

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

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

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 04 ” квітня 20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ФІЛАНОВА Наталія Володимирівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Salmonella enteritidis*, var. *Issatchenko* для
виробництва бактороденциду

керівник роботи ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович, доц., к.т.н.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Escherichia coli* BL 21 (DE3), цільовий
продукт: фермент стрептокіназа, річна потужність проектного виробництва
стрептокінази становитиме 22,2 кг., кількість трудоднів – 60 кількість продукту за
один цикл – 1,07 м³/цикл.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1.
Характеристика цільового продукту, РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та
характеристика біологічного агента, РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування,
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору стадій виробництва, РОЗДІЛ 5. Специфікація
обладнання, РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми процесу, РОЗДІЛ 7. Контроль
виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва стрептокінази – 2 аркуші формату А1. Апаратурна
схема виробництва стрептокінази – 2 аркуші формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільовго продукту	04.04.22 - 11.04.22	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.04.22 - 18.04.22	
3	Техніко-економічне обґрунтування	18.04.22 - 25.04.22	
4	Обґрунтування вибору стадій виробництва	25.04.22 - 02.05.22	
5	Специфікація обладнання	02.05.22 - 10.05.22	
6	Виконання графічної частини проекту	02.04.22 - 10.05.22	
7	Опис технологічної схеми процесу	10.05.22 - 17.05.22	
8	Контроль виробництва	17.05.22 - 24.05.22	
9	Оформлення пояснювальної записки	24.05.22 - 01.06.22	

Здобувачка _____
(підпис)

Наталія ФЛАТОВА
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Олександр ВОРОНЦОВ
(ім'я та прізвище)

Реферат

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технології отримання препарату Бактороденциду на основі бактерій *Salmonella enteritidis var. Issatschenko*.

Технологія виробництва Бактороденциду складається з допоміжних стадій (приготування мийних засобів, підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища) та основних процесів (виращування інокуляту у колбах на качалках, інокуляторі та посівному апараті, виробничого біосинтезу) що наведені в апаратурній та технологічній схемах.

Проведений аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури щодо технології отримання препарату на основі біомаси Бактороденциду, який використовується в сільському господарстві у боротьбі проти мишеподібних гризунів.

Складено та зроблено опис технологічної схеми, яка включає всі стадії допоміжних робіт, підготовки посівного матеріалу та промислового культивування. Складено та розроблено апаратурно-технологічну схему виробництва препарату Бактороденциду.

Кваліфікаційна робота викладена на 56 сторінок друкованого тексту, містить 11 таблиць, 5 рисунків, 4 додатка і складається з вступу, семи розділів, та списку використаної літератури (джерела). Графічні матеріали розміщені на листах формату А1.

Ключові слова: Salmonella enteritidis var. Issatschenko, біомаса, родентицид, культивування, виробничий біосинтез

Зміст

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	7
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента.....	8
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	8
2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Issatschenko</i>	10
2.3 Таксономічний статус біологічного агента.....	12
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	13
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	13
3.1.1 Розрахунок річної потреби.....	13
3.2. Розрахунок потужності виробництва препарату Бактороденциду на основі бактерій <i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Issatschenko</i>	14
3.2.1 Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 2 м ³	15
3.2.2 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 0,2 м ³	16
3.2.3 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 0,02 м ³	16
3.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	17
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	19
4.1 Обґрунтування до ферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	19
4.1.1 Обґрунтування умов і способу культивування <i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Issatschenko</i>	19
4.1.2 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	20
4.1.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	21
4.1.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	23
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	25
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	27
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	33
7.1 Методики контролю виробництва бактороденциду.....	34
ВИСНОВКИ.....	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	40
ДОДАТКИ.....	44

Вступ

Важливе місце у всіх сферах життя людини на сьогодні займає біотехнологія. Біотехнологічні методи застосовуються у багатьох галузях:

- фармацевтична промисловість
- легка та харчова промисловість
- сільське господарство та ін.

Біотехнологія використовується для отримання сполук, які необхідні для життя і добробуту людини. Перспективність та ефективність застосування біотехнологічних процесів у різних сферах людської діяльності від одержання їжі і напоїв до відтворення екологічно чистих енергоносіїв і нових матеріалів обумовлена їх компактністю й одночасно великомасштабністю, високим рівнем механізації й продуктивності праці. Ці процеси піддаються контролю, регулюванню й автоматизації. [7]

Упродовж найближчих років прогнозується значне розширення сфер використання біотехнології у таких важливих галузях, як виробництво напівпровідників (нові матеріали), інформаційні технології (мікроелектронні системи, засоби біоінформатики, біокомп'ютери). Впровадження біотехнологічних методів в окремих галузях якісно змінить виробничу базу.

Розвиток біотехнології є найважливішим фактором еколого-економічного розвитку суспільства, що обумовлене вирішенням значної кількості еколого-економічних проблем. [8]

В сільському господарстві великих проблем завдають гризуни. За видовим складом і чисельністю гризуни – велика група тварин з класу ссавців. Такі особливості гризунів – як широке поширення, потенційна плодючість і різноманітна шкідливість – змушують вести з ними постійну боротьбу. Відомий ряд хімічних пестицидів (родентицидів) для контролю чисельності гризунів

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ</i>		
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробник</i>	<i>Філатова Н. В.</i>				<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Воронцов О. О.</i>					4	56
<i>Н. конто</i>					<i>ВСТУП</i> <i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консильт</i>							
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков</i>						

Родентициди застосовуються для захисту сільськогосподарських рослин, запасів зерна, в ветеринарії і охороні здоров'я. Ці препарати (Фумарин, Бромдіолон, Етілфенацін, Брометалін, Стрихнин, Фосфід цинку і ін.) Можуть стати серйозною загрозою для теплокровних тварин і людини. До можливості застосування тих чи інших токсикантів проти гризунів необхідно підходити з особливою обережністю. До числа ефективних засобів обмеження чисельності гризунів відноситься біологічний метод, заснований на застосуванні бактеріальних родентопатогенних препаратів. Широко відомий і рекомендований для застосування біопрепарат Бактороденцид випускається на основі штаму екологічно безпечної бактерії *Salmonella enteritidis var. Issatschenko*. [3]

Актуальність

Гризуни завдають величезної шкоди при виробництві та зберіганні сільськогосподарської продукції. Крім того, вони є джерелом і переносниками багатьох інфекційних захворювань людини і сільськогосподарських тварин. Втрати від цих шкідників становлять до 28% врожаю.

Новизна

В даній роботі запропоновано модифіковане поживне середовище для забезпечення культивування бактерій *Salmonella enteritidis var. Issatschenko*.

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

Традиційний спосіб боротьби з мишеподібними шкідниками – чітке виконання агротехнічних заходів. Якщо мишеподібні шкідники все-таки заселили посіви озимих культур і багаторічних трав у великих кількостях, а традиційні способи боротьби не допомагають, застосовуються такі методи:

- поширення отруєних хімічних приманок;
- заливка аміачної води в нори ;
- застосування біологічних препаратів на основі бактерій.

Для боротьби з мишеподібними шкідниками на своїх полях ефективно використовують *біородентициди* – безпечні для тварин, птахів та інших об'єктів навколишнього середовища біологічні препарати. [1]

Бактороденцид – це приманка на основі бактерії *Salmonella enteritidis, var. Issatchenko*. Володіє суворою з вибірковою дією проти шкідливих гризунів, абсолютно безпечний для домашніх тварин. Бактороденцид готується на зерні пшениці, ячменю, вівса, рису, кукурудзи, не вимагає додаткових приманочних продуктів. Титр життєздатних клітин – не менше 2 млн. в 1 г. [9] Його біологічна ефективність може досягати 80%. Як у випадку будь-якого родентициду, технологія його застосування повинна будуватися на обов'язковому врахуванні біологічних особливостей мишеподібних гризунів, їх чутливості до препарату. Перелік високочутливих до Бактороденциду мишеподібних гризунів містить як найбільш масові шкідливі види, так і потенційно не шкідливі. Це: миша-малятко, домашня, курганчикова, лісова миша, полівка-звичайна, руда лісова, водяна (або водяний щур), степова, сірий хом'ячок. [2]

<i>НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробник</i>		<i>Філатова Н. В.</i>		
<i>Керівник</i>		<i>Воронцов О. О.</i>		
<i>Н. кантл</i>				
<i>Кансильт</i>				
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков</i>		
<i>РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту</i>				
		<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
			8	56
<i>Кафедра БТМ</i>				

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Діючим компонентом в біоредентицидних препаратах можуть бути патогенні бактерії роду *Salmonella*. Нижче наведена порівняльна характеристика продуцентів в таблиці 2.1

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика середовищ для культивування *Salmonella enteritidis*

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год	Концентрація біомаси г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Issatschenko</i> 32/3	<ul style="list-style-type: none"> Гідролізат рибної муки; NaCl 	<ul style="list-style-type: none"> 10,05 4,95 	24	40	pH 7,0-7,2 при 37 ⁰ C	Штамм бактерій <i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>issatschenko</i> 32/3 в качестве средства для получения биологической приманки против мышевидных грызунов/ Тихонович И. А., Гришечкина С. Д., Романова Т. А. [3]
<i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Issatschenko</i> 32/3	<ul style="list-style-type: none"> Панкреатичний гідролізат рибної муки (ПГРМ) 	<ul style="list-style-type: none"> 16,6 	24	40	pH 7,0-7,2 при 37 ⁰ C	
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	<ul style="list-style-type: none"> Кремнезем; Знежирене молоко; Крохмаль; Пептон; Триптон; Дріжджовий автолізат; 	<ul style="list-style-type: none"> 5 15 2 2 10 10 4 	18	20	pH 6,6-7,4 при 37 ⁰ C	Культуральная среда и способ идентификации грамотрицательных микроорганизмов/ Зубенко Р. И. [6]
<i>Salmonella typhimurium</i> № 415	<ul style="list-style-type: none"> Пептон NaCl Na₂HPO₄ Глюкоза 	<ul style="list-style-type: none"> 5 3 5 1 	12	20,1	pH 7,6 – 7,7 при 36,5 - 37,5 °C	Влияние способов культивирования на выход бактериальной массы И качество вакцин для ветеринарной медицины/ А. Я. Самуйленко, А. А. Раевский, И. В. Павленко, Н. К. Еремец, [5]

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ</i>					
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента					
Розробник	Філатова Н. В.							Літера	Аркш	Аркшів
Керівник	Воронцов О. О.								9	56
Н. кантв								Кафедра БТМ 8		
Консульт										
Зав. каф.	Стадніков									

Вартість поживних середовищ

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, гр/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6
<i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Issatschenko</i> 32/3 (варіант 1)	Гідролізат рибної муки	10,05	14	0,14	4
	NaCl	4,95	3,40	0,0016	5
Вартість 1 л середовища – 0,156 грн					
<i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Issatschenko</i> 32/3 (варіант 2)	Панкреатичний гідролізат рибної муки (ПГРМ)	16,6	2996,5	49,7	3
Вартість 1 л середовища – 49,7 грн					
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	Кремнезем	5	80	0,4	2
	Знежирене молоко	15	55	0,82	1
	Крохмаль	2	18,50	0,037	1
	Пептон	10	750	7,5	1
	Триптон	10	250	2,5	2
	Дріжджовий автолізат	4	8,50	0,034	1
Вартість 1л середовища – 10,07 грн					
<i>Salmonella typhimurium</i> № 415	Пептон	5	750	3,75	1
	NaCl	3	3,40	0,010	2
	Na ₂ HPO ₄	5	43	0,21	1
	Глюкоза	1	23	0,023	2
Вартість 1л середовища – 3,9 грн					

Ціни наведено станом на лютий 2021 року:

1 – <https://flagma.ua/>

2 – <https://prom.ua/>

3 – https://khimikon.pulscen.ru/goods/83734165-pankreaticheski_gidrolizat_rybnoy_muki_pgrm

4 – <https://harkov.flagma.ua/uk/rybnaya-muka-o2587100.html>

5 – <https://ternopol.flagma.ua/uk/natriy-hloristy-farm-o10033111.html>

Умовна вартість 1г цільового продукту

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість клітин за годину	Вартість 1л поживного середовища грн/л	Умовна вартість 1г цільового продукту, грн/л
1	2	3	4	5	6
<i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Issatschenko</i> 32/3 (варіант 1)	40	24	2,08	0,156	0,0031
<i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Issatschenko</i> 32/3 (варіант 2)	40	24	2,08	49,7	0,99
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	20	18	1,1	10,07	0,50
<i>Salmonella typhimurium</i> № 415	20,1	12	1,6	3,9	0,19

За даними таблиці 2.3 можна зробити висновок, що найбільш вигідним для промислового культивування є продуцент *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko* 32/3 з першим варіантом поживного середовища, адже умовна вартість цільового продукту найдешевша.

2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko*

Грам негативні палички, розміром 1-1,5 мкм., рухливі, не утворюють спор. [4] (рис. 3.1 та 3.2)

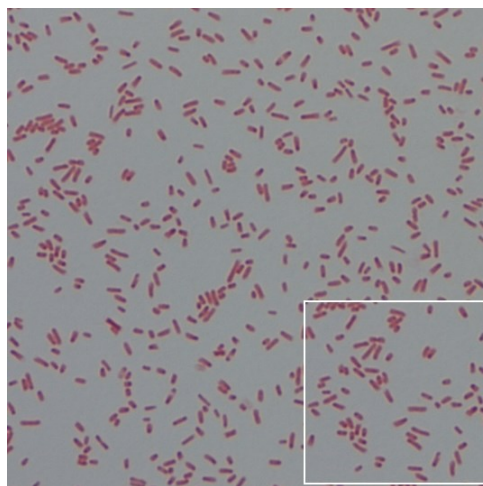


Рис. 2.1. *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko* форма клітин під мікроскопом

[11]



Рис. 1.2. Salmonella enteritidis var. Issatschenko форма клітин під мікроскопом [12]

Росте в аеробних умовах при температурі 10-45 ° С, оптимальна температура – 37 ° С, при 60 ° С бактерії гинуть через 2 години, при 70 ° С – через 40 хв, при 80 ° С – через 20 хв. Оптимальний рН 7,0-7,2.

На мясопептонному бульйоні (МПБ) утворює рівномірне помутніння, на рибному агарі (РА) – круглі, з рівними краями, прозорі колонії 1,0-3,0 мм в діаметрі. На середовищах Ендо і Плоскірева – круглі, безбарвні, на вісмут-сульфітному агарі – зеленувато-чорні блискучі колонії, які фарбують середовище під колоніями в чорний колір.

Культура зберігається на середовищі Мережковського при +4 °С, пересівання проводять кожні 1-2 місяці; або методом кріоконсервування в ліофільно висушеному стані в запаяних ампулах. [3]

Не розріджує желатину, не коагулює молоко, не утворює індолу, виділяє сірководень. По відношенню до вуглеводів: розкладає глюкозу, мальтозу, ксилозу, галактозу, арабінозу, трегалозу, дульцит, маніт, сорбіт; не розкладає сахарозу, лактозу, інозит, салицин. У гіпертонічному розчині хлористого натрію клітини піддаються плазмолізу. У фізіологічному розчині (0,85%) хлористого натрію плазмолізу не спостерігається. Бактерії чутливі до зміни осмотичного стану навколишнього середовища. По відношенню до джерел азоту: не розщеплює сечовину, відновлює нітрати в нітрити, може

використовувати азот з амінокислот. Утворює каталазу, кислу і лужну фосфатазу, ендоліпазу і ендопротеїназу. Антибіотичних речовин і пігментів не утворює. [3]

2.3 Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [13]:

- Домен – *Bacteria*
- Відділ – *Proteobacteria*
- Клас – *Gamma**proteobacteria*
- Родина – *Enterobacteriaceae*
- Рід – *Salmonella*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Обґрунтування необхідності застосування родентицидних препаратів для захисту озимих посівів від мишеподібних гризунів

Вагомою перевагою біородентицидів є те, що вони містять специфічні бактерії, що викликають хворобу тільки у мишеподібних шкідників. Біородентициди працюють в діапазоні температур від -25°C до $+10^{\circ}\text{C}$. Перевага біологічного родентициду перед хімічним – це виключення «людського фактору», тобто при роботі з «хімією» приманку необхідно внести в кожен житлову нірку, а при використанні біопрепарату допускається обробка 70-80% житлових нір у колонії, так як відбувається перезараження шкідників і поширення інфекції по всій колонії (епізоотія). Бактороденцид, на відміну від хімічних родентицидів має вибіркову здатність – тобто він знищує тільки мишеподібних шкідників, на відміну від хімічних, які небезпечні для інших тварин, птахів, і навколишнього середовища в цілому. Іншими словами, препарат заснований на бактерії, яка заражає виключно мишеподібних гризунів і вбиває тільки їх. Дуже важливою перевагою дії біородентицидів, зокрема Бактороденциду, є те, що при повторному заселенні гризунів, препарат продовжує працювати і внаслідок цього 40% «нових» шкідників знищується автоматично, без внесення додаткових доз препарату. На тлі нестабільної економічної ситуації, погіршення екології, обмеженості і дорожнечі матеріальних і технологічних ресурсів, використання біологічних родентицидів в боротьбі проти мишеподібних шкідників є для аграріїв найбільш доцільним способом [1]

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ</i>					
<i>Зм</i>	<i>Авк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ</i>					
<i>Розробник</i>	<i>Філатова Н. В.</i>							<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Воронцов О. О.</i>								14	56
<i>Н. кант</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт</i>										
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стабніков</i>									

3.1.1 Розрахунок річної потреби

Станом на 2020 рік посівні площі центральних областей України (Вінницька, Черкаська, Полтавська, Кіровоградська, Дніпропетровська) зайняли 6707900 га. [14]

Посівні площі, які відведені під урожай 2020 року

Таблиця 1.1

Область	Посівні площі, га
Вінницька	1627200
Черкаська	1206600
Полтавська	1725900
Кіровоградська	170900
Дніпропетровська	1977300
Всього: 6707900	

Захист посівів озимини, багаторічних трав від мишовидних гризунів проводять за наявності 3 колоній на 1 га. Норма витрат препарату 1-3 кг на га. [15] Препарат ефективний проти всіх видів полівок, хатньої та лісової мишей. [16] Бактороденцид застосовується в осінньо-зимовий і ранньовесняний періоди в температурних межах від -15°C до $+15^{\circ}\text{C}$. [17] При використанні біопрепарату допускається обробка 70-80% житлових нір у колонії, так як відбувається перезараження шкідників і поширення інфекції по всій колонії (епізоотія). [1] Після поїдання препарату гризуни гинуть на 6 - 8 день. Термін зберігання 45-90 днів. [18]

Визначено, що на 1 га необхідно 2 кг препарату. Отже, для обробки 6707900 га. необхідно

$$(6707900 \cdot 2)/1 = 13415800 \text{ кг препарату}$$

Враховуючи велику конкуренцію на ринку родентицидів, розраховуємо потужність виробництва, яка покриє 0,051% посівних площ.

$$6\,707\,900 \text{ га} \times 0,00051 = 3\,421 \text{ га} \times 2 \text{ кг} = 6\,842 \text{ кг}$$

Приймаємо потребу у Бактороденциду 6800 кг/рік

3.2. Розрахунок потужності виробництва препарату Бактороденциду на основі бактерій *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko*

Прийmemo:

- Кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) 290;
- Кількість сухих речовин в продукті $CP = 0,95$;
- Коефіцієнт заповнення ферментера $K_з = 0,5$;
- Концентрація біомаси в КР $P_{кр} = 40 \text{ кг/м}^3$;
- Втрати при виділенні $E_{св} = 0,2$.

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = 24 \times T_{рд} / T_{цф} = 24 \times 290 / 30 = 232 \text{ цикли}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 1,5 год, завантаження поживного середовища – 0,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 24 год).

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

$$V_{кр} = K_1 \times G_{цк} \times CP / P_{кр} (1 - E_{св}) = 1,1 \times 29,3 \times 0,95 / 40 (1 - 0,2) = 0,957 \text{ м}^3 = 960 \text{ л}$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій
Робочий об'єм ферментера:

$$V_{рф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 0,96 / (1 - 0,1) = 1,07 \text{ м}^3$$

Геометричний об'єм ферментера для отримання 960 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,5 має становити:

$$V_{гф} = V_{рф} / K_{зап} = 1,07 / 0,5 = 2,14 \text{ м}^3$$

Стандартний ферментер $V_{сф} = 2 \text{ м}^3$

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

3.2.1 Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 2 м³

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 960$ л культуральної рідини.

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

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{ф}} = \frac{960}{1 - 0,1} \approx 1077 \text{ л}$$

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

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

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1+X_{\phi}} = \frac{1077}{1+0,1} = 980 \text{ л}$$

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

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 1077 - 980 = 98 \text{ л}$$

3.2.2 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 0,2 м³

Для одержання 98 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1-E_{\text{ін}}} = \frac{98}{1-0,1} = 108 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1+X_{\text{ін}}} = \frac{108}{1+0,1} = 98 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 108 - 98 = 10 \text{ л}$$

3.2.3 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 0,02 м³

Для одержання 10 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1-E_{\text{ін}}} = \frac{10}{1-0,1} = 11 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1+X_{\text{ін}}} = \frac{11}{1+0,1} = 9,8 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 11 - 9,8 = 1,2 \text{ л}$$

Таку кількість інокуляту можна отримати на качалочних колбах. Об'єм колб 750 мл та коефіцієнт заповнення 0,2:

$$1200/750 \times 0,2 = 14 \text{ колб}$$

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері 2 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,5 буде проходити у 3 етапи. (рис 1.1)

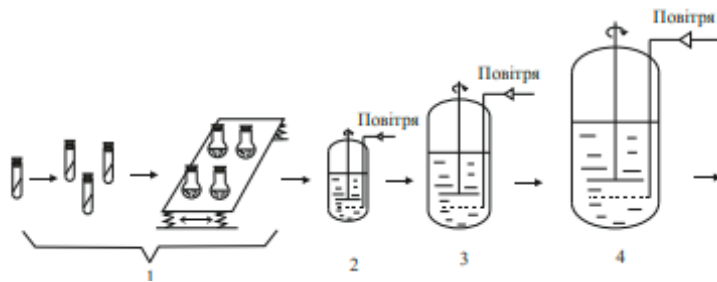


Рис.3.1 Стадії одержання посівного матеріалу для біосинтезу продуцента *Salmonella enteritidis var. Issatschenko*

3.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу біомаси *Salmonella enteritidis var. Issatschenko*. Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері об'ємом 2 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,5. [6]

Робочий об'єм ферментера ($V_{\text{роб}}$) визначають за формулою:

$$V_{\text{роб}} = V_{\text{г.ф}} \times K_{\text{зап}}$$

де: $V_{\text{г.ф}}$ – геометричний об'єм ферментера;

$K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення, 0,5.

$$V_{\text{роб1}} = 2 \times 0,5 = 1 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже для одержання 1 м^3 культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб1}} = 1 \times 0,1 = 0,1 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті об'ємом $0,2 \text{ м}^3$

Для одержання $0,1 \text{ м}^3$ культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб1}} = 0,1 \times 0,1 = 0,01 \text{ м}^3$$

Таку кількість інокуляту можна отримати культивуванням бактерій в інокуляторі об'ємом $0,02 \text{ м}^3$

Для одержання $0,01 \text{ м}^3$ культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб1}} = 0,01 \times 0,1 = 0,001 \text{ м}^3$$

Таку кількість інокуляту можна одержати при культивуванні бактерій у колбах на качалці.

Для зручності висновки стосовно кількості стадій і об'ємів підготовки посівного матеріалу представимо у вигляді таблиці 3.1:

Таблиця 3.1

Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу

Об'єм ферментера, м^3	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера	Об'єм посівного матеріалу (10%), м^3	Конденсат (10%), м^3	Об'єм підготовки поживного середовища, м^3
2	0,5	1	0,01	0,01	0,22
0,2	0,5	0,1	0,001	0,001	0,012
0,02	0,5	0,01	0,001	0,001	0,002
0,0075	0,2	0,001	-	-	0,001

Отже, вирощування інокуляту відбувається в 4 стадії:

1. вирощування в лабораторії (на скошеному агарі в пробірках і в колбах на качалці);
2. вирощування в інокуляторі об'ємом (м^3) – 0,02
3. вирощування в інокуляторі об'ємом (м^3) – 0,2
4. вирощування в ферментері об'ємом (м^3) – 2

РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

4.1 Обґрунтування до ферментаційних процесів та виробничого біосинтезу				
4.1.1 Обґрунтування умов і способу культивування <i>Salmonella enteritidis</i> var.				
Зм.	Авк.	№ документи	Підпис	Дата
Розробник	Філатова Н. В.			
Керівник	Воронцов О. О.			
Н. конто				
Консильт				
Зав. каф.	Стадніков			
РОЗДІЛ 4.1.1 Обґрунтування вибору технологічної схеми				
Літера				
Аркиш				
Аркишів				
21				
56				
Кафедра БТМ				

Оскільки оптимальною температурою для культивування аеробного штаму *Salmonella enteritidis var. Issatschenko* є 37 °С, а оптимальним значенням рН – 7-7,2, то можливий ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами, які ростуть в аналогічних температурних межах. Це зумовлює необхідність забезпечити аспетичні умови при культивуванні. Такі умови забезпечуються стерилізацією обладнання і комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря. Для запобігання контамінації створюється надлишковий тиск подачею стерильного аераційного повітря.

Культивування *Salmonella enteritidis var. Issatschenko* здійснюється у періодичному процесі, оскільки це умовно-патогенний мікроорганізм, а також через не великий об'єм ферментера, в якому було б складно реалізувати процес безперервного культивування.

У зв'язку з наведеним вище, культивування *Salmonella enteritidis var. Issatschenko* здійснюється періодично, глибинним способом. [6]

Вибір типу ферментера

Визначившись з умовами культивування *Salmonella enteritidis var. Issatschenko*, можна вибрати ферментер з відповідним оснащенням. В біореакторі обов'язково мають бути наявні такі системи: контроль температури, контроль рН, система перемішування, контроль подачі поживного середовища, контроль рівня O₂.

Зважаючи на всі вимоги умов культивування, для замовлення ферментеру можна звернутися до компанії «BIORUS®» [<https://bio-rus.ru>].

Найоптимальнішою буде модель BIORUS-SJA. Ці ферментери відрізняються великою функціональністю і підходять для різних цілей. Всі дані вимірювань і контрольні параметри відображаються на кольоровому сенсорному екрані, що істотно полегшує роботу оператора. В процесі ферментації, управління всіма параметрами здійснюється через сенсорну

панель управління. Устаткування має просту конструкцію і відрізняється стабільним функціонуванням. [19]



Рис. 4.1 Ферментер BIORUS-SJA [19]

4.1.2 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

У процесі культивування бактерій *Salmonella enteritidis var. Issatschenko* в посівному апараті і ферментері зростаюча культура аерується стерильним повітрям під надлишковим тиском 0,01 – 0,03 МПа.

Забір атмосферного повітря. При визначенні місця забору атмосферного повітря необхідно враховувати існуючі та можливі джерела газоподібних забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди та інші). Особливо багато мікроорганізмів над поверхнею землі, з висотою концентрація їх зменшується і стає постійною на рівні близько 30 м над землею, тому забір атмосферного повітря відбувається на висоті близько 15–20 м.

Грубе очищення повітря. На цій стадії на фільтрі з повітря видаляється основна маса великих фракцій та пилу. Для цього використовують фільтри попереднього очищення.

Стиснення повітря. За допомогою турбокомпресора повітря стискають до 0,35 МПа, при температурі 200 С⁰.

Охолодження повітря та видалення вологи. Після компресора повітря охолоджується в теплообміннику до температури 25 С⁰. Далі у ресивері відбувається стабілізація вологості повітря.

Підігрів повітря. Підігрів повітря відбувається в теплообміннику до температури, вищої від температури культивування на 5–10 С⁰, тобто до 45 С⁰.

Очищення повітря в головному фільтрі. Подальше очищення повітря відбувається у фільтрі з діаметром пор 1 мкм, як фільтрувальний матеріал використовують синтетичні волокна. Заміну фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. Але у разі передчасного забруднення, або зволоження чи інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову заміну.

Очищення повітря в індивідуальному фільтрі. Остання операція даної стадії – очищення повітря в індивідуальному фільтрі. Індивідуальні фільтри заповнюються надтонкими мембранами або волокнами, що забезпечує очистку повітря до ступеня у 99,9999%.

4.1.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Загальні нормативні вимоги, що пред'являються до мийних та дезінфікуючих засобів

З метою охорони безпеки життєдіяльності людини і тварин, до мийних та дезінфікуючих засобів висуваються ряд вимог:

- *Широкий спектр антимікробної дії:* дезінфекційні засоби мають бути ефективними проти всіх мікроорганізмів. Їхня дія має бути швидкою й безповоротною. Препарат не повинен бути мутагеном.
- *Безпечний для людей та тварин:* ця вимога особливо важлива при інтенсивній технології тваринництва. Засоби перевіряють на канцерогенність, тератогенність, ембріотоксичність, алергенні та кумулятивні алвстивості і тд.
- *Агресивність засобу:* бажано,щоб препарат мав мінімальний показник корозійності чи агресивності до інших матеріалів.

- *Розчинність*: засоби мають легко розчинятися у воді або утворювати стійкі емульсії.
- *Відсутність різкого запаху*
- *Стійкість*: засіб повинен бути стійким при зберіганні, використанні, придатним до транспортування
- *Активність*
- *Швидкий розпад у навколишньому середовищі*
- *Ціна і доступність*
- *Здатність не забарвлювати і не забруднювати об'єкт дезінфекції*

Критерії вибору миючого засобу

Вид миючого засобу визначає його склад та його здатність справлятися з різними типами забруднення, тому в першу чергу потрібно звернути увагу на те, який тип забруднення потрібно видалити – органічне (жири, олії, кров, цукор, білок тощо) або неорганічне (вапно, іржа, молочний камінь тощо).

➤ *З органічними забрудненнями справляються:*

Засоби на основі каустичного лугу. Основна складова подібної побутової хімії – це гідроокис натрію, з додаванням поверхнево-активних речовин, ароматизаторів та барвників.

➤ *Для боротьби з неорганічними забрудненнями підійдуть:*

Кислотні засоби. Основним елементом в їх складі є фосфорна кислота, яка при змішуванні з хлоровмісними речовинами утворює небезпечний для здоров'я газоподібний хлор. Тому, перед тим як використовувати кілька засобів, одночасно перевіряйте склад кожної упаковки.

➤ *Універсальний варіант:*

Нейтральні миючі засоби. Є сумішшю поверхнево-активних речовин універсального використання. Вони безпечніші для здоров'я людини і в залежності від складу подібного засобу зможуть впоратися з будь-яким типом забруднення. [20]

Дезінфікуючі засоби

Дезінфекція – комплекс заходів щодо знищення у середовищі життєдіяльності людини збудників інфекційних хвороб та їх переносників.

Виділяють такі методи дезінфекції:

- Фізичний
- Хімічний
- Комбінований

4.1.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Концентрація біомаси 40 г/л забезпечується за умови росту *Salmonella enteritidis var. Issatschenko* на середовищі наступного складу (г/л):

- Гідролізат рибної муки – 70;
- NaCl – 4,95

Виробничий біосинтез відбувається у ферментері 20 м³, що містить 9600 л поживного середовища. Отримання інокуляту відбувається у 4 стадії: спочатку у колбах на качалках, у інокуляторі 0,02 м³; 0,2 м³; 2 м³. Стерилізація компонентів відбувається окремо, так як NaCl має інший режим стерилізації.

Стерилізація поживного середовища для вирощування у колбах на качалках

Для отримання посівного матеріалу в колбах на качалках необхідно 980 мл поживного середовища.

- Гідролізат рибної муки – стерилізація в автоклаві, режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, P= 0,05 МПа.
- NaCl – стерилізація в автоклаві, режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, P= 0,15 МПа.

Стерилізація поживного середовища для вирощування у інокуляторі 0,002 м³

Для отримання посівного матеріалу в інокуляторі 0,2 м³ необхідно 9,8 л поживного середовища.

- Гідролізат рибної муки – стерилізація в автоклаві, режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, P= 0,05 МПа.

- NaCl – стерилізація в реакторі-змішувачі, режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, P= 0,15 МПа.

Стерилізація поживного середовища для вирощування у інокуляторі 0,2 м³

Для отримання посівного матеріалу в інокуляторі 0,2 м³ необхідно 98 л поживного середовища.

- Гідролізат рибної муки – стерилізація в автоклаві, режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, P= 0,05 МПа.
- NaCl – стерилізація в реакторі-змішувачі, режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, P= 0,15 МПа.

В стерильних умовах композицію А (рибна мука) додають до композиції Б (NaCl)

Стерилізація поживного середовища для вирощування у інокуляторі 2 м³

Для отримання посівного матеріалу в інокуляторі 2 м³ необхідно 980 л поживного середовища.

- Гідролізат рибної муки – стерилізація в інокуляторі, режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, P= 0,05 МПа.
- NaCl – стерилізація в реакторі змішувачі, режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, P= 0,15 МПа.

РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу Бактороденциду на основі бактерій *Salmonella enteritidis var. Issatschenko*

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ</i>					
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання</i>					
<i>Розробник</i>	<i>Керівник</i>	<i>Н. кантр</i>	<i>Консильт</i>	<i>Зав. каф.</i>				<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
Філатова Н. В.	Воронцов О. О.								27	56
								<i>Кафедра БТМ²⁵</i>		

Таблиця 3.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
	Повітрязабірник	1	Оснащений металевою сіткою для видалення забруднень
	Фільтр грубої очистки повітря	1	Гофрований фільтр з волокнистим фільтруючим матеріалом, витрати повітря 2380 м3/год./м2, E= 85% [21]
	Компресор	1	Гвинтовий електричний компресор Sessato CSL 10/8-200, робочий тиск 0,8 МПа [22]
	Теплообмінник-охолоджувач	1	[23]
	Теплообмінник нагрівач	1	[24]
	Ресивер	1	Поверхня виготовлена з нержавіючих марок сталі, може бути шліфована або полірована, має зовнішнє антикорозійне покриття [25]
	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтруючий матеріал – мікроскловолокно, E= 95,9995% [26]
	Реактор змішувач для приготування та змішування рибної муки (3 л)	1	Оснащений мішалкою [27]
	Реактор змішувач для приготування та стерилізації NaCl (1 л)	1	Оснащений мішалкою [27]
	Реактор змішувач для приготування та змішування рибної муки (30 л)	1	Оснащений мішалкою [27]
	Реактор змішувач для приготування та стерилізації NaCl (65 л)	1	Оснащений мішалкою [27]
	Реактор змішувач для приготування та змішування рибної муки (300 л)	1	Оснащений мішалкою [27]
	Реактор змішувач для приготування та стерилізації NaCl (650)	1	Оснащений мішалкою [27]
	Насос центробіжний	1	[28]
	Інокулятор об'ємом 0,02 м ³	1	Оснащений мішалкою, датчиками контролю температури, pH, контроль тиску [29]
	Інокулятор об'ємом 0,2 м ³	1	Оснащений мішалкою, датчиками контролю температури, pH, контроль тиску [29]
	Фільтри індивідуальної очистки	1	Ступінь очищення, E= 99,9995% [30]
	Ферментер об'ємом 2 м ³	1	Модель BIORUS-SJA, виробник «BIORUS®» [19]

РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми

Технологічна схема біосинтезу Бактороденциду включає в себе такі опоміжні роботи:

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ</i>		
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми		
<i>Розробник</i>		<i>Філатова Н. В.</i>					
<i>Керівник</i>		<i>Воронцов О.О.</i>					
<i>Н. кант</i>							
<i>Консильт</i>							
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков</i>					
					<i>Літера</i>	<i>Аркиш</i>	<i>Аркишів</i>
						28	56
					<i>Кафедра БТМ</i>		

ДР 1.1 Підготовка мийних та дезінфікувальних засобів

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.3 Підготовка технологічного обладнання

ДР 2 Підготовка аераційного повітря

ДР 3. Підготовка поживних середовищ

*Др 3.1 Підготовка середовища Мережковського для підтримання колекційної культури *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko**

Куряче яйце варять 17 хв після закипання води, очищають, відокремлюють білок від жовтка, зважують білок, подрібнюють, переносять в стерильну колбу, додають воду в співвідношенні 1:10, доводять рН до 7,2-7,4 і стерилізують при 1атм 5 хв. Підготовлене поживне середовище розливають по пробірках, стерилізують при 1 атм 20 хв і доводять рН до 7,0-7,2. Середовище Мережковського використовується для зберігання культури штаму при температурі + 4 ° С. [3]

ДР 3.2 Підготовка поживного середовища для вирощування в колбах на качалках

Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у *табл. 4.1*

Таблиця 4.1

Компоненти поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г\л	Кількість для приготування 980 мл	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
---------------------------------------	-------------------	--	-------------------	--------------------------------

		середовища, г		
Гідролізат рибної муки	70	69	А	250
Вода		180		
NaCl	4,95	4,8	Б	730
Вода		730		
Усього				980

ДР 3.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 69 г гідролізату рибної муки. Наважку поміщають у колбу об'ємом 0,75 л, додають 180 мл дистильованої води, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 112^{\circ}\text{C}$, 30 хв, $P = 0,05$ МПа.

ДР 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 4,8 г NaCl. Наважку поміщають у колбу, додають 730 мл дистильованої води, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131^{\circ}\text{C}$, 40 хв. $P = 0,15$ МПа.

ДР 3.2.3 Змішування компонентів

В стерильних умовах в колбу з композицією Б вносять композицію А та перемішують. Проводять мікробіологічний контроль (КМ) на відсутність мікробіоти.

ДР 3.3 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 0,02 м³

Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 0,02 м³ наведений у табл. 4.2

Таблиця 4.2

Компоненти поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в 0,02 м³ інокуляторі

Компонент поживного середовища	Вміст, г\л	Кількість для приготування 9,8 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Гідролізат рибної муки	70	690	А	3
Вода		2		
Конденсат		0,3		
NaCl	4,95	48	Б	6,8
Вода		6,1		
Конденсат		0,68		
Усього				9,8

ДР 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 690 г гідролізат рибної муки. Наважку поміщають у реактор змішувач об'ємом 3 л, додають 1,8 л питної води, перемішують. Стерилізують при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 хв., $P = 0,05\text{ МПа}$. Проводять мікробіологічний контроль (КМ) на відсутність мікробіоти.

ДР 3.3.2 Приготування в стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 48 г NaCl. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 6 л, додають 6,1 л питної води, вмикають перемішувальний пристрій до повного розчинення компонентів. Стерилізують в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40 хв., $P = 0,15\text{ МПа}$. Проводять мікробіологічний контроль (КМ) на відсутність мікробіоти.

ДР 3.4 Підготовка поживного середовища для інокулятора об'ємом 0,2 м³

Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі наведений у табл. 4.3

Таблиця 4.3

Компоненти поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 0,2 м³

Компонент поживного	Вміст, г\л	Кількість для приготування	Композиції	Об'єм композиції,
---------------------	------------	----------------------------	------------	-------------------

середовища		98 л середовища, кг		V, л
Гідролізат рибної муки	70	6,9	А	30
Вода		20,1		
Конденсат		3		
NaCl	4,95	0,48	Б	68
Вода		61		
Конденсат		6,8		
Усього				98

ДР 3.4.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 6,9 кг гідролізат рибної муки. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 27 л, додають 20 л питної води (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішувальний пристрій до повного розчинення компонентів. Стерилізують гострою парою при $t = 112^{\circ}\text{C}$, 30 хв., $P = 0,05$ МПа. Проводять мікробіологічний контроль (КМ) на відсутність мікробіоти. Отриманий розчин передають в інокулятор що містить композицію Б.

ДР 3.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 480 г NaCl. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 65 л, додають 61 л питної води (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішувальний пристрій до повного розчинення компонентів. Отриманий розчин передають у попередньо простерилізований інокулятор та стерилізують гострою парою при $t = 131^{\circ}\text{C}$, 40 хв., $P = 0,15$ МПа. Проводять мікробіологічний контроль (КМ) на відсутність мікробіоти.

ДР 3.5 Підготовка поживного середовища для інокулятора об'ємом 2 м^3

Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі наведений у табл. 4.4

Таблиця 4.4

Компоненти поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 2 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 980 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Гідролізат рибної муки	70	69	А	300
Вода		210		
Конденсат		30		
NaCl	4,95	4,8	Б	680
Вода		610		
Конденсат		68		
Усього				980

ДР 3.5.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 69 кг гідролізат рибної муки. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 300 л, додають 210 л питної води (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішувальний пристрій до повного розчинення компонентів. Стерилізують гострою парою при $t = 112^{\circ}\text{C}$, 30 хв., $P = 0,05$ МПа. Проводять мікробіологічний контроль (КМ) на відсутність мікробіоти. Отриманий розчин передають у ферменер що містить композицію Б.

ДР 3.5.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 4,8 кг NaCl. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 650 л, додають 610 л питної води (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішувальний пристрій до повного розчинення компонентів. Отриманий розчин передають у попередньо простерилізований ферменер і стерилізують гострою парою при $t = 131^{\circ}\text{C}$, 40 хв., $P = 0,15$ МПа. Проводять мікробіологічний контроль (КМ) на відсутність мікробіоти.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1 Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру *Salmonella enteritidis var. Issatschenko* зберігають у пробірці на середовищі Мережковського, при температурі +4 °С. Пересіви на свіже поживне середовище проводять 1-2 рази на місяць. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах. Проводять мікробіологічний контроль (КМ) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.2 Одержання робочої культури

Колекційну культуру методом виснажувального штриха пересівають на чашку Петрі з РА (рибний агар) для одержання ізольованих колоній. Культивування в термостаті при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 год. Проводять мікробіологічний контроль (КМ) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.3 Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Отримані ізольовані колонії з чашки Петрі (ТП 4.2) пересівають петлею в пробірку зі скошеним агаризованим середовищем РА (одна колонія для засіву однієї пробірки). Культивування в термостаті при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 год. Проводять мікробіологічний контроль (КМ) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 0,5 л зі стерильною композицією А (від ДР 3.2.1) зливають стерильну композицію Б, перемішують і переливають у качалочні колби об'ємом 750 мл., коефіцієнт заповнення 0,2.

У пробірку з робочою культурою *Salmonella enteritidis var. Issatschenko* (від ТП 4.2) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочці колби з поживним середовищем. Культивують на качалках (180 об/хв) при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 год. Проводять КМ на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 0,02 м³

В асептичних умовах у інокулятор об'ємом 0,02 м³ вносять стерильні композиції А (від ДР 3.3.1), вмикають перемішувальний пристрій. Через засівну колбу вносять 1,2 л посівного матеріалу від ТП 1.5. Культивують до концентрації біомаси 40 г/л при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів 180 об/хв і

постійною аерацією впродовж 24 год. Проводять мікробіологічний контроль (КМ) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.6 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 0,2 м³

У попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 0,2 м³, який містить композицію Б, вносять простерилізоване поживне середовище (від ДР 3.5.1). Вмикають перемішуючий пристрій. Через трубу перетискування з інокулятора подають інокулят від ТП 1.6. Культивують до концентрації біомаси 40 г/л при при $t = 37^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів перемішуючого пристрою 180 об/хв і постійною аерацією впродовж 24 год. Проводять КМ на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5 . Виробничий біосинтез

ТП 5.1 Виробничий біосинтез (отримання культуральної рідини)

У попередньо простерилізований ферментер об'ємом 2 м³, який містить композицію Б, вносять простерилізовану композицію А (від ДР 3.5.1). Вмикають перемішуючий пристрій і охолоджують до 37°C . Через трубу перетискування з інокулятора подають інокулят від ТП 4.7. Культивують до концентрації біомаси 40 г/л при при $t = 37^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів перемішуючого пристрою 180 об/хв і постійною аерацією впродовж 24 год. Проводять КМ на відсутність сторонньої мікробіоти. Визначають дисоціативний та токсичний індекси.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Для забезпечення відповідності готової продукції вимогам нормативної продукції. В таблиці 5.1 наведена карта контрольних точок виробництва

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Док.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ . Харак теристика цільового продукту</i>			
<i>Розробник</i>	<i>Технічний документ</i>	<i>на підприємстві забезпечують контроль процесу</i>	<i>Аналіз</i>	<i>Аналіз</i>				
<i>Керівник</i>	<i>В.П.П.П.П.П.</i>						35	56
<i>Н. конст.</i>	<i>Б.О.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>			
<i>Консульт</i>	<i>Бактеріологія</i>							
<i>Зав. каф.</i>	<i>Мікробіологія</i>							

Карта контрольних точок виробництва Бактороденциду

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт, Км 3.1.1, 3.2.1, 3.3.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А: температура, час, стерильність	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2, 3.2.2, 3.3.2 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б: температура, час, стерильність	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Км 1.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Issatschenko</i> Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	мікробіологічний контроль	Пересіви на свіже поживне середовище проводять 1-2 рази на місяць	Колекційну культуру <i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Issatschenko</i> зберігають у пробірці на середовищі Мережковського при температурі 4 °C, відсутність сторонньої мікробіоти

Км 1.2 Одержання робочої культури	Колекційна культура <i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Issatschenko</i> Морфологічна однорідність, відсутність	мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин до одержання ізольованих колоній	t = 37 °C, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 1.3 Вирощування інокуляту на агаризованому	Колекційна культура <i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Issatschenko</i>	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Км кожні 8 годин	t = 37 °C, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти

середовищі	Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій			
Кт, Км 1.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалці	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання – автоматично, мікроскопіювання кожні 8 годин	t = 37 °C, τ = 24 год, ω = 180 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 1.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 0,02 м ³	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання – автоматично, мікроскопіювання кожні 8 годин	t = 37 °C, τ = 24 год, ω = 180 об/хв, концентрація біомаси – 50 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 1.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 0,2 м ³	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання – автоматично, мікроскопіювання кожні 8 годин	t = 37 °C, τ = 24 год, ω = 180 об/хв, концентрація біомаси – 50 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 1.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 2 м ³	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання – автоматично, мікроскопіювання кожні 8 годин	t = 37 °C, τ = 24 год, ω = 180 об/хв, концентрація біомаси – 50 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

7.1 Методики контролю виробництва бактороденциду

Під час промислового виробництва Бактороденциду здійснюють періодичні відбори проб для мікробіологічного контролю поживних середовищ, посівного матеріалу, культуральної рідини під час біосинтезу, а також для контролю показників росту і біосинтезу – концентрації біомаси, кількість КУО.

Так як бактерії *Salmonella enteritidis var. Issatschenko* є патогенними для мишей та мишеподібних гризунів, обов'язково контролюють такі параметри як:

- дисоціативний і токсичний індекс;
- вірулентність [3]

Мікробіологічний контроль

Визначення відсутності мікробіоти у простерилізованих середовищах

Хід роботи

1. Відбирають пробу стерильного поживного середовища (50 мл)
2. Стерильною піпеткою відбирають 0,1 мл і наносять на МПА

3. Розподіляють по поверхні середовища стерильною бактеріологічною петлею
4. Чашки Петрі із пробою середовища поміщають у термостат при температурі 30 °С. Аналіз посівів починають з 6-8 годин

Середовище вважається стерильним якщо на чашках Петрі не спостерігається колоній мікроорганізмів. [31]

Визначення відсутності сторонньої мікробіоти на стадіях підготовки посівного матеріалу

Для визначення бактерій *Salmonella enteritidis var. Issatschenko* можна використати диференційно-діагностичне середовище.

Хід роботи

1. В асептичних умовах відбирають пробу посівного матеріалу та культуральної рідини
2. Методом виснажувального штриха висівають на чашки Петрі з агаризованим середовищем
3. Чашки Петрі поміщають у термостат та інкубують протягом 24 годин при температурі 37 °С

Після інкубації проводять мікроскопіювання мікроорганізмів з окремих колоній, що вирости на середовищі.

Диференціювати *Salmonella enteritidis var. Issatschenko* можна за такими ознаками: на рожевому кольорі середовища колонії червоного кольору діаметром 2 мм з рівними краями. [32]

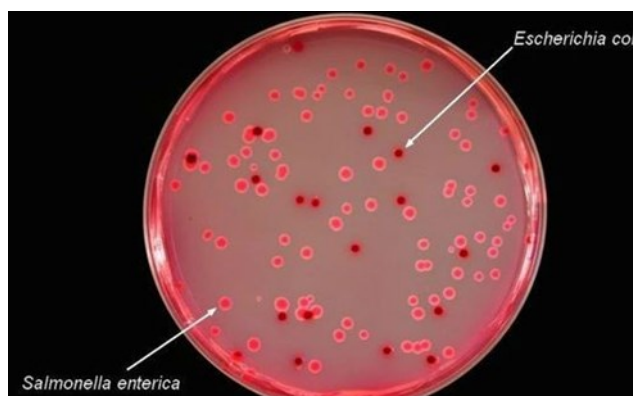


Рис. 7.1 Колонії *Salmonella enteritidis var. Issatschenko* на диференційно-діагностичному середовищі [33]

Мікроскопіювання

Готують фіксований препарат.

Хід роботи

1. На чисте знежирене предметне скло пастерівською піпеткою наносять краплю однодобової культури бактерій
2. Зразок розподіляють по предметному склу та висушують на повітрі

Далі проводять фарбування за Грамом.

Хід роботи

1. На фіксований препарат крапають краплю генцанвіолету, витримують 2 хвилини
2. Далі додають розчин Люголя, витримують 2 хв та змивають розчини водою
3. На препарат крапають краплю 96% спирту, витримують 30 секунд та змивають водою
4. Препарат обробляють розчином фуксину, витримують 1 хвилину та змивають водою
5. Препарат підсушують фільтрувальним папером та над полум'ям пальника.
6. Наносять 1-2 краплі імерсійного розчину та мікроскопіюють з об'єктивом на x90 [31]

За відсутності сторонньої мікрофлори в зразку можна побачити клітини *Salmonella enteritidis var. Issatschenko*. Грам негативні палички, розміром 1-1,5 мкм. [3]

Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси можна визначити *гравіметричним методом*.

Гравіметричний метод визначення біомаси, полягає в центрифугуванні рідкої культури протягом 30 хвилин, з наступним відділенням супернатанта, витримкою центрифугованої біомаси в сушильній шафі і зважуванням сухої маси бактерій на вагах з вирахуванням маси центрифужних пробірок. [34]

1. У чисті центрифужні пробірки ємністю 12 мл поміщають 10 мл досліджуваної суспензії клітин.
2. Пробірки центрифугують 30 хв при 3500 об/хв.
3. В пробірку додають 9 мл дистильованої води і центрифугують повторно
4. Пробу висушують безпосередньо в центрифужній пробірці
5. Пробірки зважують та на підставі різниці між масою вихідної пустої пробірки та масою пробірки заповненою висушеними клітинами, роблять висновок про концентрацію біомаси

Визначення кількості КУО

Кількість КУО визначають методом послідовних розведень з подальшим висівом на агаризоване середовище. З досліджуваного матеріалу готують ряд послідовних десятиразових розведень на стерильному рідкому живильному середовищі в пробірках ($10^{-1} \dots 10^{-10}$) [35]

1. Досліджуваний матеріал в невеликій кількості вносять до пробірки з рідким поживним середовищем, перемішують,
2. Потім краплю живильного середовища переносять в другу пробірку і т.д.
3. Вміст кожної пробірки виливають в стерильні чашки Петрі, після посіви поміщають в термостат.

Дисоціативний і токсичний індекси штаму визначали за допомогою реакції аглютинації з 0,1% водним розчином трипафлавіну.

Для визначення **дисоціативного індексу**:

1. На РА висівають культуру в чашки Петрі
2. Чашки Петрі поміщають у термостат і культивують протягом 24 годин при $t = 37^{\circ}\text{C}$
3. Після добового росту проводять аглютинацію ізольованих колоній і підраховують число колоній, аглютинуючих з розчином трипафлавіну, тобто визначають відсоток колоній в R-формі.

Для визначення **токсичного індексу**:

1. Культуру висівають на РА в чашки Петрі

2. Чашки Петрі поміщають у термостат і культивують протягом 24 годин при $t = 37^{\circ}\text{C}$
3. Після добового росту проводять аглютинацію ізольованих колоній і підраховують число колоній, що не аглютинують з розчином трипафлавіну, тобто визначають відсоток колоній в S-формі.

Вірулентність визначають по ЛД50 для білих мишей:

1. Вирощують на РБ в термостаті протягом 24 годин при $t = 37^{\circ}\text{C}$
2. Готують наступні розведення, що містяться в 1 мл: 50 млн, 5 млн, 500000, 50000, 5000 бактерій.
3. У дослідах використовують білих мишей вагою 16-18 г, на кожен варіант досліду беруть по 6 гризунів.

Гризунів заражають *per os* (шматочок білого хліба просочують 1 мл культуральної рідини відповідного розведення). Загибель мишей враховують протягом 14 діб. [3]

ВИСНОВКИ

1. Бактороденцид – мікробіологічний препарат родентицидній дії, який застосовується для боротьби з гризунами. Основою цього препарату є *Salmonella enteritidis var. Issatschenko*.
2. При виборі біологічного агента була проведена порівняльна характеристика різних мікроорганізмів. В ній було наведено параметри, на основі яких і був обраний найкращий продуцент. Оцінюючи всі дані, біологічним агентом обрано *Salmonella enteritidis var. Issatschenko*.

Обрані умови та спосіб культивування *Salmonella enteritidis var. Issatschenko* – періодичне культивування глибинним способом.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ</i>						
<i>Зм</i>	<i>Апк</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>							
<i>Розробник</i>	3	<i>Ф</i>			<i>Висновки Література</i>			<i>шіт</i>			
<i>Керівник</i>		<i>Воронцов О. О.</i>						41	56		
<i>Н. контр</i>								<i>Кафедра БТМ</i>			
<i>Консульт</i>											
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков</i>									

4. Виконані розрахунки щодо потреби у цільовому продукті. Проведені розрахунки потужності виробництва препарату.
5. Наведений опис технологічної схеми, яка включає в себе підготовку до виробничого біосинтезу та всі етапи культивування та специфікація обладнання.
6. Описані методи контролю виробництва. Контролю піддаються такі параметри як: концентрація біомаси, кількість КУО, дисоціативний та токсичний індекс, продуктивність та вірулентність.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Как бороться с мышевидными вредителями? [Електронний ресурс]
Режим доступу: <https://www.epravda.com.ua/rus/press/2010/12/8/261119/>
2. Стаття:Ассортимент родентицидов снова пополнился бактороденцидом/
А.А. ЯКОВЛЕВ, Н.В. БАБИЧ
3. Патент на изобретение № 2520161 Штамм бактерий *Salmonella enteritidis* var. *issatschenko* 32/3 в качестве средства для получения биологической приманки против мышевидных грызунов/ Тихонович И. А., Гришечкина С. Д., Романова Т. А., Минина Г. Н., Бологова Е. В., Ермолова В. П.

4. Культуральная среда и способ идентификации грамотрицательных микроорганизмов/ Зубенко Р. И.
5. Влияние способов культивирования на выход бактериальной массы и качество вакцин для ветеринарной медицины/ А. Я. Самуйленко, А. А. Раевский, И. В. Павленко, Н. К. Еремец, И. В. Бобровская, З. А. Канарская, А. В. Канарский
6. Оптимізація умов культивування сальмонел в ферментерах барботажного комплексу/ О. С. Багаева, О. В. Везенко, О. К. Багаев, Т. О. Беляева, О. М. Полтавський, В. Г. Коритнянська, Т. В. Гудзенко
7. М. Ю. Абрамчук, Н. А. Антонюк, Місце і роль біотехнологій в еколого-економічному розвитку суспільства – 45-48 с.
8. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 12 с.
9. Бактороденцид [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://agrarii-razom.com.ua/active-ingredients/salmonella-enteritidis-var-issatschenko-k-28>
10. Рис 1.1 Бактороденцид [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://gosagro.com/product/pestitsidy/baktorodentsid/>
11. Рис. 2.1 *Salmonella Enteritidis* micrograph [Електронний ресурс] Режим доступу <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-micrographs/gram-stain/gram-negative/salmonella.html>
12. Рис. 1.2 Transmission Electron Microscope images of untreated *Salmonella Enteritidis* [Електронний ресурс] Режим доступу https://www.researchgate.net/figure/Transmission-Electron-Microscope-images-of-A-untreated-Salmonella-Enteritidis-A1-A2_fig1_270514434
13. Пирог, Т.П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. і перероб. / Т.П. Пирог. – К. :НУХТ, 2010.
14. Посівні площі під урожай 2020 року [Електронний ресурс] Режим доступу: http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2019/sg/ppsgk/arh_ppsgk_u.html

15. «Біотехніка» Бактороденцид БТ - біопрепарат, призначений для боротьби з гризунами [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://biotekhnika.od.ua/uk/produksiia/mikrobiolohichni-preparaty/baktorodentsyd-bt>
16. Бактороденцид биородентицид [Електронний ресурс] Режим доступу: https://fazenda.net.ua/katalog-tovarov/sredstva-zashhityi/fumiganty-i-rodenticidy/baktorodencid-biorodenticid/?gclid=CjwKCAjw7--KBhAMEiwAxfkWI3eIvuadfGy7kPPS0E-ZZizcpY1wyx-X4QivtyO1YXx-jlW4a7gUhoCqFsQAvD_BwE
17. Винницкая районная биологическая лаборатория. Бактороденцид [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://biovin.com.ua/ru/produkcija/baktorodencid/>
18. Форсагро. Бактороденцид препарат для борьбы с грызунами [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://forceagro.com.ua/product/baktorodenzid/>
19. Пилотный ферментер серии BIORUS-SJA [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/pilotnyie-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus/pilotnyie-fermenteryi.html>
20. Класифікація миючих засобів [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://vitus-lviv.com.ua/ru/novynu/klasyfikatsiya-myyuchyh-zasobiv>
21. Фільтр гофрований ФВГ [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://tehnofilter.ub.ua/goods/view/270618/all/filtr-gofrovaniy-fvg/>
22. Винтовой электрический компрессор Сeccato CSL 10/8-200 [Електронний ресурс] Режим доступу: https://aerocompressors.ru/katalog_produkcii/kompressori/vintovye_elektricheskie_kompressory/kompressory_ceccato/seriya_csl/csl_versiya_na_resivere/csl_108200/
23. ПРОМЫШЛЕННЫЕ ТЕПЛООБМЕННИКИ ООО «ТАПФЛО» [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://tapflo.ua/products/teploobmenniki>

24. Теплообмінник-нагрівач [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://bsx.com.ua/ua/cabel/sistemy-obogreva/nagrevatelnye-agregaty-promyshlennye-teploobmenniki/>
25. Ресивер [Електронний ресурс] Режим доступу:
<http://harprom.com/shop/resiver-zvarniy-staleviy-gor/>
26. Фільтр тонкої очистки: [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://tehnofilter.ub.ua/goods/view/6364274/all/filtr-tonkogo-ochishchennya-povitrya-ftov-nera-hepa/>
27. Реактор-змішувач [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://prom.ua/p133670647-emkosti-smesiteli-reaktory.html?&primelead=MQ>
28. Насос центробіжний [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://ascopumps.com.ua/pumps/tsentrobezhnye/odnostupenchatye/monoblochnye.html>
29. Інокулятор [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://biorus.ru/oborudovanie/emkosti-pishhevoe-i-farmaczevticheskoe-ispolnenie.html>
30. Фільтр індивідуальний [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://tehnofilter.ub.ua/goods/view/6364276/all/filtr-tonkogo-ochishchennya-povitrya-ftov-m-nera-hepa/>
31. МІКРОБІОЛОГІЯ. Методичні рекомендації/ І.І. Білоконов, Д.М. Грінченко
32. Культуральная среда и способ идентификации грамотрицательных микроорганизмов/ Журбенко Р. И. [Електронний ресурс] Режим доступу:
<http://www.freepatent.ru/patents/2286392>
33. Рис. 5.1 Salmonella Enteritidis micrograph [Електронний ресурс] Режим доступу <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-micrographs/gram-stain/gram-negative/salmonella.html>
34. Гравіметричний метод [Електронний ресурс] Режим доступу:
https://studbooks.net/1254680/ekologiya/kultivirovaniya_mikroorganizmov
35. Получение чистой культуры сапрофитных бактерий/ И. А. Тарасова, М. В. Ковальская

Додаток 1



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013113976/10, 22.03.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.03.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.03.2013

(45) Опубликовано: 20.06.2014 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2077204 С1Б 20.04.1997.
КАНДЫБИН Н.В., Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми. Теория и практика, М, Агропромиздат, 1989, 176 стр. КАНДЫБИН Н.В., ДОРОДНЫХ Ю.Л., Бактороденцид-достоинная альтернатива химическим родентицидам

Адрес для переписки:

191186, Санкт-Петербург, а/я 142, Патентному поверенному РФ, Петровой Т.В.

(72) Автор(ы):

Тихонович Игорь Анатольевич (RU),
Минина Галина Николаевна (RU),
Бологова Елена Викторовна (RU),
Ермолова Валентина Павловна (RU),
Гришечкина Светлана Денисовна (RU),
Романова Татьяна Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной
микробиологии Российской академии
сельскохозяйственных наук (ГНУ
ВНИИСХМ Россельхозакадемии) (RU)

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ SALMONELLA ENTERITIDIS VAR.ISSATSCHENKO 32/3 В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРИМАНКИ ПРОТИВ МЫШЕВИДНЫХ ГРЫЗУНОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к микробиологическим средствам борьбы с вредными мышевидными грызунами. Штамм бактерий Salmonella enteritidis var. Issatschenko 32/3, депонированный в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии под

регистрационным номером RCAM 00149, обладает выраженными патогенными свойствами против мышевидных грызунов. Эффективность биоприманки, полученной на основе штамма бактерий Salmonella enteritidis var. Issatschenko 32/3 и зерна, в зерно-овощехранилищах и теплицах составила по отношению к серой крысе и мыши домовой более 90%. 1 табл.

RU 2 5 2 0 1 6 1 C 1

RU 2 5 2 0 1 6 1 C 1

Антибиотических веществ и пигментов не образует.

Серологические свойства

По схеме Кауфмана-Уайта относится к серологической группе Д, имеет соматические О-антигены (рецепторы 1,9,12) и жгутиковые Н-антигены (рецепторы g и m).

5 Хранение культуры

Культура хранится на среде Мережковского (водная суспензия 10%-ного вареного белка куриного яйца) при +4°C, пересевы проводят каждые 1,5-2 месяца; либо методом криоконсервирования в лиофильно-высушенном состоянии в запаянных ампулах.

10 Штамм 32/3 характеризуется широким спектром действия на мышевидных грызунов.

Экспериментально было установлено, что многие виды грызунов высоковосприимчивы к бактерии этого штамма, в т.ч.: домовая мышь, курганчиковая мышь, мышь-малютка, обыкновенная полевка, общественная полевка, полевка Брандта, малоазийская кустарниковая полевка, темная полевка, стадная полевка, степная пеструшка, рыжая лесная полевка, водяная полевка, серый хомячок, обыкновенная слепушонка, а также

15 серая крыса.

Были проведены лабораторные опыты по определению производственных показателей заявляемого штамма *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko* 32/3 и штамма-прототипа *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko* 29/1: диссоциационного и токсического индексов, продуктивности и вирулентности.

20 Диссоциационный и токсический индексы штамма определяли с помощью реакции агглютинации с 0,1%-ным водным раствором трипафлавина.

Для определения диссоциационного индекса на РА высевали 10-суточную бульонную культуру на РА в чашки Петри, после суточного роста проводили агглютинацию изолированных колоний (100 шт.) и подсчитывали число колоний, агглютинирующих с раствором трипафлавина, т.е. определяли процент колоний в R-форме.

25 с раствором трипафлавина, т.е. определяли процент колоний в R-форме.

Для определения токсического индекса 1 - суточную бульонную культуру высевали на РА в чашки Петри, после суточного роста проводили агглютинацию изолированных колоний (100 штук) и подсчитывали число колоний, не агглютинирующих с раствором трипафлавина, т.е. определяли процент колоний в S-форме.

30 Для определения продуктивности штамм инкубировали на РБ в термостате. Через 24 часа роста при температуре 37°C определяли количество микробных клеток в 1 мл культуральной жидкости чашечным методом.

Вирулентность определяли по ЛД₅₀ для белых мышей.

35 Штамм выращивали на рыбном бульоне (РБ), определяли титр культуральной жидкости и готовили следующие разведения, содержащиеся в 1 мл: 50 млн, 5 млн, 500000, 50000, 5000 бактерий. В опытах использовали белых мышей весом 16-18 г, на каждый вариант опыта брали по 6 грызунов. Грызунов заражали per os (кусочек белого хлеба пропитывали 1 мл бульонной культуры соответствующего разведения). Гибель мышей учитывали в течение 14 суток.

40 ЛД₅₀ высчитывали по формуле Кербера (см., например, журнал «Актуальные вопросы ветеринарной медицины», 2005 г., УДК 619:616.33-002, статья С.А. Донкова (ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН) «Применение формул электронных таблиц MS. EXSEL для обработки данных при изучении патогенных свойств микроорганизмов»):

45 $\lg Ld_{50} = \lg D_N - \delta(\sum L - 0,5),$

где D_N - величина дозы максимальная;

δ - логарифм кратности разведений;

L - отношение числа животных, погибших от введения данной дозы, к общему числу

животных, которым эта доза была введена;

ΣL - сумма значений L, найденных для всех испытаний доз.

Результаты полученных производственных показателей штаммов бактерий *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko* - заявляемого (32/3) и прототипа (29/1) представлены в таблице 1.

Штамм <i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Issatschenko</i>	Диссоциационный индекс, %	Токсический индекс, %	Продуктивность (титр бактерий в КЖ), млн/мл	Вирулентность ЛД ₅₀ , микробные клетки
29/1	5,0	98,0	600-710	315500
32/3	2,0	100,0	900-1000	175000

Как видно из таблицы 1, заявляемый штамм бактерий *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko* 32/3 более устойчив к диссоциации, т.к. его диссоциационный индекс в 2,5 раза меньше, чем у штамма 29/1, токсический индекс - выше, продуктивность - выше в 1,5 раза, а вирулентность выше, чем у штамма-прототипа, в 1,8 раза. Это позволяет сделать вывод о более высокой эффективности заявляемого штамма бактерий *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko* 32/3 по сравнению с прототипом - штаммом бактерий *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko* 29/1.

Пример получения препарата - биоприманки для мышевидных грызунов на основе штамма бактерий *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko* 32/3: зучения биопрепарата заключается в последовательном размножении бактерий сначала на жидкой среде, затем на зерновой основе.

Приготовление среды Мережковского (жидкая)

Доброкачественное куриное яйцо варят вкрутую (17 мин после закипания воды), очищают от скорлупы, отделяют белок от желтка, взвешивают белок, измельчают, переносят в стерильную колбу, добавляют воду в соотношении 1:10, доводят рН до 7,2-7,4 и стерилизуют при 1 атм 5 мин. Подготовленную питательную среду разливают по пробиркам (5-6 см³ в пробирке), стерилизуют при 1 атм 20 мин и доводят рН до 7,0-7,2. Среда Мережковского используется для хранения культуры штамма при температуре при +4°C.

Приготовление рыбного бульона (РБ)

15 г готового сухого питательного бульона (гидролизат кильки 10,05 г; натрия хлорид 4,95 г) вносят в 1 л дистиллированной воды, тщательно встряхивают, кипятят 2 мин, фильтруют через бумажный фильтр и разливают по 10 мл в стерильные пробирки или по 400 мл в колбы Эрленмейера емкостью 750 мл, стерилизуют при 1 атм 20 мин. Доводят рН после стерилизации до 7,0-7,2.

Получение культуры 1-й генерации

Стерильную жидкую питательную среду (рыбный бульон) засевают культурой, хранящейся в пробирках на среде Мережковского из расчета 1 мл культуры на 250 мл бульона. Культуру штамма выращивают в термостате при 37°C в течение 24 часов. Титр культуральной жидкости (КЖ) определяют общепринятым методом серийных разведений с последующим высевом на РА. Титр КЖ 1-й генерации должен быть не меньше 200 млн кл/мл.

Получение культуры 2-й генерации

Для получения более высокого титра культуру штамма 1-й генерации пересевают еще раз на жидкий питательный бульон из расчета 1-2% от объема среды. Колбы с засеянной культурой помещают в термостат с температурой 37°C. Через 24 часа

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 286 392** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) МПК
C12Q 1/04 (2006.01)
C12R 1/04 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)
C12R 1/22 (2006.01)
C12R 1/37 (2006.01)
C12R 1/185 (2006.01)
C12R 1/42 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003109616/13, 24.08.2001
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.08.2001
(30) Конвенционный приоритет:
07.09.2000 (пп.1-8) CU 195/2000
(43) Дата публикации заявки: 10.12.2004
(45) Опубликовано: 27.10.2006 Бюл. № 30
(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 9630543 A, 03.10.1996. US 5194374
A, 16.03.1993. ES 2079319, 01.01.1996. МОРОЗ
А.Ф. и др. Бактериологическая диагностика
неферментирующих грамотрицательных
бактерий. Вопросы физиологии, метаболизма и
идентификации микроорганизмов. Сборник
научных трудов, Москва, 1987, с.66-69.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
07.04.2003
(86) Заявка РСТ:
CU 01/00006 (24.08.2001)
(87) Публикация РСТ:
WO 02/20829 (14.03.2002)
Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):
РОДРИГЕС МАРТИНЕС Клаудио (CU),
КЕСАДА МУНЬИС Вивиан де Хесус (CU),
ЖУРБЕНКО Раиса (CU)
(73) Патентообладатель(и):
СЕНТРО НАСЪОНАЛЬ ДЕ БИОПРЕПАРАДОС
(CU)

RU 2 286 392 C2

RU 2 286 392 C2

(54) КУЛЬТУРАЛЬНАЯ СРЕДА И СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ

(57) Реферат:
Изобретение относится к биотехнологии, в
частности к культуральной среде, используемой в
способе идентификации грамотрицательных
микроорганизмов. Культуральная среда содержит
смесь соединений, которые обеспечивают
проявление различных цветов и размеров гало,
состоящую из кремнезема, обезжиренного молока,
крахмала и микробиологического активированного
угля. Кроме того, культуральная среда включает
смесь питательных веществ, веществ, которые
гарантируют появление различного окрашивания

колоний, веществ, которые гарантируют
ингибирование грамположительных
микроорганизмов, а также веществ,
обеспечивающих наличие твердой матрицы для
роста и развития колоний. Способ основан на
дифференциации микроорганизмов, по меньшей
мере, по 10 характерным цветам колоний
правильной и неправильной формы и, по меньшей
мере, по 5 различающимся характерным цветам и
размерам гало. Изобретение позволяет
идентифицировать одновременно несколько видов
микроорганизмов. 2 н. и 6 з.п. ф-лы, 8 табл.

<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	Розовый	Голубой	Нестандартные края
--------------------------------------	---------	---------	-----------------------

Формула изобретения

- 5 1. Культуральная среда для идентификации грамотрицательных микроорганизмов, содержащая следующие количества компонентов на 1 л дистиллированной или деионизированной воды:
- смесь соединений, которые обеспечивают проявление различных цветов и размеров гало, состоящая из кремнезема, обезжиренного молока, крахмала и микробиологического
- 10 активированного угля, содержащееся в среде, количество которой составляет от 8 до 20 г/л, и, в частности, количество каждого компонента составляет: кремнезем от 2 до 10 г/л, обезжиренное молоко от 2 до 20 г/л, крахмал до 4 г/л, микробиологический активированный уголь до 4 г/л;
- а также смесь питательных веществ в количестве от 10 до 38 г/л, которая состоит из
- 15 пептона от 2 до 15 г/л, триптона от 2 до 15 г/л, дрожжевого экстракта от 2 до 8 г/л; вещества, обеспечивающие проявление различных цветов колоний; вещества, обеспечивающие ингибирование грамположительных организмов, и вещества, обеспечивающие твердую матрицу в дистиллированной или деионизированной воде для роста и развития колоний.
- 20 2. Культуральная среда по п.1, где вещество, обеспечивающее проявление различных цветов колоний, выбрано из группы, включающей пропиленгликоль, который применяют в количестве от 5 до 15 мл/л;
- нейтральный красный, который применяют в количестве до 0,05 г/л; фенол красный, который применяют в количестве до 0,05 г/л; фуксин-глюкуроид, который применяют в
- 25 количестве от 0,05 до 0,25 г/л; X-gal, который применяют в количестве от 0,03 до 0,1 г/л и MUG, который применяют в количестве до 0,07 г/л.
3. Культуральная среда по п.1, где вещества, обеспечивающие ингибирование грамположительных организмов, находятся в количестве от 0,1 до 1 г/л, предпочтительно является дезоксихлорат натрия.
- 30 4. Культуральная среда по п.1, где вещества, обеспечивающие твердую матрицу для роста и развития колоний, находятся в смеси с соединениями, которые обеспечивают проявление различных цветов и размеров гало, в частности кремнезема, обезжиренного молока, крахмала и микробиологического активированного угля, в соотношении от 0,75:1 до 2:1.
- 35 5. Способ идентификации грамотрицательных микроорганизмов, включающий инокулирование и инкубацию образцов микроорганизмов в культуральной среде по п.1, при этом идентификацию интересующих микроорганизмов проводят по меньшей мере по 10 характерным цветам колоний правильной и неправильной формы и по меньшей мере по 5 различающимся характерным цветам и размерам гало.
- 40 6. Способ по п.5, где идентификацию различных организмов осуществляют следующим образом:
- E.coli* по фиолетово-голубому цвету интересующих колоний и голубому гало и оранжевому цвету среды и, в определенных случаях, по флуоресценции голубого цвета;
- 45 *E.coli* 0157:H7 по синевато-фиолетовому или зеленоватому цвету колоний и розовому цвету среды;
- Shigella sonnei* по красновато-фиолетовому цвету колоний, очень неровным краям и желтому гало;
- Shigella flexneri* по окраске от оранжевой до желтой полупрозрачных колоний, наличию мукоидных колоний и по окраске от оранжевой до желтой среды;
- 50 *Pseudomonas aeruginosa* по оранжево-розовому цвету колоний, полупрозрачному гало и зеленоватой флуоресценции в течение 24 ч и зеленоватому цвету через 24 ч;
- Klebsiella pneumoniae* по красновато-фиолетовому цвету колоний, наличию мукоидных колоний с розово-бежевым гало, в ряде случаев;

Serratia odorifera и *Serratia marcescens* по зеленовато-фиолетовому цвету колоний и полупрозрачному очень небольшому гало;

Proteus mirabilis, *Proteus vulgaris* и *Providencia* spp. по бесцветным маленьким колониям и оранжевому цвету среды;

5 *Salmonella enteritidis* по красному цвету колоний с ровными краями;

Salmonella choleraesuis по красному цвету колоний с неровными краями;

Salmonella typhimurium по красному цвету колоний и гало различных оттенков оранжевого цвета;

10 *Salmonella schotmuelleri* по оранжевому цвету полупрозрачных колоний и по окраске от оранжевого до желтого среды;

Salmonella typhi по оранжевому цвету колоний и желтому цвету среды;

Enterobacter aerogenes и *E.coli* по светло-фиолетовому или зеленовато-фиолетовому цвету колоний с более интенсивным фиолетовым окрашиванием в центре;

15 *Citrobacter freundii* по темно-фиолетовым мелким колониям с интенсивным фиолетовым окрашиванием в центре;

Aeromonas hydrophila по появлению колоний светло-зеленого цвета и широкого полупрозрачного гало.

7. Способ по п.5, где идентификацию различных организмов при использовании фенолового красного проводят следующим образом:

20 *E.coli* по синему цвету колоний и розовому цвету среды, а в случае использования MUG по флуоресценции голубого цвета;

Shigella sonnei по синему цвету колоний с неровными краями и землянично-розовой окраске;

25 *Pseudomonas aeruginosa* по зеленовато-бежевому цвету колоний и розовому цвету среды;

Salmonella typhimurium по бежевому или бесцветному цвету колоний и клубнично-розовому цвету среды.

8. Способ идентификации грамотрицательных микроорганизмов по п.5, где культуральную среду по п.1 получают путем смешивания 30-50 г сухих ингредиентов среды с 1 л дистиллированной или деионизированной воды, перемешивания, кипячения до полного расплавления агара, охлаждения до 45-50°C, с последующими добавлением пропиленгликоля в количествах от 5 до 15 мл, перемешиванием и распределением по чашкам Петри при постоянном перемешивании, после чего проводят инокулирование и инкубирование образцов микроорганизмов при температуре от 30 до 45°C до 18 ч и, наконец, проводят их идентификацию и дифференциацию по цвету колоний или центра колоний, гало, по виду краев и, в некоторых случаях, по цвету среды.

40

45

50

УДК 619: 576. 852. 17

А. Я. Самуйленко, А. А. Раевский, И. В. Павленко, Н. К. Еремец,
И. В. Бобровская, З. А. Канарская, А. В. Канарский

ВЛИЯНИЕ СПОСОБОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ВЫХОД БАКТЕРИАЛЬНОЙ МАССЫ И КАЧЕСТВО ВАКЦИН ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ

Ключевые слов: бактерии, периодическое и непрерывное культивирование, мембранный биореактор, иммуногенные свойства вакцины.

Установлена целесообразность культивирования бактерий пастерелл и сальмонелл для получения вакцин с лучшими иммуногенными свойствами управляемыми периодическим и непрерывным способами в мембранном биореакторе. Показана возможность создания мембранного биореактора на базе традиционного биореактора с использованием ультрафильтрационной установки.

Key words: bacteria, periodic and continuous cultivation, membrane bioreactor, the immunogenic properties of the vaccine.

The expediency of cultivating bacteria Pasteurella and Salmonella for the production of vaccines with the best immunogenic properties controlled batch and continuous processes in a membrane bioreactor. The possibility of creating a membrane bioreactor based on the traditional bioreactor using an ultrafiltration unit.

Актуальность. Основой производства бактериальных препаратов, предназначенных для специфической профилактики инфекционных заболеваний бактериальной этиологии, является культивирование микроорганизмов. Теоретическое и экспериментальное обоснование методов и параметров культивирования микроорганизмов, обеспечивающих воспроизводимое получение популяций с определенными свойствами, всегда привлекали внимание исследователей [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. Именно на этой технологической стадии производства вакцин происходит синтез антигенов, от которых зависит эффективность иммунных препаратов. При культивировании микроорганизмов одновременно стремятся к увеличению выхода биомассы и сохранению биологических свойств бактерий [2, 3, 7]. Для этого необходима организация управляемого культивирования микроорганизмов, позволяющая создавать и длительное время поддерживать культуры с постоянной и точно определенной концентрацией биомассы, фазой и скоростью роста [7, 8, 9, 10, 11, 12, 15].

В этой связи разработка современных способов культивирования патогенных микроорганизмов имеет важное прикладное значение в биотехнологии производства противобактериальных препаратов. В настоящее время получение бактериальной массы для вакцин от болезней сельскохозяйственных животных основано на периодическом способе глубинного культивирования микроорганизмов [3, 5, 6, 7, 8].

Стратегия разработки условий культивирования должна включать:

- выбор, поддержание и сохранение штаммов микроорганизмов; подбор питательных сред;
- оптимизацию периодического культивирования, направленную на сокращение длительности лаг-фазы, увеличение экспоненциальной фазы и числа жизнеспособных клеток;
- получение бактериальной массы с заданными свойствами;
- изучение возможности применения перспективных методов культивирования.

До настоящего времени в производстве биопрепаратов, в том числе и на стадии их разработки в

лабораторных условиях, широкое применение находит периодическое глубинное культивирование патогенных микроорганизмов [4, 10].

При культивировании получают бактериальную культуру, включающую клетки микроорганизмов, остатки питательных веществ, различные внеклеточные продукты метаболизма и др. Для получения концентрированной микробной биомассы используют различные методы: флотацию, сепарирования, фильтрацию, экстракцию, ионный обмен, адсорбцию, кристаллизацию, мембранные методы и др. Как правило, технология выделения и очистки продукта включает несколько стадий. В связи с этим весьма актуальной задачей при производстве бактериальных вакцин является разработка технологии концентрирования бактерий, применение которой способствует увеличению выхода конечного продукта и получению качественных биопрепаратов.

Наиболее простым в технике исполнения и перспективным с точки зрения расширения возможностей управления процессом является мембранный биореактор (МБР), в котором развитие популяции происходит в постоянно обновляемой среде. Это обновление осуществляется за счет постоянной или циклической подпитки субстратом и постоянного удаления метаболитов, всех или части, через полупроницаемую мембрану [11, 12, 13, 14, 16]. Сочетание ферментера с мембранным разделителем для удаления продуктов метаболизма бактерий увеличивает концентрацию клеток и продлевает длительность активной фазы роста за счет уменьшения ингибирующего эффекта. Кроме того, использование мембранного биологического реактора (МБР) дает возможность получать положительный эффект и за счет подвода питательных веществ в культуральную жидкость через полупроницаемую мембрану [16, 17, 18, 19, 20, 21, 22].

Цель настоящей работы – изучение влияния способов культивирования на выход бактериальной массы и качество вакцин для ветеринарной медицины

В работе определяли влияние периодического способа культивирования бактерий и продленного способа культивирования бактерий с использованием

мембранного биореактора на выход бактериальной массы и качество вакцин для ветеринарной медицины.

Материалы и методы

В исследованиях использовали бактерии *Salmonella cholerae suis* № 370 и *Salmonella typhimurium* № 415, *Pasteurella multocida* штаммы Пастеровский, АВ и К Краснодарской НИВС, применяемые при производстве живых сухих вакцин против пастереллеза птиц, а также штаммы А - 8683, В-681 и Д - Т - 80, применяемые при производстве вакцины против пастереллеза свиней.

Культивирование сальмонелл и пастерелл проводили на питательной среде, основой которых являлся перевар Хоттингера (%):

- пептон – 0,5;
- натрий хлористый – 0,3;
- двузамещенный фосфат натрия – 0,5.

Перевар Хоттингера, разведенный дистиллированной водой до - 100,0; содержание аминного азота 185 - 200 мг %, рН готовой среды – 8,0 - 8,2. Перед засевом в среду добавляли 0,1 % глюкозы в пересчете на сухое вещество в виде 40 % раствора. Культуру сальмонелл и пастерелл выращивали в пробирках и флаконах на шуттель-аппарате, а также в ферментере АНКУМ-2М емкостью 3 и 10 литров, которые оснащены системами автоматического контроля и регулирования основных параметров культивирования (температура, рН, рО₂, еН, расход воздуха на аэрацию, число оборотов перемешивающего устройства и оптическая плотность бактериальной суспензии). Для пеногашения при интенсивном росте бактерий в биореакторах применяли пропинол Б - 400.

Мембранный биологический реактор реализован с использованием ферментера Ф - 10 аппаратуры для непрерывного культивирования типа АНКУМ - 2М с вынесенной мембранной установкой для ультрафильтрации. В качестве мембранного разделителя использовали ультрафильтрационный модуль из полупроницаемых мембран в виде полых волокон из ароматического полиамида типа ВПУ - 15ПА с площадью фильтрационной поверхности 1 м².

Представленная на рисунке 1 технологическая схема пригодна для культивирования бактерий периодическим и непрерывным способами с отделением продуктов метаболизма, растворенных в культуральной жидкости, подачей биомассы на дальнейшую переработку с получением вакцин и подачей фильтрованной питательной среды в биореактор. Кроме того, на начальной стадии культивирования бактерий возможно интенсивное их накопление в биореакторе путем концентрирования биомассы бактерий с отбором продуктов метаболизма из культуральной жидкости, возврате концентрированной биомассы в биореактор и подачей фильтрованной питательной среды в биореактор.

Морфологические и биохимические свойства бактерий определяли стандартными методами. Жизнеспособность бактерий определяли методом КОЕ. Продолжительность фаз роста, максимальной удельной скорости роста, минимальной продолжительности удвоения (генерации) культур определяли

графическим методом.

Результаты и обсуждение

Культивирование бактерий в лабораторных условиях. Критерием оптимизации периодического способа культивирования бактерий является получение максимального количества живых клеток [18]. Ниже представлены результаты исследований, проведенных с *Pasteurella multocida* штамм Пастеровский, который используют при производстве живой вакцины в промышленных условиях.

Для экспериментов с центром в точке, в которой получено наилучшее накопление по оптической концентрации, выбран план 2-го порядка для двух факторов: X₁ - парциальное давление кислорода (рО₂) и X₂ - рН. Шаги варьирования ΔX₁ = 5 % нас., ΔX₂ = 0,4 ед рН. Эксперименты проводили методом острых опытов при культивировании пастерелл в течение 1 час. Матрица планирования и полученные результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Матрица планирования и результаты эксперимента по рототабельному плану второго порядка

№ опытов	значение уровней варьирования переменных				У*, мл/мл
	в кодированных ед.		в натуральных ед.		
	X ₁	X ₂	\bar{X}_1 , % нас	\bar{X}_2 , ед.рН	
1	-	-	30	7,6	0,22
2	+	-	40	7,6	0,26
3	-	+	30	8,4	0,27
4	+	+	40	8,4	0,23
5	-R*	0	28	8,0	0,24
6	+R	0	42	8,0	0,22
7	0	-R	35	7,4	0,16
8	0	+R	35	8,6	0,21
9	0	0	35	8,0	0,32
10	0	0	35	8,0	0,31
11	0	0	35	8,0	0,30
12	0	0	35	8,0	0,32
13	0	0	35	8,0	0,32

* У - концентрация жизнеспособных бактерий.

**R = 1,414 коэффициент плеча «звездной» точки в центре равномер-рототабельного плана. Зависит от первоначального плана ПФЭ и высчитывается R = 2^{n/4}, где n – число опытов.

По результатам исследований получена математическая модель 2 порядка на уровне значимости α = 0,05:

$$Y = 0,314 + 0,1125X_2 - 0,0328X_1^2 - 0,0553X_2^2 - 0,020X_1X_2$$

Поверхность отклика представляет собой эллиптический параболоид с координатами максимума в кодированных единицах X₁ = - 0,03, X₂ = 0,11, т.е. рО₂ опт. = 35 % и рН опт. = 8,0 ед.

В результате проведенных исследований установлено, что оптимальные значения уровней рО₂ и рН на логарифмической стадии роста пастерелл с учетом жизнеспособных бактерий, практически совпадает с таковыми, полученными при опти-

УДК 663.18:579.

О. С. Багаєва¹, канд. біол. наук, доц., О. В. Везенко², ст. наук. співроб., О. К. Багаєв¹, пров. інж., Т. О. Беляєва¹, наук. співроб., О. М. Полтавський¹, асп., В. Г. Коритнянська¹, асп., Т. В. Гудзенко¹, канд. біол. наук, доц.

¹Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна,

²Інженерно-технологічний інститут "Біотехніка"

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ САЛЬМОНЕЛ В ФЕРМЕНТЕРАХ БАРБОТАЖНОГО КОМПЛЕКСУ

Оптимізований режим культивування бактерій *Salmonella enteritidis* в розроблених ферментерах, який забезпечує досягнення концентрації бактеріальних клітин 1-2 млрд. кл/мл за 5-6 годин вирощування на МПВ та за 5-7 годин на гороховому середовищі. Для іммобілізації сальмонел на зерні необхідно 8-13 годин. Використання даних дає можливість суттєво скоротити термін виробництва біопрепарату бактороденциду, дія якого зумовлена *Salmonella enteritidis*.

Ключові слова: барботаж, культивування, оптимізація, сальмонела, ферментер.

Бактерії *Salmonella enteritidis* var. *Isatschenko 18/1* — діючий інгредієнт біопрепарату для знищення мишоподібних гризунів, зернового бактороденциду. Бактерії, які спричиняють мишачий тиф, знаходяться всередині та на поверхні зерна пшениці, ячменю, вівса. Бактороденцид призначений для використання в агрогосподарському виробництві. Біопрепарат користується попитом, але обсяги його одержання та застосування в останні роки помітно зменшилися [1-3]. Одна з основних причин — відсутність сучасних технологій виробництва. На сьогодні в біолабораторіях одержують бактороденцид згідно регламенту, який був розроблений в 1988 році [4].

Щонайменш три чинника гальмують налагодження виробництва бактороденциду. По-перше, понад 6 діб в великому об'ємі термостатованого приміщення необхідно підтримувати температуру 37 °С, що веде до надмірних енерговитрат. По-друге, трьохлітрові скляні банки, в яких переважно культивують сальмонели на зерні, не призначені до багаторазових автоклавувань. Велика кількість відходів внаслідок пошкоджень скла зменшує рентабельність виробництва. По-третє, для одержання гарантовано якісної продукції в багатьох місткостях необхідно визначати чистоту мікробної культури та титр сальмонел. Великий обсяг мікробіологічних аналізів також негативно впливає на собівартість біопрепарату.

Мета нашої роботи полягала в подоланні цих недоліків шляхом оптимізації умов культивування *S. enteritidis 18/1* в розроблених нами ферменте-

рах барботажного комплексу, пристосованих для виробництва біопрепаратів в умовах регіональних біолабораторій [5-8].

Матеріали та методи

У роботі був використаний штам *Salmonella enteritidis* var. *Isatschenko* 18/1, одержаний з ВНДІ сільськогосподарської мікробіології (Санкт-Петербург).

Вирощування бактерій здійснювали в термостатованому приміщенні при температурі від 36 °С до 38 °С.

На першій стадії виробництва бактороденциду одержували вихідний посівний матеріал: вирощували сальмонели в пробірці на скошеному м'ясопептонному агарі (МПА) на протязі 24 годин.

На другій стадії здобували посівну культуру бактерій першої генерації. В трьохлітровий інокуляційний ферментер з двома літрами м'ясопептонного бульйону (МПВ) вносили 10 мл суспензії посівного матеріалу, одержаної шляхом змиву вмісту пробірки вихідного посівного матеріалу фізіологічним розчином. **Культивували сальмонели при постійній подачі стерильного повітря.** Інтенсивність аерації регулювали таким чином, щоб при максимальній кількості повітря не замочувалася кришка ферментеру. Концентрацію мікробних клітин визначали з використанням камери Горяєва.

На третій стадії отримували посівну культуру мікроорганізмів другої генерації. **Сорокалітровий металевий ферментер** заповнювали 20 літрами рідкого горохового середовища, приготованого згідно інструкцій регламенту [4] та автоклавували при 1 атм півтори години. Після охолодження засівали двома літрами культури бактерій першої генерації. Вирощування сальмонел здійснювали при **постійній подачі повітря 4-5 л/хв.**

На четвертій стадії вирощували сальмонели на зерновому середовищі. Використовували пшеницю, ячмінь та суміш ячменю та пшениці (1:1). Зерно готували згідно інструкціям регламенту [4]. В сорокалітровому ферментері 20 кг зернового середовища двічі автоклавували при 2 атм на протязі двох годин два дні підряд. Після охолодження в ферментер вносили 4 літри посівної культури другої генерації, яку було одержано на попередній стадії. Ріст сальмонел відбувався при безперервній подачі повітря — 20-22 л/хв. Концентрацію життєздатних мікробних клітин у зерні визначали шляхом підрахунку кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 г зерна [6].

Результати та їх обговорення

Оптимізацію умов культивування *S. enteritidis* 18/1 здійснювали шляхом постійної подачі стерильного повітря крізь отвори барботерів в створених нами **ферментерах барботажного комплексу.** Дрібні бульбашки повітря насичували киснем поживне середовище. Крім того, вони перемішували вміст культиваційних ємностей при одержанні посівної культури першої



ща. При появі другого піку з'являвся характерний різкий запах сірководню. Подальшого підвищення концентрації мікробних клітин ми не спостерігали. Наступала стаціонарна фаза розвитку періодичної культури в ферментері. Розбіжність в термінах досягнення максимального титру на гороховому середовищі можна пояснити різницею вмісту компонентів живильних середовищ в різних сортах гороху, який використовували. На нашу думку для засіву зерна краще використовувати посівну культуру після досягнення нею максимального титру, 1-2 млрд/мл. Тобто третя стадія виробництва повинна тривати приблизно 5-6 годин. Цей термін значно коротший за регламентований (табл.).

На четвертій стадії виробництва бактороденциду ми помічали, що при використанні м'яких сортів пшениці спостерігається надмірне пом'якшення зернин після автоклавування (особливо на дні ферментеру). Кашоподібна маса розвареного зерна перешкоджала нормальній аерації. Через 35-40 годин культивації з барботажем спостерігали підвищення титру бактерій в зерні до 2 млрд. кл/г, який згідно технічним умовам є одним з основних показників виготовленого бактороденциду [10]. Тобто вплив аерації був незначний. Використання зерна твердих сортів пшениці для виробництва бактороденциду економічно недоцільне. Тому при проведенні подальших досліджень по оптимізації культивування сальмонел на зерновому середовищі використовували ячмінь та суміш зернових. Було встановлено, що на ячмені спостерігалось підвищення титру бактерій до рівня 2 млрд. кл/г через 22-28 годин культивування, а на суміші ячменю з пшеницею — через 8-13 годин. На наш погляд, пояснення таке: зернівки ячменю мають щільні целюлозні лусочки і сальмонели не можуть швидко подолати цю перешкоду. До того ж наявність лусочок заважає нормальній аерації вмісту зернин. Тому підвищення титру сальмонел у суміші спостерігалось в основному за рахунок іммобілізації бактерій на зернах пшениці. Через 19-32 години постійної аерації титр сальмонел на зерновому субстраті досягав 10-20 млрд. кл/г. Використання бактороденциду з таким високим титром дозволяє не тільки зменшувати норму використання біопрепарату, але й ефективно застосовувати таку продукцію для знищення пацюків (тому що титр в 20 млрд. кл/г має амінокістковий бактороденцид, який успішно використовувався в радянські часи для боротьби з пацюками) [2].

Таким чином, визначена можливість оптимізації росту *S. enteritidis* 18/1 в ферментерах барботажного комплексу завдяки використанню безперервної подачі стерильного повітря в емкість для культивування мікроорганізмів. Одержані дані дозволяють вдосконалити процес виробництва бактороденциду.

Література

1. Беспалов И. Н., Багаева О. С. Возрождение микробиопрепаратов — путь к решению экологических проблем // Экологические проблемы городов рекреационных зон и природоохраных территорий. Сборник научных статей. Одесса: ОЦНТЭИ, 2000. — С. 310-312.