири, які можуть бути присутніми у відходах. Через 7 днів після застосування спостерігалось інтенсивне розкладання целюлозних залишків, що прискорило процес компостування на 30 % порівняно з контрольними умовами (без застосування біопрепарату). До кінця 14 днів компост був повністю готовий для використання як органічне добриво.

Приклад 3: Композиція для очищення жирних стоків

Пропорції штамів:

Cellulomonas sp. 3 1: 20 %

Rhodotorula sp. CB 1: 50 %

Bacillus sp. BC 1: 30 %

Процес приготування:

Культивування: Штами культивуються окремо за стандартними умовами. Для *Rhodotorula* sp. використовується середовище, багате на жири та масла, для досягнення максимальної ліполітичної активності.

Сушіння: Висушені культури з вологістю 10 % зберігають на носіях.

Змішування: Після культивування та сушіння культури змішують у зазначених пропорціях.

Призначення: Ця композиція призначена для очищення жирних стоків на харчових підприємствах або ресторанах, де основним забруднювачем є жири, зокрема жирних стоків з харчового підприємства, яке спеціалізується на виробництві олії. Високий вміст *Rhodotorula* sp. забезпечує максимальну активність ліпаз, що розщеплюють жири, тоді як *Bacillus* sp. та *Cellulomonas* sp. допомагають переробляти інші органічні компоненти стоків. Протягом 72 годин після введення біопрепарату рівень жирів у стоках знизився на 80 %. Також спостерігалось значне зменшення відкладень жиру в каналізаційних трубах, що попередило можливі засмічення.

Таким чином, біопрепарат за винаходом, що заявляється, дозволяє за рахунок використання різних пропорцій штамів бактерій адаптувати продукт для різних цілей: очищення каналізаційних стоків, компостування органічних відходів або очищення промислових стоків. Залежно від типу забруднювача можна варіювати пропорції кожного штаму, що забезпечує максимальну ефективність дії препарату.