

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій

Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему:

**«Технологія отримання біопрепаратів для захисту рослин на основі
Pseudomonas»**

Рівень вищої освіти перший (бакалаврський)

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Біотехнологія

Виконав: студент групи БЗБТ-22

Карімова Айнур

Науковий керівник: к.т.н., доц. Охмат О.А.

Рецензент: к.б.н., доц. Грецький І.О.

Київ 2026

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Рівень вищої освіти	<u>перший (бакалаврський)</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

_____ Олена МОКРОУСОВА
« ____ » _____ 20__ р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ**

Айнур Карімова

1. Тема кваліфікаційної роботи: Технологія отримання біопрепаратів для захисту рослин на основі *Pseudomonas*

Науковий керівник роботи Охмат Олена Анатоліївна, к.т.н., доц.
затверджені наказом КНУТД від «17» березня 2026 року № 62-уч

2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; пошук наукової літератури щодо технології отримання біопрепаратів для захисту рослин на основі бактерій роду *Pseudomonas*; технологічна схеми промислового отримання біопрепаратів на основі бактерій роду *Pseudomonas*; матеріали переддипломної практики

3. Зміст кваліфікаційної роботи: техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва, характеристика біологічного агента, опис технологічної схеми, контроль якості, висновки, список використаних джерел, додаток.

4. Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовний терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1 Техніко-економічне обґрунтування		
3	Розділ 2 Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва		
4	Розділ 3 Характеристика біологічного агента		
5	Розділ 4 Опис технологічної схеми		
6	Розділ 5 Контроль якості		
7	Висновки		
8	Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)		
9	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку		
10	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 14 днів до захисту)		
11	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		Коефіцієнт подібності ____% Коефіцієнт цитування ____%
12	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студент _____ Айнура КАРІМОВА

Науковий керівник _____ Олена ОХМАТ

АНОТАЦІЯ

Карімова Айнур. Технологія отримання біопрепаратів для захисту рослин на основі *Pseudomonas*. – Рукопис.

Кваліфікаційна бакалаврська робота за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2026 рік.

Дипломний бакалаврський проєкт присвячений розробці та обґрунтуванню промислової технології отримання біопрепарату для захисту рослин на основі бактерій *Pseudomonas chlororaphis* штам МА 342.

У кваліфікаційній роботі проведено техніко-економічне обґрунтування доцільності виробництва, розраховано річну потужність та кількість виробничих циклів. Обґрунтовано вибір біологічного агента як ефективного продуцента антибіотиків феназинового ряду та 2,4-DAPG, що забезпечують широкий спектр фунгіцидної та бактерицидної дії.

Представлено технологічну схему виробництва, що базується на методі глибинного періодичного культивування у ферментері. Обґрунтовано склад поживного середовища та параметри біосинтезу, що забезпечують високий титр життєздатних клітин. Розраховано кількість стадій підготовки посівного матеріалу.

Описано систему підготовки повітря та вибір мийно-дезінфікуючих засобів для забезпечення асептики процесу. Робота включає методики операційного контролю та оцінки якості готового продукту.

Ключові слова: біопрепарат, *Pseudomonas chlororaphis*, біосинтез, глибинна ферментація, антибіотики, біоконтроль, асептика, захист рослин.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

ABSTRACT

Karimova Aynur. Technology of production of biological preparations for plant protection based on *Pseudomonas*. – Manuscript.

Bachelor's qualification thesis in the speciality 162 Biotechnology and Bioengineering. – Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2026.

The bachelor's thesis project is devoted to the development and substantiation of the industrial technology for producing a biological preparation for plant protection based on the bacteria *Pseudomonas chlororaphis* strain MA 342.

The qualification work provides a feasibility study for the production, calculating the annual capacity and the number of production cycles. The choice of the biological agent is justified by its effectiveness as a producer of phenazine antibiotics and 2,4-DAPG, which exhibit a wide range of fungicidal and bactericidal activity.

The technological scheme of production is presented, based on submerged periodic cultivation in a fermenter. The composition of the nutrient medium and biosynthesis parameters, which ensure a high titer of viable cells, are substantiated. The number of stages for seed material preparation is calculated.

The air preparation system and the choice of detergents and disinfectants to ensure process asepsis are described. The work includes operational control methods and quality assessment of the finished product.

Keywords: biological preparation, Pseudomonas chlororaphis, biosynthesis, submerged fermentation, antibiotics, biocontrol, asepsis, plant protection.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Зміст

ВСТУП	10
РОЗДІЛ 1 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	13
1.1 Характеристика біопрепаратів для захисту рослин на основі <i>Pseudomonas</i>	13
1.2 Потреба у цільовому продукті	14
1.3 Розрахунок потужності виробництва.....	15
1.3.1 Розрахунок кількості біопрепарату для посівної площі.....	15
1.4 Розрахунок кількості виробничих циклів.....	15
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА	17
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	17
2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу.....	19
2.3 Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу з наведенням складу поживного середовища.....	25
2.3.1. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	25
2.3.2 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі об'ємом 400 л	26
2.3.3 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі об'ємом 40 л	27
2.3.4 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в настільному лабораторному ферментері об'ємом 5 л.....	27
2.4 Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу	28
2.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	29
РОЗДІЛ 3 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	38
3.1 Таксономічний статус	38
3.2 Морфолого-культурні ознаки	38
3.3 Фізіологічні та біохімічні ознаки	39
РОЗДІЛ 4 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	41
4.1 Опис технологічної схеми	41

<i>ДР.1. Санітарна підготовка виробництва</i>	<i>41</i>
<i>ДР 2. Підготовка стерильного аераційного повітря.....</i>	<i>47</i>
<i>ДР 3. Приготування титрувальних розчинів.....</i>	<i>48</i>
<i>ДР 4 Приготування поживних середовищ</i>	<i>51</i>
<i>ТП 5. Підготовка посівного матеріалу</i>	<i>56</i>
<i>ТП 5.1. Підтримання колекційної культури.....</i>	<i>56</i>
<i>ТП 5.2 Підготовка робочої культури</i>	<i>56</i>
<i>ТП 5.3. Вирощування культури в колбах на качалках</i>	<i>57</i>
<i>ТП 5.4. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 5 л</i>	<i>57</i>
<i>ТП 5.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 40 л</i>	<i>57</i>
<i>ТП 5.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 400 л</i>	<i>57</i>
<i>ТП 6. Виробниче культивування</i>	<i>58</i>
<i>ТП 6.1. Виробничий біосинтез</i>	<i>58</i>
<i>ТП.7 Зберігання культуральної рідини.....</i>	<i>58</i>
<i>ТП.7.1 Зберігання культуральної рідини</i>	<i>58</i>
<i>ЗВ 8 Знешкодження відходів.....</i>	<i>59</i>
<i>ЗВ 8.1. Знешкодження рідких відходів.....</i>	<i>59</i>
<i>ЗВ 8.2. Знешкодження відходів повітря.....</i>	<i>59</i>
<i>ЗВ 8.3. Знешкодження твердих відходів</i>	<i>59</i>
РОЗДІЛ 5 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	60
<i>5.1 Мікробіологічний контроль.....</i>	<i>60</i>
<i>5.2 Фізико-хімічний контроль.....</i>	<i>61</i>
ВИСНОВКИ.....	62
Список використаних джерел.....	63

ВСТУП

У сучасному сільському господарстві однією з найгостріших проблем залишається зростання резистентності фітопатогенних мікроорганізмів до хімічних пестицидів, деградація ґрунтів та накопичення токсичних речовин у сільськогосподарській продукції. Інтенсивне застосування синтетичних засобів захисту рослин призводить до порушення мікробіологічної рівноваги ґрунту, зниження біорізноманіття та створення значного екологічного навантаження на агроєкосистеми. У зв'язку з цим у всьому світі, зокрема в країнах Європейського Союзу, активно впроваджується стратегія «Європейська зелена угода» (European Green Deal), яка передбачає зменшення використання хімічних пестицидів на 50 % до 2030 року [1].

У цих умовах значно зростає актуальність розробки та впровадження біологічних препаратів для захисту рослин — біофунгіцидів, біобактерицидів та стимуляторів росту на основі корисних мікроорганізмів. Особливе місце серед них посідають бактерії роду *Pseudomonas*, які є одними з найбільш ефективних представників ризосферних мікроорганізмів з вираженими антагоністичними властивостями [2, 3].

Бактерії роду *Pseudomonas* (*Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas protegens*, *Pseudomonas fluorescens*) поєднують у собі здатність до активної колонізації кореневої системи рослин, синтезу антибіотиків (2,4-діацетилфлороглюцинолу, феназинів, піролінтрину), сидерофорів, гідролітичних ферментів та фітогормонів. Вони проявляють високу антагоністичну активність щодо широкого спектру фітопатогенів, а також здатні індукувати системну резистентність рослин та стимулювати їхній ріст і розвиток [4, 5].

					КР.ПЗ.162.11				
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата					
Розробив		Карімова Айнур			ВСТУП		Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Охмат О.А.					Д	№ арк	кіл. в розділі
							КНУТД, БЗБТ-22		
Н.Контр.									
Затвердив									

Результати численних досліджень свідчать, що застосування біопрепаратів на основі *Pseudomonas* сприяє зниженню ураження рослин кореневими гнилями, фітофторозом, склеротиніозом, бактеріальними плямистостями та іншими захворюваннями на 60–90 %, а також підвищенню врожайності сільськогосподарських культур на 15–40 % при одночасному покращенні якості продукції [6, 7].

Особливої актуальності тема набуває в умовах України, де аграрний сектор є стратегічно важливим для економіки країни, а ґрунти зазнають значного антропогенного та техногенного навантаження. Розробка та впровадження сучасних біотехнологічних препаратів для захисту рослин є необхідним кроком на шляху до сталого землеробства, зниження хімічного навантаження та забезпечення продовольчої безпеки держави [8].

Метою кваліфікаційної роботи є розробка технології отримання біопрепарату для захисту рослин на основі *Pseudomonas chlororaphis* MA 342.

Завданнями кваліфікаційної роботи є:

1. Обґрунтування вибору продуценту, аналіз його переваг та опис морфолого-культуральних, фізіологічних і біохімічних властивостей;
2. Вибір та обґрунтування технологічної схеми отримання препарату;
3. Опис технологічної схеми, вибір поживного середовища, умов та параметрів культивування;
4. Опис методів контролю якості на стадіях виробництва біопрепарату.

Предметом дослідження є процес біосинтезу біопрепарату на основі бактерій роду *Pseudomonas*.

Об'єктом дослідження є штами *Pseudomonas chlororaphis* MA342, умови їх культивування та технологічні параметри виробництва біопрепарату.

Методи дослідження. У кваліфікаційній роботі використано аналіз наукової літератури, техніко-економічне обґрунтування, розрахунки виробничої потужності та кількості циклів, обґрунтування технологічної схеми, а також методики мікробіологічного і фізико-хімічного контролю якості.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Новизна одержаних результатів – розроблено технологічну схему отримання біопрепарату для захисту рослин на основі *Pseudomonas chlororaphis* MA342 шляхом глибинного культивування

Практичне значення одержаних результатів обумовлене використанням екологічно *Pseudomonas chlororaphis* MA342, як безпечної альтернативи хімічним засобам захисту рослин.

Апробація проведена в умовах XII Міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції здобувачів вищої освіти та молодих учених «Хімія і сучасні технології» (м. Дніпро, 20-22 травня 2026 р.).

Публікації: Аллахвердієва Т., Карімова А., Охмат О.А., Грецький І.О. Отримання біопрепаратів на основі *Bacillus* для захисту рослин. Хімія і сучасні технології». Секція VIII «Біотехнологія та біоінженерія» : Матер. XII Міжнар. наук.-практ. Інтернет-конф. здобув. вищої освіти та молодих учених (Дніпро, 20–22.05.2026 року). Дніпро : УДУНТ, 2026. Друк. (Додаток).

Структура і обсяг кваліфікаційної роботи. Робота викладена на 61 сторінках, складається з вступу, п'яти розділів, висновків, списку використаних джерел (22 найменування) та додатків.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

1.1 Характеристика біопрепаратів для захисту рослин на основі *Pseudomonas*.

Біопрепарати на основі бактерій роду *Pseudomonas* є одними з найбільш ефективних мікробних засобів біологічного захисту рослин. Вони поєднують у собі властивості стимуляторів росту рослин (PGPR) та біофунгіцидів/біобактерицидів. Найбільш перспективними видами вважаються *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas protegens* та *Pseudomonas fluorescens* [2, 3].

Дія цих препаратів ґрунтується на комплексі механізмів. Бактерії активно продукують антимікробні сполуки, такі як 2,4-діацетилфлороглюцинол (2,4-DAPG), феназини, піролінтрин та піолютеорин, які пригнічують розвиток фітопатогенних грибів і бактерій. Крім того, вони синтезують сидерофори (піовердин і піохелін), завдяки чому ефективно конкурують з патогенами за залізо. Важливу роль відіграє також продукування гідролітичних ферментів (хітидаз, β-глюканаз, протеаз), які безпосередньо руйнують клітинні стінки патогенів. Додатково бактерії здатні індукувати системну резистентність рослин (ISR) та стимулювати їхній ріст завдяки синтезу фітогормонів, зокрема індол-3-оцтової кислоти (ІОК) [9, 5].

Завдяки такому багатогранному впливу препарати на основі *Pseudomonas* ефективно контролюють кореневі гнилі, фітофтороз, склеротиніоз, ризоктоніоз, бактеріальні плямистості та інші захворювання. За результатами численних польових досліджень їх застосування дозволяє зменшити ураження рослин патогенами на 60–90 % та підвищити врожайність сільськогосподарських культур на 15–40 %, одночасно покращуючи якість продукції [7, 6].

					КР.ПЗ.162.11				
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата					
Розробив		Карімова Айнур			РОЗДІЛ 1		Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірів		Охмат О.А.					Д	№ арк	кіль. в розділі
							КНУТД, БЗБТ-22		
Н.Контр.									
Затвердив									

Біопрепарати випускають у рідкій формі (суспензія з концентрацією життєздатних клітин не менше 1×10^9 КУО/мл) та сухій формі (порошок або гранули). Рідкі форми забезпечують швидку колонізацію ризосфери, тоді як сухі форми характеризуються кращою стабільністю під час зберігання.

Серед комерційних препаратів найбільшого поширення набули Cerall®, Cedomon® та Cedress® на основі *Pseudomonas chlororaphis* MA342 (компанія Koppert), Howler® (*P. chlororaphis* AFS009), Proradix® (*P. protegens* DSMZ 13134) та BlightBan® A506 (*P. fluorescens* A506) [10, 11].

На відміну від хімічних пестицидів, основним стандартизованим показником якості таких біопрепаратів є концентрація життєздатних клітин, а не кількість попередньо накопичених токсинів. Антибіотики синтезуються бактеріями безпосередньо в ризосфері або на поверхні рослин (*in situ*). У процесі ферментації типовий вихід 2,4-DAPG становить 10–100 мкг/мл, а в оптимізованих умовах може досягати 300–1850 мкг/мл. Вихід токсину на одну клітину зазвичай коливається в межах $(3-8) \times 10^{-9}$ мкг. Кількісне визначення антибіотиків здійснюють методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [9].

1.2 Потреба у цільовому продукті

Сучасне сільське господарство стикається з проблемами зростання резистентності патогенів до хімічних пестицидів, деградації ґрунтів та забруднення навколишнього середовища. Європейська зелена угода вимагає суттєвого скорочення використання хімічних засобів захисту рослин. У таких умовах ринок біопестицидів демонструє швидке зростання: за прогнозами, його обсяг у Європі збільшиться з 2,17 млрд USD у 2025 році до 5,56 млрд USD у 2031 році при середньорічному темпі приросту близько 12 % [12, 13].

В Україні потреба у вискоєфективних біопрепаратах особливо гостра через інтенсивне землеробство, наслідки воєнних дій та необхідність відновлення родючості ґрунтів. Застосування препаратів на основі *Pseudomonas* дозволяє зменшити використання хімічних пестицидів на 30–70 %, відновити біологічну активність ґрунту, підвищити стійкість рослин до патогенів і абіотичних стресів, а

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

також отримати екологічно чисту продукцію, що відповідає вимогам європейського ринку [8].

1.3 Розрахунок потужності виробництва

1.3.1 Розрахунок кількості біопрепарату для посівної площі

Потребу в біопрепараті на основі *Pseudomonas chlororaphis* розраховуємо для посівних площ зернових культур, переважно озимої пшениці, з урахуванням передпосівної обробки насіння та обробок у період вегетації [14].

Загальна площа посіву зернових культур в Україні у 2024 році становить 4,355 млн га. Згідно з рекомендаціями виробників, норма витрат для передпосівної обробки насіння (при нормі висіву ≈ 250 кг/га) становить 0,5–1,0 л на 1 т насіння. Для обробки рослин під час вегетації норма витрат складає 1,0–2,0 л на 1 га посівів.

В Україні на ринку біологічних засобів захисту рослин активно працює близько 12 основних виробників мікробних препаратів. Приймаємо, що наше виробництво стане 13-м. Тоді частка препарату, яка буде доцільна для нашого підприємства, становить 1/13 від загальної потреби ринку.

З урахуванням середньої норми витрат 1,5–2,0 л/га за сезон, обробки приблизно 45 % площ та частки ринку 1/13, розрахункова річна потреба становить 335 000 літрів готового рідкого біопрепарату на рік.

1.4 Розрахунок кількості виробничих циклів

Враховуючи кількість культуральної рідини, необхідної для забезпечення річної потреби, виконаємо наступні обчислення. Приймавши кількість робочих днів у році (Трд) за 330, визначимо добову норму виробництва продукту (Vд), яка становитиме:

$$V_d = 335\,000 \text{ л} / 330 \text{ днів} \approx 1015 \text{ л/добу.}$$

Проведемо розрахунок кількості виробничих циклів, що здійснюються протягом року.

$$N_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{кр}}}{V_d \times \frac{T_{\text{цф}}}{24}} = \frac{335000}{1015 \times \frac{52}{24}} = 152,34 = 152 \text{ цикли}$$

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Тривалість повного виробничого циклу у ферментері (Тцф) становить 52 години та охоплює такі послідовні етапи: миття й огляд обладнання (1,5 години), перевірка герметичності (0,5 години), процеси підігріву та стерилізації (1,5 години), охолодження (0,5 години), завантаження поживного середовища (1,5 години), внесення бактеріальної культури (0,5 години) та основний етап — ферментація, що триває 48 годин.

Знаючи добову норму виробництва, розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл ($V_{кр/ц}$):

$$V_{кр/ц} = K1 \times V_d \times T_{цф} / 24 = 1,1 \times 1015 \times 52 / 24 \approx 2420 \text{ л/цикл},$$

де $K1$ – коефіцієнт, який вводиться для компенсації можливих відхилень від стерильних умов під час проведення операцій.

Проте необхідно врахувати втрати в результаті краплевиносу, що становлять 10 %.

$$V_{роб} = V_{кр/ц} * 1,1 = 2420 * 1,1 = 2662 \text{ л}$$

Таким чином, фактичний вихід культуральної рідини за один цикл становить 2662 л.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Вибір біологічного агента є одним з найважливіших етапів розробки технології виробництва мікробного біопрепарату. Для створення ефективного засобу біологічного захисту рослин обрано штам *Pseudomonas chlororaphis* MA342. Цей штам добре вивчений, пройшов реєстрацію в Європейському Союзі та широко застосовується у комерційних препаратах Cerall, Cedomon і Cedress завдяки стабільній антагоністичній активності, високій колонізаційній здатності ризосфери та безпечності для навколишнього середовища [11, 6].

При виборі продуценту враховували його здатність активно синтезувати 2,4-діацетилфлороглюцинол (2,4-DAPG) та феназини, ефективність проти основних фітопатогенів, швидкість росту та придатність до промислового масштабування. Порівняльний аналіз провідних штамів показав, що *P. chlororaphis* MA342 має оптимальне поєднання продуктивності та технологічних характеристик. Для його культивування рекомендовано комплексні поживні середовища, що містять 20–40 г/л глюкози або гліцерину, 10–15 г/л пептону або дріжджового екстракту, фосфати, магній та мікроелементи [3, 5].

У таблиці 2.1 наведено порівняльну характеристику різних штамів роду *Pseudomonas*, для яких зазначено продуктивність біомаси, вихід ключового антибіотика (2,4-DAPG), основний спектр дії та переваги.

					КР.ПЗ.162.11		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			
Розробив	Карімова Айнур				РОЗДІЛ 2	Літ.	Аркуш
Перевірив	Охмат О.А.					Д	№ арк
						кіл. в розділі	
Н.Контр.							
Затвердив						КНУТД, БЗБТ-22	

Таблиця 2.1 Порівняльна характеристика перспективних штамів *Pseudomonas* для виробництва біопрепаратів

Штам	Продуктивність біомаси (г/л)	Вихід 2,4-DAPG (мкг/мл)	Основний спектр дії
<i>P. chlororaphis</i> MA342	8,5–11,0	45–85	<i>Fusarium, Rhizoctonia, Septoria, Drechslera</i>
<i>P. protegens</i> DSMZ 13134	9,0–12,5	60–120	<i>Pythium, Sclerotinia, Botrytis</i>
<i>P. fluorescens</i> A506	7,5–10,0	25–60	<i>Erwinia amylovora</i>
<i>P. chlororaphis</i> AFS009	10,0–13,0	50–110	Широкий спектр ґрунтових патогенів

На основі аналізу літературних джерел були відібрані найбільш ефективні штами. Зокрема, *Pseudomonas chlororaphis* MA342 показав стабільну продуктивність і широкий спектр дії проти основних фітопатогенів зернових та овочевих культур [9].

Для культивування вибраних мікроорганізмів використовуються спеціальні поживні середовища, збагачені необхідними макро- та мікроелементами. Відомо, що ефективне розмноження *Pseudomonas* spp. можливе на середовищах з оптимальним співвідношенням джерел вуглецю, азоту та мінеральних компонентів [15].

Оскільки порівняння лише біологічних характеристик є недостатнім, проведено порівняння вартості поживних середовищ для кожного з обраних

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

продуцентів (таблиця 2.1.1). Для розрахунку використано актуальні ціни на основні компоненти станом на 2025 рік.

Таблиця 2.1.1 Порівняння вартості поживних середовищ для різних штамів *Pseudomonas* (орієнтовно, грн на 1 л середовища)

Продуцент	Основні компоненти	Вартість на 1 л середовища (грн)	Переваги середовища
<i>P. chlororaphis</i> MA342	Глюкоза/гліцерин + пептон + фосфати	6,8–7,5	Універсальність, стабільний ріст
<i>P. protegens</i> DSMZ 13134	King's B (гліцерин + пептон)	5,2–5,8	Найнижча вартість, стимуляція DAPG
<i>P. fluorescens</i> A506	King's B	5,9–6,4	Дешеве, але нижча продуктивність
<i>P. chlororaphis</i> AFS009	Глюкоза + пептон + фосфати	7,2–7,8	Висока продуктивність, дорожче

Найбільш доцільним за співвідношенням «продуктивність / вартість / технологічна придатність» є середовище King's B для штаму *P. chlororaphis* MA342. Воно забезпечує добрий ріст, активний синтез антибіотиків і має найнижчу собівартість серед розглянутих варіантів.

Таким чином, для подальшої технологічної схеми виробництва обрано штам *Pseudomonas chlororaphis* MA342 з використанням модифікованого середовища King's B як основного.

2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Процес культивування бактерій роду *Pseudomonas* для виробництва біопрепарату повинен забезпечувати оптимальні умови для їхнього росту, розвитку та продукування біологічно активних речовин, зокрема антибіотиків (2,4-DAPG та феназинів). Основні параметри культивування визначаються фізіолого-біохімічними особливостями цих мікроорганізмів.

Оскільки бактерії роду *Pseudomonas* є облігатними аеробами, промислове культивування відбувається за аеробних умов. Для підтримання оптимального рівня аерації необхідно забезпечити постійне надходження повітря у біореактор. Найкращий ріст і синтез антибіотиків спостерігається за температури 28–30 °C та рівня кислотності 6,8–7,2. Витрата повітря становить 1,0–1,5 л/хв на 1 літр середовища (або 1,0–1,5 vvm), що дозволяє підтримувати необхідний рівень розчиненого кисню [5, 15]. Враховуючи необхідні умови для накопичення біомаси та потужності виробництва, оптимальним є періодичне культивування. Біореактор повинен відповідати наступним вимогам:

1. Підтримання температурного режиму культивування та необхідного рівня перемішування;
2. Забезпечувати періодичність процесу, асептичні умови та умови стерилізації; бути обладнаним датчиками тиску, температури, рН, розчиненого кисню; виготовленим з корозійно-стійких матеріалів (нержавіюча сталь AISI 316L);
3. Бути простим у проведенні ремонтних та підготовчих робіт.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		



Враховуючи критерії та необхідний об'єм (4000 л), було обрано ферментер Sartorius BIOSTAT® D-DCU (рис 2.2) від компанії Sartorius Stedim Biotech (Німеччина).

Ця модель має автоматичну систему вимірювання та контролю температури, рН, розчиненого кисню (DO), швидкості перемішування, а також обладнана системою SIP-стерилізації, перистальтичними насосами та системою перемішування зі швидкістю 50–400 об/хв. Ферментери серії BIOSTAT® STR широко використовуються для промислового виробництва мікробних біопрепаратів і забезпечують надійне масштабування процесу [16].

Біосинтез *Pseudomonas chlororaphis* здійснюється з механічним перемішуванням для піногасіння та рівномірного розподілення кисню і біомаси. Для цього використовується лопатева мішалка. Швидкість перемішування, згідно технологічного рішення, становить 200–300 об/хв [15, 17].

Отже, ферментер BIOSTAT® D-DCU компанії Sartorius повністю задовольняє наші потреби, забезпечуючи надійний контроль параметрів процесу,

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

високу надійність і відповідність вимогам промислового виробництва мікробних біопрепаратів.

2.2.2 Обґрунтування вибору стадій підготовки аераційного повітря

Pseudomonas chlororaphis MA342 є облігатним аеробом, тому процес його культивування вимагає постійного і достатнього постачання кисню. Цей мікроорганізм характеризується високою інтенсивністю дихання, яка необхідна для підтримання енергетичного метаболізму та активного синтезу антибіотиків. Оптимальний рівень розчиненого кисню в культуральному середовищі для даного штаму становить 20–30 % від насичення. Зниження концентрації кисню нижче 15 % призводить до уповільнення росту і зменшення продуктивності, тоді як підвищення понад 40 % може спричинити оксидативний стрес і пригнічення утворення 2,4-DAPG [15, 18].

Забір повітря здійснюється за допомогою повітрязабірника, розміщеного на висоті 17 м над рівнем землі в найменш забрудненій зоні. Основна маса повітря проходить стадію грубої очистки за допомогою фільтрів класу G4. Для стерилізації повітря, що подається до посівного матеріалу та виробничого ферментера, використовуються індивідуальні фільтри тонкої очистки. Ці фільтри встановлюються безпосередньо перед інокуляторами та ферментом.

Система подачі газу в ферментаційних установках складається з компресора, охолоджувача з конденсатоотводчиком, ресивера та комплексу фільтрів. Компресор забезпечує необхідний тиск повітря, барботер подає його у вигляді дрібних бульбашок у культуральне середовище, що сприяє ефективному масообміну. Фільтри індивідуальної очистки з розміром пор 0,22 мкм видаляють механічні частинки, аерозолі та мікроорганізми, які можуть негативно вплинути на ріст культури та її продуктивність [17].

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Така багаторівнева система підготовки аераційного повітря забезпечує високу стерильність процесу та підтримує оптимальні умови аерації протягом усього циклу ферментації.

2.2.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Мийні та дезінфікуючі засоби відіграють ключову роль у забезпеченні високих санітарно-гігієнічних умов на біотехнологічному виробництві. Вони призначені для ефективного видалення органічних забруднень (білкових, жирових, вуглеводних), механічних частинок, а також для знищення вегетативних форм мікроорганізмів, які можуть потрапити в технологічний процес і спричинити контамінацію цільової культури бактерій роду *Pseudomonas*.

До таких засобів висуваються жорсткі вимоги відповідно до санітарних норм і правил. Зокрема, вони повинні добре розчинятися у воді, легко змиватися, не залишати стороннього запаху та осаду, мати низьку корозійну активність щодо конструкційних матеріалів (нержавіючої сталі марок AISI 304, AISI 316L), бути безпечними для персоналу та навколишнього середовища, а також володіти широким спектром антимікробної дії [19, 20].

Для миття та дезінфекції основного технологічного обладнання (ферментерів, інокуляторів, трубопроводів, запірної арматури) обрано сучасний універсальний мийно-дезінфікуючий засіб «Санікон» виробництва ТОВ «Інтердез» (Україна).

Цей препарат належить до засобів нового покоління на основі синергічного комплексу четвертинних амонієвих сполук (ЧАС), третинних алкіламінів та неіоногенних поверхнево-активних речовин (ПАР). Завдяки вираженій лужній реакції робочих розчинів засіб має потужну емульгуючу дію, ефективно розчиняє стійкі білкові й жирові забруднення, а також повністю деструктує бактеріальні біоплівки, які схильні утворюватися на внутрішніх поверхнях і в «мертвих зонах» біореакторів під час культивування бактерій роду *Pseudomonas*. Засіб проявляє

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

виражену бактерицидну (включаючи штами *Pseudomonas aeruginosa*), фунгіцидну та віруліцидну активність [21].

«Санікон» застосовується у вигляді водних розчинів у концентрації 0,5–2,0 % залежно від ступеня біологічного та механічного забруднення апаратів. Робочий розчин може наноситися як вручну (для знімних деталей), так і в автоматичному режимі через стаціонарні системи безрозбірного миття (CIP-системи) ферментаційного блоку. Рекомендований час експозиції становить 15–30 хвилин, після чого обладнання ретельно промивається водою очищеною до повної відсутності залишків ПАР та лужності (контролюється за допомогою індикаторного паперу або кондуктометрично). Робочі розчини добре змиваються, не утворюючи залишкової наліпки на оброблюваних поверхнях, що виключає ризик інгібування росту культури-продуцента в наступних технологічних циклах [21].

Для проведення регулярних вологих прибирань та дезінфекції будівельних конструкцій виробничих приміщень (підлоги, стін, дверей чистих зон), а також зовнішніх поверхонь великогабаритного обладнання обрано дезінфікуючий засіб «Бланідас Актив» (ТОВ «Бланідас», Україна). Цей безальдегідний засіб на основі третинних амінів та ЧАС не пошкоджує конструкційні матеріали (кахель, лінолеум, епоксидні наливні підлоги, пластик), не виділяє у повітряне середовище летких токсичних речовин і забезпечує надійний захист від сторонньої супутньої мікрофлори [22].

Комплексне використання зазначених засобів дозволяє підтримувати необхідний рівень санітарної чистоти виробництва, мінімізувати ризик мікробної контамінації та забезпечувати повну відповідність вимогам належної виробничої практики (GMP) щодо чищення та санітарної обробки обладнання [21].

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

2.3 Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу з наведенням складу поживного середовища

Для промислового культивування бактерій *Pseudomonas chlororaphis* метод прямого внесення культури з лабораторних пробірок у промисловий біореактор є неможливим через занадто низьку початкову концентрацію клітин і тривалий лаг-період. Це неминуче призведе до ризику контамінації середовища сторонньою мікрофлорою.

Масштабування процесу здійснюють послідовно (постадійно), використовуючи правило десятикратного збільшення об'єму, за якого норма внесення посівного матеріалу становить 10 % від робочого об'єму середовища на кожній наступній стадії. Розрахунок ведеться у зворотному напрямку — від промислового ферментера до вихідної лабораторної культури. Базовим параметром є корисний робочий об'єм культуральної рідини у головному апараті, який становить 2662 л .

2.3.1. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюють у головному ферментері. Згідно з попередніми розрахунками (Розділ 1), робочий об'єм рідкої фази перед початком ферментації становить $V_{роб1} = 2662$ л.

При первинно вибраному оптимальному коефіцієнті заповнення апарата $K_{зап} = 0,66$, необхідний геометричний (повний) об'єм біореактора становить:

$$V_{Г} = 2662/0,66 = 4033 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний вертикальний ферментер $V_{сф} = 4000$ л (4 м^3) та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап1} = 2662/4000 = 0,665$$

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Уточнений коефіцієнт заповнення знаходиться у рекомендованих межах (0,6–0,75). Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Розрахуємо чистий об'єм середовища в апараті без урахування об'єму інокуляту ($V_{пс}$):

$$V_{пс1} = 2662/1,1=2420 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу (інокуляту) для головного виробничого ферментера становить:

$$V_{пм1} = 2662 - 2420 = 242 \text{ л}$$

2.3.2 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі об'ємом 400 л

Для отримання 242 л посівного матеріалу , об'єм поживного середовища в апараті попередньої стадії з урахуванням 10 % втрат у результаті краплевиносу та випаровування повинен становити:

$$V_{роб2} = 242/0,9=269 \text{ л}$$

Приймаємо стандартний промисловий інокулятор $V_{сф} = 400 \text{ л}$ ($0,4 \text{ м}^3$) та уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап2} = 269/400 = 0,67$$

Уточнений коефіцієнт заповнення знаходиться у рекомендованих межах (0,55–0,75). Враховуючи, що кількість посівного матеріалу становить 10 %, розрахуємо чистий об'єм поживного середовища (без урахування інокуляту з попередньої стадії):

$$V_{пс2} = 269/1,1=244,5 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для інокулятора об'ємом 400 л становить:

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

$$V_{\text{пм}2} = 269 - 244,5 = 24,5 \text{ л}$$

2.3.3 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі об'ємом 40 л

Для отримання 24,5 л посівного матеріалу (необхідного для інокулятора об'ємом 400 л), об'єм поживного середовища з урахуванням 10 % втрат у результаті краплевиносу повинен становити:

$$V_{\text{роб}3} = 24,5/0,9 = 27,2 \text{ л}$$

Приймаємо стандартний лабораторний інокулятор $V_{\text{сф}} = 40 \text{ л}$ та уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}3} = 27,2/40 = 0,68$$

Уточнений коефіцієнт заповнення знаходиться у рекомендованих межах (0,55–0,75). Враховуючи, що кількість посівного матеріалу становить 10 %, розрахуємо чистий об'єм поживного середовища (без урахування інокуляту з колб):

$$V_{\text{пс}3} = 27,2/1,1 = 24,7 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу (вегетативної культури з качалочних колб) для інокулятора об'ємом 40 л становить:

$$V_{\text{пм}3} = 27,2 - 24,7 = 2,5 \text{ л}$$

2.3.4 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в настільному лабораторному ферментері об'ємом 5 л

Для отримання 2,5 л посівного матеріалу (необхідного для інокулятора об'ємом 40 л), об'єм поживного середовища в настільному ферментері з урахуванням 10 % втрат повинен становити:

$$V_{\text{роб}4} = 2,5/0,9 = 2,78 \text{ л}$$

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Приймаємо стандартний настільний лабораторний ферментер $V_{сф} = 5$ л та уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап4} = 2,78/5 = 0,56$$

Уточнений коефіцієнт заповнення знаходиться у рекомендованих межах (0,55–0,75). Враховуючи, що кількість посівного матеріалу становить 10 %, розрахуємо чистий об'єм поживного середовища:

$$V_{пс4} = 2,78/1,1 = 2,53 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу (інокуляту з качалочних колб) для настільного ферментера об'ємом 5 л становить:

$$V_{пм4} = 2,78 - 2,53 = 0,25 \text{ л}$$

2.3.5. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах

Для одержання 0,25 л посівного матеріалу використовують конічні колби об'ємом 0,5 л з коефіцієнтом заповнення 0,5. Корисний об'єм однієї колби становить 0,3 л. Кількість колб становить:

$$0,25 / 0,3 \approx 0,83 \text{ шт.}$$

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 1 качалочна колба.

Таким чином, процес підготовки посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу біопрепарату на основі *Pseudomonas chlororaphis* у ферментері об'ємом 4 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 проходить у п'ять етапів.

2.4 Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

2.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для культивування *Pseudomonas chlororaphis* MA342 використовується комплексне поживне середовище такого складу (г/л):

- Гліцерин — 15 г/л
- Пептон — 10 г/л
- KH_2PO_4 — 1,5 г/л
- Na_2HPO_4 — 1,5 г/л
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 г/л
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01 г/л

Для культивування бактерій *Pseudomonas chlororaphis* MA342 на всіх етапах періодичного процесу (від лабораторних колб до промислового біореактора) використовується комплексне багатокomпонентне поживне середовище. Оскільки технологічний процес розраховано на п'ять послідовних стадій масштабування, кількість сухих речовин та гліцерину розраховується індивідуально для корисного об'єму чистого середовища кожної стадії, визначеного у підрозділі 2.3.

Гліцерин обрано як основне джерело вуглецю та енергії завдяки його нижчій ринковій вартості порівняно з кристалічною глюкозою, а також фізіологічній придатності для швидкого накопичення життєздатної біомаси штаму *Pseudomonas chlororaphis*. Крім того, використання гліцерину знижує швидкість піноутворення на етапі активної аерації промислової культури.

Оскільки поживне середовище є багатокomпонентним і містить хімічно активні та термолабільні речовини, його пряма сумісна стерилізація в одному об'ємі є неприпустимою. За умов високотемпературного оброблення (121 °C) у загальному розчині відбуваються небажані фізико-хімічні процеси, головним з яких є утворення нерозчинних осадів. Іони магнію та заліза за високих температур вступають у реакцію заміщення з ортофосфатами калію та натрію, формуючи

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

кристалічні осад фосфату магнію та фосфату заліза, які стають біологічно недоступними для живлення мікроорганізмів.

З метою оптимізації технологічного процесу, зменшення кількості допоміжного апаратурного оформлення та зниження ризику контамінації, кількість композицій поживного середовища було скорочено до двох основних розчинів, які піддаються роздільній стерилізації:

Композиція №1: Включає в себе повний розрахунковий об'єм води, гліцерину, пептону, а також фосфатних солей KH_2PO_4 та Na_2HPO_4 . Оскільки гліцерин є хімічно стабільним поліолом (на відміну від редукуючих моносахаридів типу глюкози), його сумісна стерилізація з амінокислотами пептону за температури 121°C не викликає реакції меланоїдиноутворення (карамелізації) за нейтральних значень рН. Відсутність у цьому розчині катіонів магнію та заліза повністю виключає ризик випадіння в осад фосфатів.

Композиція №2 : Являє собою концентрований водний розчин солей магнію $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та заліза ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Розчин готують окремо у кількості 2–5 % від загального об'єму середовища і підкислюють 0,1 М розчином соляної кислоти до рН 4,5–5,0 для запобігання гідролізу та окиснення заліза.

2.4.1.1 Обґрунтування приготування поживного середовища для колб

Отримання посівного матеріалу бактерій *Pseudomonas chlororaphis* MA342 здійснюється у п'ять послідовних етапів: вирощування у конічній колбі об'ємом 500 мл (сумарний об'єм середовища 0,25 л), у настільному лабораторному ферментері об'ємом 5 л, в інокуляторі об'ємом 40 л, в інокуляторі об'ємом 400 л та подальший засів головного виробничого ферментера об'ємом 4000 л.

Вирощування культури на всіх стадіях процесу відбувається на комплексному поживному середовищі, яке містить гліцерин як стабільне джерело вуглецю, пептон як джерело органічного азоту, фосфатний буфер та комплекс

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

мінеральних солей. Розрахунок маси кожного з компонентів для приготування необхідного чистого об'єму поживного середовища на кожній стадії наведено в таблиці 2.4.

Таблиця 2.4 — Розрахунок кількості компонентів поживного середовища за стадіями

Компоненти середовища	Настільний ферментер 5 л (2,53 л)	Інокулятор 40 л (24,7 л)	Інокулятор 400 л (244,5 л)	Виробничий ферментер 4000 л (2420 л)
Гліцерин, г	37,95	370,50	3667,50	36 300,0
Пептон, г	25,30	247,00	2445,00	24 200,0
KH_2PO_4 г	3,795	37,05	366,75	3630,0
Na_2HPO_4 , г	3,795	37,05	366,75	3630,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, г	1,265	12,35	122,25	1210,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ г	0,0253	0,247	2,445	24,20

Лабораторний етап є першою стадією відновлення та накопичення життєздатної біомаси штаму *Pseudomonas chlororaphis* MA342 після зберігання у колекційному стані (на косяках або в ліофілізованому вигляді). Вирощування здійснюється у конічних колбах Ерленмеєра сумарним корисним об'ємом поживного середовища 0,25 л. Для забезпечення інтенсивного масообміну та насичення розчину киснем під час культивування на круговій качалці, коефіцієнт заповнення колб становить 0,2.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Для цієї лабораторної стадії обґрунтовано використання готового сухого комерційного поживного середовища King's B . Використання готової промислової суміші дозволяє значно пришвидшити адаптацію і вихід культури з лаг-фази, стандартизувати умови вирощування, а також повністю виключає необхідність роздільного приготування композицій солей, оскільки виробником у процесі дегідратації вже враховано фактор стабільності мікроелементів.

2.4.1.2 Обґрунтування приготування поживного середовища для колб та настільного ферментера об'ємом 5 л

Для культивування *Pseudomonas chlororaphis* MA342 використовується комплексне поживне середовище такого складу (г/л):

- Гліцерин — 15 г/л
- Пептон — 10 г/л
- KH_2PO_4 — 1,5 г/л
- Na_2HPO_4 — 1,5 г/л
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 г/л
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01 г/л

Оскільки середовище є багатоконпонентним і містить термолабільні компоненти, його готують у вигляді двох окремих композицій з подальшою роздільною стерилізацією. Такий підхід дозволяє уникнути карамелізації гліцерину, утворення фосфатних осадів та окислення солей заліза.

Для розведення використовують дистильовану воду. Настільний ферментер заповнюється на 56% .

З метою оптимізації працевитрат і зниження ризику інфікування середовище готують у вигляді двох композицій:

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Композиція 1: Гліцерин, пептон, KH_2PO_4 Na_2HPO_4 Na_2HPO_4 , вода. Завдяки хімічній стабільності гліцерину (який є триатомним спиртом і не зазнає карамелізації, на відміну від глюкози), його можна стерилізувати сумісно з амінокислотами пептону.

Композиція 2: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, вода (малий об'єм). Готується окремо, щоб уникнути взаємодії іонів магнію та заліза з фосфатами та запобігти випадінню нерозчинного осаду під час нагрівання.

Стерилізація обох композицій для колб та настільного апарата здійснюється в паровому автоклаві за температури 121°C протягом 30 хвилин під надлишковим тиском 0,11 МПа. Роздільна стерилізація гарантує збереження прозорості субстрату та повної біологічної доступності всіх елементів живлення бактерій. Після автоклавування та охолодження розчинів до температури 30°C . Композицію 2 асептично додають до Композиції 1 в умовах ламінарного боксу.

2.4.1.3 Обґрунтування та приготування поживного середовища для інокулятора об'ємом 40 л

На третьому етапі масштабування для отримання 3-ї генерації посівного матеріалу використовують малий промисловий інокулятор загальним об'ємом 40 л. Робочий чистий об'єм поживного середовища в цьому апараті становить 24,7 л (коефіцієнт заповнення — 0,62). Використання окремого лабораторного посуду на цій стадії є недоцільним через значні об'єми рідини, ускладнення схеми асептичного зливання та різке підвищення ризику контамінації сторонньою мікрофлорою.

Для оптимізації процесу підготовки та захисту від випадіння фосфатних осадів середовище розділяють на дві технологічні композиції:

Композиція №1 (Вуглеводно-азотна основа з буферною системою): Включає основний об'єм води, а також гліцерин (370,50 г), пептон (247,00 г), KH_2PO_4 (37,05 г) та Na_2HPO_4 (37,05 г). Компоненти розчиняють у допоміжній ємності-змішувачі

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

та перекачують безпосередньо в корпус інокулятора об'ємом 40 л. Стерилізація Композиції №1 здійснюється безпосередньо *in situ* (на місці) в інокуляторі шляхом барботування «гострої» сухої насиченої пари через барботер апарата. Параметри стерилізації: температура 121 °С, надлишковий тиск 0,11 МПа, тривалість витримки — 30 хвилин. Стерилізація гліцерину та пептону за таких умов не призводить до меланоїдиноутворення завдяки нейтральному початковому рівню рН розчину (6,8–7,2).

Композиція №2 (Стабілізований сольовий концентрат): містить солі макро- та мікроелементів $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (12,35 г) та $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,247 г). Концентрат готують в окремому мірнику у невеликій кількості води (близько 0,5–0,7 л, що становить 2–3 % від загального об'єму стадії). Для повного запобігання гідролізу солей заліза та переходу активних іонів Fe^{2+} у нерозчинну форму Fe^{3+} розчин композиції підкислюють 0,1 М розчином соляної кислоти до стабільного рівня рН 4,5–5,0.

Стерилізація Композиції №2 здійснюється термічним способом в окремому винесеному лабораторному або цеховому стерилізаторі (121 °С, 30 хв). Після завершення процесу термічної витримки Композиції №1 в інокуляторі та її охолодження за допомогою подачі холодної води в сорочку апарата до температури 30 °С, стерильний розчин Композиції №2 передається в інокулятор під тиском стерильного стисненого повітря через спеціальний вузол асептичного завантаження.

2.4.1.4 Обґрунтування та приготування поживного середовища для інокулятора об'ємом 400 л

На четвертому етапі масштабування для отримання 4-ї (передгенераційної) стадії посівного матеріалу використовують промисловий інокулятор загальним об'ємом 400 л. Робочий чистий об'єм поживного середовища в апараті становить 244,5 л (коефіцієнт заповнення — 0,61). Приготування такого об'єму здійснюється

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

суворо за двокомпозиційною технологічною схемою у допоміжних цехових ємностях.

Масове завантаження компонентів середовища масштабується відповідно до робочого об'єму апарата:

Композиція №1: Складається з основного об'єму води, промислового гліцерину (3667,50 г або 3,67 кг), пептону (2445,00 г або 2,45 кг), солей KH_2PO_4 (366,75 г) та Na_2HPO_4 (366,75 г). Сухі речовини та гліцерин завантажують у цеховий реактор-змішувач, ретельно гомогенізують мішалкою до повного розчинення і перекачують насосом у корпус інокулятора на 400 л. Стерилізацію розчину проводять методом *in situ* за допомогою подачі «гострої» насиченої пари через внутрішній барботер промислового апарата. Режим термічного оброблення: температура 121 °С, надлишковий тиск пари 0,11 МПа, час витримки — 30 хвилин. Спільна стерилізація пептону та гліцерину є безпечною і не викликає деструкції амінокислот за умов підтримання регламентного значення рН розчину.

Композиція №2: Включає наважки магнію сульфату $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (122,25 г) та залізо сульфату $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,445 г). Солі розчиняють у 5–7 літрах очищеної води в окремому закритому цеховому мірнику. Для стабілізації іонів двовалентного заліза та запобігання утворенню пластівців гідроксиду заліза, у розчин вводять 0,1 М розчин соляної кислоти, змішуючи показник рН у кислу зону (4,5–5,0).

Стерилізацію Композиції №2 проводять термічно в автономному винесеному апараті-стерилізаторі за стандартних параметрів (121 °С, 30 хв). Після завершення стерилізації основного об'єму середовища (Композиції №1) в інокуляторі на 400 л та його примусового охолодження через сорочку апарата зворотньою водою до робочої температури культивування бактерій (30 °С), рідкий концентрат Композиції №2 асептично вдавлюють у корпус інокулятора за допомогою надлишкового тиску стерильного стисненого повітря через монтажну лінію завантаження.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

2.4.1.5 Приготування поживного середовища для виробничого ферментера об'ємом 4 м³

Для головного промислового біореактора об'ємом 4000 л чистий об'єм рідкого поживного середовища становить 2420 л. Компоненти середовища зважують на промислових технічних вагах у ваговій кімнаті біотехнологічного цеху з точністю, регламентованою технологічною інструкцією (маси завантаження наведені в табл. 2.4).

Технологічний процес приготування та стерилізації аналогічний попереднім стадіям і базується на двокомпонентній схемі, що дозволяє суттєво скоротити витрати пари та кількість запірно-регулюючої арматури:

Композиція 1: Сухі речовини (24,2 кг пептону, по 3,63 кг фосфатів калію та натрію) завантажують у ємність для приготування середовища, куди подають розрахункову кількість очищеної водопровідної води та заливають 36,3 кг промислового гліцерину. Розчин перемішують за допомогою мішалки ємності до повного розчинення сухих речовин та перекачують у виробничий ферментер об'ємом 4000 л. Стерилізацію Композиції 1 проводять безпосередньо у ферментері шляхом барботування гострої насиченої пари через барботер апарата під тиском до досягнення температури 121 °С з витримкою протягом 30 хвилин.

Композиція 2: Солі $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,21 кг) та $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (24,2 г) розчиняють у 50 літрах води в окремому закритому апараті-маточнику. Розчин стабілізують додаванням HCl до рН 4,5.

Оскільки іони заліза під час тривалого термічного оброблення у великих об'ємах схильні до швидкого окиснення та деструкції, стерилізацію Композиції 2 для виробничого ферментера доцільно проводити «холодним» способом — шляхом мікрофільтрації під тиском через мембранний стерилізуючий фільтр із розміром пор 0,22 мкм.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Введення стерильної Композиції 2 у виробничий ферментер здійснюють у потоці безпосередньо в лінію подачі поживного середовища або через монтажний штуцер після повного охолодження основного об'єму Композиції 1 в апараті до робочої температури культивування штаму *Pseudomonas chlororaphis* MA342 30 °C

Застосування такої двокомпонентної системи з комбінованим типом стерилізації забезпечує абсолютну мікробіологічну чистоту процесу, виключає утворення баластних або токсичних сполук, запобігає забиванню аераційних елементів осадом солей та створює оптимальні умови для високої продуктивності біосинтезу.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

3.1 Таксономічний статус

Біологічним агентом для виробництва біопрепарату обрано штам *Pseudomonas chlororaphis* МА342.

Таксономічна характеристика штаму така:

- Домен: Bacteria
- Клас: Gammaproteobacteria
- Порядок: Pseudomonadales
- Родина: Pseudomonadaceae
- Рід: Pseudomonas
- Вид: Pseudomonas chlororaphis
- Штам: МА342

Pseudomonas chlororaphis МА342 є грамнегативною, неспороутворюючою, аеробною паличкоподібною бактерією, яка належить до вільноживучих ризосферних мікроорганізмів. Штам широко використовується у світовій практиці для виробництва комерційних біопрепаратів завдяки високій колонізаційній здатності ризосфери, антагоністичній активності та безпечності [11, 6].

3.2 Морфолого-культурні ознаки

Клітини *Pseudomonas chlororaphis* МА342 мають вигляд прямих або злегка зігнутих грамнегативних паличок розміром $0,6\text{--}0,8 \times 1,5\text{--}3,0$ мкм. Вони рухливі завдяки наявності полярного джгутика. Бактерії утворюють капсулу та екзополісахариди, що сприяє їхній адгезії до поверхні коренів рослин.

					КР.ПЗ.162.11				
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата					
Розробив		Карімова Айнур			РОЗДІЛ 3		Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Охмат О.А.					Д	№ арк	кіль. в розділі
							КНУТД, БЗБТ-22		
Н.Контр.									
Затвердив									

На поживних середовищах (King's B, Nutrient Agar, LB-агар) штам утворює круглі, опуклі, слизуваті колонії діаметром 3–6 мм з рівними краями.

Молоді колонії мають кремовий або жовтуватий колір, з часом набувають зеленувато-оранжевого або зеленого відтінку завдяки синтезу пігментів феназинової природи.

На середовищі King's B спостерігається характерна флуоресценція під ультрафіолетовим світлом завдяки продукуванню піовердину. Оптимальна температура росту становить 28–30 °С. Культура добре росте в діапазоні рН 6,0–8,0, оптимальне значення — 6,8–7,2. На рідких середовищах утворює рівномірну каламуть і тонку плівку на поверхні [3, 4].

3.3 Фізіологічні та біохімічні ознаки

Pseudomonas chlororaphis MA342 є облігатним аеробом з високою інтенсивністю дихання. Штам позитивний за тестами на каталазу та оксидазу, не утворює індол і сірководень, не гідролізує крохмаль, не редукує нітрати до нітритів.

Найважливішими біохімічними особливостями є:

- Здатність продукувати антибіотики (2,4-діацетилфлороглюцинол, феназини), які забезпечують антагоністичну дію проти фітопатогенів;
- Синтез сидерофорів (піовердин), що дозволяє ефективно конкурувати за залізо в ризосфері;
- Продукування гідролітичних ферментів (хітидази, протеази, β -глюканази), які руйнують клітинні стінки патогенних грибів;
- Синтез індол-3-оцтової кислоти (ІОК), що стимулює розвиток кореневої системи рослин;
- Здатність розчиняти важкорозчинні фосфати, підвищуючи їх доступність для рослин [15].

Штам проявляє добру антагоністичну активність щодо багатьох фітопатогенних грибів (*Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Botrytis cinerea*) та деяких бактерій. Він також здатний індукувати системну резистентність

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

рослин. *Pseudomonas chlororaphis* МА342 не є патогенним для людини, тварин і рослин, не продукує токсинів і вважається безпечним для навколишнього середовища [11, 6].

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Опис технологічної схеми

Технологічна схема отримання біопрепарату на основі *Pseudomonas chlororaphis* MA342 включає допоміжні роботи, підготовку посівного матеріалу, виробниче культивування, зберігання культуральної рідини та знешкодження відходів.

ДР.1. Санітарна підготовка виробництва

ДР.1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1. Інструктаж персоналу

Виробничий персонал зобов'язаний пройти вступний та періодичний інструктаж з техніки безпеки, пожежної безпеки, санітарно-гігієнічних вимог та роботи з живими мікроорганізмами. Оскільки персонал є одним з головних джерел контамінації, кожен працівник повинен пройти медичний огляд та відповідати кваліфікаційним вимогам. Перед початком робіт працівники проходять обов'язковий інструктаж щодо правил роботи в асептичних умовах, запобіжних заходів при роботі з обладнанням та мікроорганізмами, а також основ гігієни та санітарії.

Вхід у виробничі приміщення дозволяється виключно через санітарний пропускник. Виробничі зони доступні тільки для персоналу, безпосередньо залученого до технологічного процесу. Вхід стороннім особам категорично забороняється.

ДР 1.1.2. Медичний огляд

Медичні огляди працівників проводяться не рідше одного разу на рік або частіше за необхідності за рахунок роботодавця. Метою огляду є оцінка фізичного стану персоналу та виявлення медичних протипоказань, що може вплинути на безпеку виробництва та якість продукції.

					КР.ПЗ.162.11			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив	Карімова Айнур				РОЗДІЛ 4	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірів	Охмат О.А.					Д	№ арк	кіль. в розділі
						КНУТД, БЗБТ-22		
Н.Контр.								
Затвердив								

ДР 1.1.3. Підготовка одягу

Основне завдання спеціального одягу полягає у створенні надійного бар'єра між працівником, умовами виробництва та продукцією, мінімізуючи ризик мікробної контамінації. Працівники зобов'язані перебувати в спеціальному одязі, який відповідає специфіці виробничої зони (комбінезони, халати, шапочки, маски, взуття). Після завершення роботи одяг підлягає зняттю в спеціально відведеному місці, збору в марковані контейнери та дезінфекції перед пранням. Одяг, що використовувався під час роботи з живими культурами мікроорганізмів, проходить обов'язкову дезінфекцію. Матеріал спецодягу повинен бути міцним, антистатичним, не линяти, не залишати волокон та бути стійким до дії дезінфікуючих засобів.

ДР.1.2. Підготовка мийних та дезінфікуючих засобів

Для миття, очищення та дезінфекції основного технологічного обладнання (промислових ферментерів, інокуляторів), запірної арматури, трубопроводів та допоміжного інвентарю використовується універсальний мийно-дезінфікуючий засіб «Санікон» виробництва ТОВ «Інтердез» (Україна). Препарат являє собою концентрований рідкий засіб на основі синергічного комплексу четвертинних амонієвих сполук (ЧАС), третинних алкіламінів та неіоногенних поверхнево-активних речовин (ПАР) з вираженою лужною реакцією [21].

Приготування робочих розчинів засобу «Санікон» здійснюють у спеціально виділеному приміщенні підготовки мийних засобів. Для забезпечення ефективного видалення білково-жирових забруднень та руйнування бактеріальних біоплівки у ферментаційному блоці готують робочі розчини з концентрацією 0,5–2,0 % залежно від ступеня забруднення апаратів після зливу культуральної рідини.

ДР.1.2.1. Підготовка дезінфекційних засобів для приміщень

Після закінчення робіт проводиться прибирання виробничої зони з використанням дозволених мийних та дезінфікуючих засобів. Робочі розчини готують у тарі з корозійностійких матеріалів, обов'язково маркують (назва засобу, концентрація, дата приготування, термін придатності). Для приготування розчинів

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

використовується вода, що відповідає вимогам ДСТУ 7525:2014 «Вода питна. Гігієнічні вимоги та контроль за якістю».

Дезінфекційний розчин рекомендується змінювати кожні 3 місяці з метою запобігання утворенню резистентних форм мікроорганізмів.

З метою підтримання належного санітарно-гігієнічного режиму в чистих зонах біотехнологічного цеху, знищення вегетативних форм сторонніх мікроорганізмів та запобігання контамінації культури *Pseudomonas*, на цій стадії здійснюють централізоване приготування робочих розчинів мийно-дезінфікуючих засобів, які були обґрунтовані у підрозділі 2.2.3.

Приготування робочих розчинів проводиться у спеціально виділеному приміщенні підготовки деззасобів апаратником санітарного оброблення з дотриманням правил техніки безпеки та використанням засобів індивідуального захисту (рукавички, захисні окуляри, фартух).

Технологічний процес підготовки засобів розділяють на два самостійні потоки:

1.2.2. Приготування робочого розчину засобу «Санікон»

Для проведення автоматизованого СІР-миття внутрішніх поверхонь ферментерів, інокуляторів, мірників та трубопроводів, а також для ручної обробки знімних деталей (штуцерів, клапанів, прокладок) готують водний розчин засобу «Санікон» у робочій концентрації 1,0% або 2,0%

Технологія приготування: у спеціальну градуйовану пластикову або емальовану ємність заливають розрахункову кількість питної або очищеної води кімнатної температури 18-25 С. Слідом за цим, за допомогою мірного циліндра, асептично додають концентрат препарату «Санікон» із розрахунку 10 мл (для 1 % розчину) або 20 мл (для 2 % розчину) на кожні 990 або 980 мл води відповідно.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Розчин ретельно перемішують пластиковою мішалкою до досягнення повної гомогенності.

Умови зберігання: готовий робочий розчин «Санікон» стабільний, не втрачає своїх мийно-демульгуючих та бактерицидних властивостей і може зберігатися у закритій тарі зі щільною кришкою протягом 14 діб з моменту приготування, за умови відсутності видимого механічного забруднення чи зміни кольору.

1.2.2 Приготування робочого розчину засобу «Бланідас Актив»

Для регулярного вологого прибирання, дезінфекції огорожувальних будівельних конструкцій чистих зон (епоксидної наливної підлоги, кахельних стін, герметичних дверей), а також для протирання зовнішніх кожухів великогабаритного обладнання готують водний розчин безальдегідного концентрату «Бланідас Актив» у робочій концентрації 0,25 0,5 %.

Технологія приготування: у мірну технологічну тару наливають необхідний об'єм водопровідної води. Додають концентрат «Бланідас Актив» з розрахунку 2,5 мл або 5,0 мл препарату на кожний 1 літр готового розчину. Суміш акуратно перемішують.

Умови зберігання: робочі розчини «Бланідас Актив» підлягають маркуванню із зазначенням назви, концентрації, дати та часу приготування. Термін придатності готового розчину у щільно закритій тарі становить 14 діб. Розчин використовують безпосередньо під час проведення санітарних змін цеху або поточних прибирань наприкінці кожної робочої зміни.

Всі підготовлені робочі розчини проходять обов'язковий візуальний контроль (мають бути прозорими, без сторонніх пластівців та осаду). Готові розчини засобу «Санікон» за допомогою насосів або самопливом завантажують у баки СІР-станції ферментаційного блоку, а розчини «Бланідас Актив» розподіляють по

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

сертифікованих пластикових промаркованих ємностях для санітарного інвентарю чистих приміщень [21, 22].

ДР.1.3. Підготовка ферментера

ДР.1.3.1. Огляд, миття та ополіскування апарату

Після завершення виробничого циклу ферментер зупиняють, проводять візуальний огляд і перевіряють технічний стан обладнання. Після цього переходять до миття.

Оскільки обраний ферментер BIOSTAT® STR обладнаний системою CIP-миття (Cleaning In Place), використовується саме цей автоматизований метод. Основні етапи CIP-миття включають:

1. Видалення залишків культуральної рідини шляхом зливу та витіснення стисненим стерильним повітрям або водою.
2. Попереднє промивання для видалення основної маси забруднень і досягнення фізичної чистоти поверхонь.
3. Миття мийно-дезінфікуючим розчином .
4. Остаточне ополіскування чистою водою для видалення залишків мийного засобу та дезінфікуючих розчинів .

ДР.1.3.2. Перевірка на герметичність

Перед проведенням стерилізації парою обов'язково виконується перевірка герметичності ферментера. Основний і найбільш поширений метод — тест з мильним розчином: на всі з'єднання, фланці, ущільнення, люки та вентиля наноситься мильний або спеціальний індикаторний розчин. Після цього ферментер герметично закривають і подають насичену водяну пару з надлишковим тиском (зазвичай 0,2–0,3 МПа) протягом 20–30 хвилин. Поява бульбашок на будь-якому з'єднанні свідчить про порушення герметичності, яке потребує негайного усунення.

Крім тесту з мильним розчином, на практиці застосовують такі додаткові методи перевірки герметичності:

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Вакуумний тест — у ферментері створюють вакуум за допомогою вакуумного насоса і спостерігають за швидкістю падіння вакууму протягом певного часу. Швидке падіння тиску вказує на наявність витоків.

Тест з надлишковим тиском — ферментер заповнюють стисненим стерильним повітрям або азотом до робочого тиску і витримують протягом 30–60 хвилин. Фіксують падіння тиску за допомогою точних манометрів. Допустиме падіння тиску зазвичай не перевищує 0,05 бар за 30 хвилин.

Гелієвий тест — високоточний метод, при якому використовується гелій як індикаторний газ. Застосовується для особливо відповідального обладнання або після капітального ремонту.

Візуальний огляд з ультрафіолетовим індикатором — на з'єднання наноситься спеціальний флуоресцентний розчин, після чого проводиться огляд під УФ-світлом.

На виробництві найчастіше поєднують тест з мильним розчином і тест з надлишковим тиском, оскільки вони є достатньо надійними, простими у виконанні та не вимагають складного додаткового обладнання.

У разі виявлення будь-яких витоків герметичність відновлюють шляхом підтягування з'єднань, заміни прокладок або ущільнень, після чого перевірку повторюють.

ДР 1.3.3. Стерилізація обладнання

Перед початком стерилізації в сорочку ферментера подають пару для рівномірного прогріву та запобігання деформації апарату. Після цього в розігрітий ферментер подають гостру пару до досягнення температури стерилізації 130–135 °С і витримують протягом 60 хвилин. Після завершення стерилізації апарат поступово охолоджують до температури 30–40 °С, після чого він вважається готовим до наступного завантаження поживного середовища.

ДР.1.4. Підготовка приміщень

ДР.1.4.1. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання виробничих приміщень проводиться після кожної зміни. Прибирання виконується у два етапи. Спочатку видаляють виробничі

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

відходи та механічні забруднення, після чого здійснюють вологе прибирання з використанням відповідних мийних і дезінфікуючих засобів та спеціального обладнання.

ДР.1.4.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводиться один раз на місяць або позапланово — при виявленні значного забруднення. Воно включає ретельне і повне очищення приміщень, чищення важкодоступних місць, дезінфекцію поверхонь, стін, підлоги, стелі та обладнання з метою видалення сильних забруднень і знищення бактерій, грибків.

ДР 2. Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря

Забір повітря здійснюється за допомогою повітрозабірника, встановленого на висоті приблизно 30–40 м над рівнем землі в найменш забруднених ділянках виробничої території.

ДР 2.2 Очищення повітря від пилу та механічних частинок

На першому етапі повітря проходить грубу очистку для видалення великих і зважених частинок. Це дозволяє видалити до 80 % механічних забруднень. Рекомендований кінцевий перепад тиску на фільтрах грубої очистки становить не більше 250 Па.

ДР 2.3 Стиснення повітря

Стиснення повітря відбувається в компресорі при температурі 120–200 °С і тиску близько 0,35 МПа.

ДР 2.4 Охолодження повітря та видалення вологи

Після стиснення повітря охолоджується в теплообміннику до температури 25–30 °С. Сконденсована волога видаляється в ресивері для запобігання потрапляння вологи у подальші стадії підготовки повітря.

ДР 2.5 Нагрівання повітря

Повітря нагрівається в теплообміннику до температури близько 50 °С, що сприяє зниженню відносної вологості до 50 %.

ДР 2.6 Очищення повітря за допомогою фільтрів тонкої очистки

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

На цьому етапі повітря проходить тонку очистку, яка дозволяє видалити дрібні частинки і забезпечити чистоту повітря до 95 %.

ДР 2.7 Очищення повітря в індивідуальних фільтрах

Перед подачею в інокулятори та ферментер повітря додатково очищається за допомогою індивідуальних стерилізуючих фільтрів з високим ступенем очистки. Це забезпечує необхідний рівень стерильності повітря, що подається безпосередньо в культуральне середовище.

Така багатоступенева система підготовки аераційного повітря гарантує захист культури від контамінації та підтримує оптимальні умови аерації протягом усього процесу ферментації.

ДР 3. Приготування титрувальних розчинів

Оскільки в процесі біосинтезу *Pseudomonas chlororaphis* виділяє продукти метаболізму, які можуть змінювати рівень рН культурального середовища, необхідно підготувати титрувальні розчини для його корекції (підкислення або підлуження).

ДР 3.1. Приготування 6 %-го титрувального розчину HCl

Розрахунок необхідної кількості 37 %-ї концентрованої соляної кислоти HCl та дистильованої води для приготування 6 %-го робочого розчину наведено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 — Розрахунок кількості HCl для приготування 6 %-го титрувального розчину

Об'єм апарату	Об'єм 6 % HCl для титрування, мл	Кількість 37 % HCl для приготування, мл	Кількість води, мл	Тара для приготування та зберігання
Інокулятор 40 л (середовище 24,7 л)	50	8,1	41,9	Лабораторна колба 100 мл

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Об'єм апарату	Об'єм 6 % HCl для титрування, мл	Кількість 37 % HCl для приготування, мл	Кількість води, мл	Тара для приготування та зберігання
Інокулятор 400 л (середовище 244,5 л)	500	81,0	419,0	Лабораторна колба 1 л
Виробничий ферментер 4000 л (середовище 2420 л)	5000	810,0	4190,0	Бутель скляний або каністра 10 л

ДР 3.1.1. Приготування розчину HCl для підкислення середовища в інокуляторі об'ємом 40 л

У мірну лабораторну колбу об'ємом 100 мл вносять 41,9 мл дистильованої води, після чого обережно (по стінці судини) додають 8,1 мл концентрованої 37 %-ї HCl і ретельно перемішують круговими рухами. Колбу закривають шліфованою скляною пробкою. Розчин є самостерильним завдяки низькому значенню рН і додатковій термічній стерилізації не підлягає.

ДР 3.1.2. Приготування розчину HCl для підкислення середовища в інокуляторі об'ємом 400 л

У термостійку лабораторну колбу об'ємом 1 л вносять 419,0 мл дистильованої води, до якої мірним циліндром додають 81,0 мл 37 %-ї концентрованої соляної кислоти. Розчин ретельно перемішують до однорідності. Колбу щільно закривають скляною пробкою або силіконовою кришкою.

ДР 3.1.3. Приготування розчину HCl для підкислення середовища у виробничому ферментері об'ємом 4000 л

У чистий промисловий скляний бутель або поліетиленову каністру об'ємом 10 л вносять 4190,0 мл (4,19 л) дистильованої води. Особа, яка готує розчин, у захисних окулярах та гумових рукавичках під витяжною шафою обережно вливає

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

туди 810,0 мл концентрованої 37 %-ї соляної кислоти. Розчин гомогенізують перемішуванням і герметично закривають гвинтовою кришкою.

ДР 3.2. Приготування 6 %-го титрувального розчину NaOH

Розрахунок необхідної кількості сухого кристалічного гідроксиду натрію NaOH для приготування 6 %-го робочого розчину підлучення наведено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 — Розрахунок кількості NaOH для приготування 6 %-го титрувального розчину

Найменування апарату	Об'єм 6 % NaOH для титрування, мл	Кількість кристалічного NaOH, г	Об'єм води, мл
Інокулятор 40 л (середовище 24,7 л)	60	3,6	56,4
Інокулятор 400 л (середовище 244,5 л)	600	36,0	564,0
Виробничий ферментер 4000 л (середовище 2420 л)	6000	360,0	5640,0

ДР 3.2.1. Приготування 6 %-го розчину NaOH для підлучення середовища в інокуляторі об'ємом 40 л

У термостійку колбу об'ємом 100 мл вносять 56,4 мл дистильованої води. На лабораторних вагах зважують 3,6 г кристалічного лугу NaOH і поступово, малими порціями додають у воду, безперервно перемішуючи до повного розчинення (ураховуючи екзотермічний ефект виділення тепла). Колбу закривають ватно-марлевою пробкою з фольгою та стерилізують в автоклаві за 121 °C протягом 20 хвилин.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

ДР 3.2.2. Приготування 6 %-го розчину NaOH для підлужнення середовища в інокуляторі об'ємом 400 л

У лабораторну колбу об'ємом 1 л наливають 564,0 мл дистильованої води. Шляхом насипання додають 36,0 г кристалічного гідроксиду натрію. Розчин ретельно перемішують магнітною мішалкою до повного зникнення кристалів солі. Колбу захищають ковпаком і направляють на термічну стерилізацію в автоклав (121 °С, 20 хв).

ДР 3.2.3. Приготування 6 %-го розчину NaOH} для підлужнення у виробничому ферментері об'ємом 4000 л

У нержавіючу або спеціальну товстостінну пластикову цехову ємність об'ємом 10 л заливають 5640,0 мл (5,64 л) води. Апаратник порціями додає 360,0 г технічного або чистого лугу NaOH у кристалах, перемішуючи розчин механічною мішалкою до повного розчинення.

Зважаючи на значний об'єм, розчин лугу для виробничого ферментера стерилізують або безпосередньо в окремому вогневому мірнику-стерилізаторі титрувальних розчинів, або пропускають через термостійку лінію стерилізації.

Готові та охолоджені титрувальні розчини підлягають обов'язковому технологічному маркуванню (із зазначенням назви розчину, точної концентрації, дати приготування та підпису відповідального лаборанта) і зберігаються у щільно закритій тарі за кімнатної температури.

ДР 4 Приготування поживних середовищ

ДР 4.1 Приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу в колбах

Для вирощування посівного матеріалу *Pseudomonas chlororaphis* MA342 у колбах використовують модифіковане середовище King's B або готове сухе

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

поживне середовище на основі гліцерину. Це середовище забезпечує швидку адаптацію і активний початковий ріст культури.

Для приготування 250 мл середовища в колбу об'ємом 0,5 л на електронних вагах зважують необхідну кількість сухого порошку. У колбу наливають 250 мл дистильованої води, додають порошок і ретельно перемішують при нагріванні до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію проводять в автоклаві при 121 °С протягом 15–20 хвилин.

ДР 4.2 Приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу в настільному ферментері об'ємом 5 л

Для настільного лабораторного ферментера об'ємом 5 л (2-га генерація інокуляту) використовують багатокомпонентне промислове поживне середовище на основі гліцерину та пептону. Загальний корисний робочий об'єм середовища становить 2,53 л. Оскільки середовище містить солі фосфатів та іони двовалентних металів, які під час сумісної теплової обробки утворюють нерозчинні пластинчасті осади, процес підготовки розділяють на дві технологічні композиції.

Розрахунок кількості компонентів для приготування 2,53 л поживного середовища:

Композиція №1 : гліцерин — 37,95 г; пептон — 25,30 г; K_2HPO_4 — 3,80 г; Na_2HPO_4 — 3,80 г. Компоненти розчиняють у 2,3 л дистильованої води безпосередньо у скляній судині ферментера (або у допоміжній скляній бутлі) при нагріванні та ретельному механічному перемішуванні.

Композиція №2 : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,27 г; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,025 г (25 мг). Солі розчиняють окремо у 230 мл дистильованої води в лабораторній колбі об'ємом 500 мл. Для запобігання гідролізу заліза та переходу Fe^{2+} у Fe^{3+} розчин підкислюють декількома краплями 0,1 М розчину HCl до рівня pH 4,5–5,0.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Стерилізацію здійснюють в автоклаві при температурі 121 °С протягом 20 хвилин. Після завершення термічної витримки та охолодження обох розчинів до температури 30 °С, Композицію №2 в асептичних умовах ламінарного боксу переливають у ферментер до Композиції №1. Після ретельного перемішування рівень рН середовища автоматично коригують до оптимального значення 6,8–7,2 за допомогою титрувальних розчинів.

ДР 4.3 Приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л

Для інокулятора об'ємом 40 л використовують багатокomпонентне поживне середовище промислового складу. Робочий чистий об'єм поживного середовища в апараті становить 24,7 л. З метою запобігання деструкції поживних речовин та утворення нерозчинних сполук під час термічної обробки *in situ*, процес приготування розділяють на дві технологічні композиції.

Таблиця 4.3 — Розрахунок кількості компонентів для приготування поживного середовища в інокуляторі 40 л

Компонент	Кількість компонентів	Композиція
Гліцерин	370,50 г	1
Пептон	247,00 г	1
KH ₂ PO ₄	37,05 г	1
Na ₂ HPO ₄	37,05 г	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	12,35 г	2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,247 г	2

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

ДР 4.3.1 Підготовка та стерилізація композиції 1

У допоміжну ємність-змішувач додають приблизно 80 % дистильованої води від об'єму стадії. Послідовно вносять гліцерин, пептон, KH_2PO_4 та Na_2HPO_4 . Суміш інтенсивно перемішують до повного розчинення і насосом перекачують безпосередньо в корпус інокулятора 40 л. Стерилізацію Композиції №1 проводять безпосередньо в апараті (*in situ*) шляхом барботування гострої сухої насиченої пари при температурі 121 °С протягом 30 хв.

ДР 4.3.2 Підготовка та стерилізація композиції 2

Композицію №2 (магній сульфат та залізо сульфат) готують окремо у невеликому об'ємі води (близько 0,7 л) в окремому мірнику. Для стабілізації іонів двовалентного заліза та повного запобігання їхньому гідролізу розчин підкислюють 0,1 М розчином соляної кислоти до рівня рН 4,5–5,0. Стерилізацію сольового концентрату здійснюють термічним періодичним способом в автономному автоклаві при 121 °С протягом 30 хвилин.

Після завершення автоклавування та примусового охолодження основного об'єму Композиції №1 в інокуляторі за допомогою сорочки до робочої температури 30 °С, охолоджену стерильну Композицію №2 асептично вдавлюють в апарат під тиском стерильного стисненого повітря через вузол асептичного завантаження. Після об'єднання і короткочасного перемішування рівень рН середовища коригують до меж 6,8–7,2 за допомогою титрувальних розчинів.

ДР 4.4 Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 400 л та виробничого ферментера

Для промислового інокулятора об'ємом 400 л (робочий об'єм середовища 244,5 л) та головного виробничого ферментера об'ємом 4000 л (робочий об'єм середовища 2420 л) використовується уніфіковане багатокomпонентне промислове середовище на основі гліцерину. Кількість завантажуваних компонентів

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

масштабується строго пропорційно робочому об'єму відповідного апарата. Поділ технологічного потоку на дві композиції та базові параметри стерилізації залишаються аналогічними попередній стадії.

Таблиця 4.4 — Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для апаратів великого об'єму

Компонент	Маса для інокулятора 400 л	Маса для ферментера	Композиція
Гліцерин	3667,50 г (3,67 кг)	36300,0 г (36,30 кг)	1
Пептон	2445,00 г (2,45 кг)	24200,0 г (24,20 кг)	
KH_2PO_4	366,75 г	3630,0 г (3,63 кг)	
Na_2HPO_4	366,75 г	3630,0 г (3,63 кг)	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	122,25 г	1210,0 г (1,21 кг)	2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,445 г	24,20 г	

ДР 4.4.1 Підготовка та стерилізація композиції 1

У цеховий реактор-змішувач додають приблизно 50–60 % води від загального розрахункового об'єму. Потім при ввімкненій мішалці завантажують гліцерин, пептон, дикалій- та динатрійфосфати. Суміш інтенсивно перемішують до повного розчинення сухих речовин, після чого готовий розчин насосом перекачують у відповідний цільовий апарат (інокулятор на 400 л або ферментер на 4000 л). Стерилізацію Композиції №1 проводять *in situ* безпосередньо в обладнанні шляхом подачі гострої пари в сорочку та барботер при температурі 121 °C протягом 30 хвилин.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

ДР 4.4.2 Підготовка та стерилізація композиції 2

Композицію №2 (солі магнію та заліза) готують у спеціальних стаціонарних цехових мірниках об'ємом 10 л (для інокулятора) та 50 л (для ферментера). Компоненти розчиняють у воді та стабілізують додаванням 0,1 М розчину соляної кислоти до рН 4,5–5,0.

Для інокулятора 400 л отриманий концентрат солей стерилізують термічно у винесеному автоклаві (121 °С, 30 хв).

Для великого виробничого ферментера 4000 л, з метою економії енергоресурсів та повного виключення термодеструкції заліза, розчин Композиції №2 стерилізують методом «холодної» мікрофільтрації, пропускаючи його під тиском через мембранний фільтраційний патрон з діаметром пор мікрофільтра 0,22 мкм.

Після завершення стерилізації та охолодження основного об'єму Композиції №1 в інокуляторі або ферментері до температури 30 °С, стерильний розчин мікроелементів (Композицію №2) асептично вдавлюють в апарат через монтажну лінію завантаження. Після ретельного гомогенізуючого перемішування системою мішалок біореактора рівень рН середовища автоматично доводять до регламентного значення 6,8–7,2 за допомогою титрувальних розчинів HCl та NaOH.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Культуру *Pseudomonas chlororaphis* MA342 зберігають у пробірках зі скошеним твердим середовищем King's B при температурі +4 °С. Пересіви культури здійснюються кожні 3–4 місяці в асептичних умовах.

ТП 5.2 Підготовка робочої культури

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Музейну культуру, що зберігається в пробірках зі скошеним середовищем King's B, пересівають на чашки Петрі для отримання ізолюваних колоній і вирощують у термостаті протягом 24 годин при температурі 28–30 °С.

ТП 5.3. Вирощування культури в колбах на качалках

У пробірку з робочою культурою вносять 5 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини і переносять одержану бактеріальну суспензію у колби з поживним середовищем. Культуру вирощують на качалці при швидкості 160–180 об/хв протягом 20–24 годин при температурі 28–30 °С. Після вирощування відбирають пробу для визначення концентрації життєздатних клітин та мікробіологічного контролю.

ТП 5.4. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 5 л

У інокулятор з простерилізованим поживним середовищем за допомогою засівної колби вносять посівний матеріал. Температура культивування становить 28–30 °С, рН 6,8–7,2 (автоматична корекція), швидкість перемішування — 200 об/хв. Тривалість культивування становить 24 години. Кожні 4 години відбувається відбір проб культуральної рідини для визначення концентрації життєздатних клітин (метод Коха) та здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 5.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 40 л

В інокулятор з композицією 1 (ПС від ДР 4.3.1, ДР 4.3.2, ДР 4.3.3) подають композицію 2 та композицію 3. рН середовища регулюється автоматично до значення 6,8–7,2 за допомогою 6 %-го розчину NaOH або HCl. За допомогою засівної колби вносять посівний матеріал. Температура культивування становить 28–30 °С, рН 6,8–7,2, швидкість перемішування — 200–250 об/хв. Тривалість культивування становить 24 години. Кожні 4 години відбувається відбір проб культуральної рідини для визначення концентрації життєздатних клітин та здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 5.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 400 л

В інокулятор з композицією 1 (ПС від ДР 4.4.1, ДР 4.4.2, ДР 4.4.3) самоплином подають композицію 1 та композицію 2. рН середовища регулюється автоматично до значення 6,8–7,2 за допомогою 6 %-го розчину NaOH або HCl.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Далі вносять посівний матеріал. Температура культивування становить 28–30 °С, рН 6,8–7,2, швидкість перемішування — 200–250 об/хв. Кожні 4 години відбувається відбір проб культуральної рідини для визначення концентрації життєздатних клітин та здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 6. Виробниче культивування

ТП 6.1. Виробничий біосинтез

Культивування проводять у ферментері геометричним об'ємом 4000 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 (робочий об'єм 2420 л). Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища, тобто 240 л.

У ферментері стерилізується композиція 1, яку після стерилізації охолоджують до 40–45 °С. Після охолодження в ферментер за допомогою стисненого стерильного повітря додають композиції 2 та 3. Після поєднання всіх композицій рівень рН доводять до 6,8–7,2 за допомогою 6 %-го розчину НСІ або NaOH.

Оскільки *Pseudomonas chlororaphis* є облігатним аеробом, після внесення посівного матеріалу вмикають подачу стерильного повітря через барботер і систему перемішування. Температуру в ферментері підтримують на рівні 28–30 °С за допомогою подачі пари або охолоджуючої води в сорочку апарату. Тривалість виробничого культивування становить 46–48 годин.

Під час культивування кожні 4 години здійснюють відбір проб культуральної рідини для мікробіологічного контролю чистоти культури та визначення концентрації життєздатних клітин. Через 40–48 годин у відібраній пробі концентрація життєздатних клітин повинна становити не менше 1×10^9 КУО/мл.

ТП.7 Зберігання культуральної рідини

ТП.7.1 Зберігання культуральної рідини

Після завершення виробничого культивування (ТП 6.1) культуральну рідину за допомогою насоса перекачують у стерильний збірник. Культуральну рідину зберігають при температурі +4...+10 °С до початку етапу фасування або подальшої переробки (концентрування, стабілізація). Тривалість зберігання не повинна

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

перевищувати 24–48 годин, щоб зберегти високу життєздатність клітин *Pseudomonas chlororaphis*.

ЗВ 8 Знешкодження відходів

ЗВ 8.1. Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи (залишки поживного середовища, промивні води після СІР-миття, конденсат) збирають і направляють на локальні очисні споруди або централізовані очисні споруди підприємства відповідно до вимог природоохоронного законодавства (від ДР 4, ДР 5, ДР 6).

ЗВ 8.2. Знешкодження відходів повітря

Відпрацьоване повітря з інокуляторів та ферментера (від ДР 2, ТП 5.4, ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 6.1) направляється в систему очищення відпрацьованого повітря (фільтри тонкої очистки або біофільтри) для запобігання викиду мікроорганізмів у навколишнє середовище.

ЗВ 8.3. Знешкодження твердих відходів

Відпрацьовану тару від миючих і дезінфікуючих засобів, використані фільтри та інші тверді відходи (від ДР 1.2.1, ДР 1.2.2, ДР 1.2.3) збирають у спеціально марковані контейнери і утилізують як небезпечні відходи відповідно до встановлених санітарних і екологічних норм.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 5 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

5.1 Мікробіологічний контроль

Контроль якості біопрепарату на основі *Pseudomonas chlororaphis* MA342 включає визначення концентрації життєздатних клітин, перевірку чистоти культури та виявлення можливих забруднень (контамінації).

Контроль концентрації біомаси у ферментері здійснюється автоматично за допомогою оптичних датчиків при довжинах хвиль 590–620 нм (вимірювання оптичної густини).

Кількість життєздатних бактерій визначають методом послідовних десятикратних розведень (метод Коха). Для цього одну частину культуральної рідини переносять у дев'ять частин стерильного фізіологічного розчину. Отримане розведення рівномірно наносять на поверхню поживного середовища в чашці Петрі стерильним шпателем Дригальського. Після інкубації підраховують кількість утворених колоній і розраховують концентрацію життєздатних клітин у КУО/мл.

Особливу увагу приділяють контролю забруднень (сторонньої мікрофлори). Для цього проводять:

Мікроскопічний контроль: зразок наносять у вигляді мазка на предметне скельце, фіксують у полум'ї спиртівки та фарбують за методом Грама. У пофарбованому препараті повинні спостерігатися типові грамнегативні рухливі палички *Pseudomonas*, розташовані поодинокі або невеликими групами. Наявність інших морфологічних форм (коків, спороутворюючих паличок, дріжджових клітин тощо) свідчить про контамінацію.

Мікробіологічний контроль чистоти: проводять висів на два середовища — стандартний поживний агар (СПА) для виявлення бактеріальної контамінації та агар Сабуро для виявлення грибів і дріжджів. Виконують три паралельні посіви по 0,5 мл культуральної рідини на кожне середовище. Посівний матеріал рівномірно розподіляють стерильним шпателем Дригальського.

					КР.ПЗ.162.11				
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата					
Розробив		Карімова Айнур			РОЗДІЛ 5		Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Охмат О.А.					Д	№ арк	кіль. в розділі
							КНУТД, БЗБТ-22		
Н.Контр.									
Затвердив									

Інкубацію посівів на СПА проводять при температурі 25 °С протягом 24–48 годин. Посіви на середовищі Сабуро інкубують при температурі 22 ± 1 °С протягом 5–7 діб. Після інкубації оцінюють результати: на поживних середовищах не повинно бути росту сторонньої мікрофлори. Будь-яке зростання колоній, відмінних від типових для *Pseudomonas chlororaphis*, вважається забрудненням і є підставою для відбракування партії.

5.2 Фізико-хімічний контроль

Фізико-хімічний контроль у процесі ферментації передбачає безперервний моніторинг ключових параметрів біосинтезу. До них належать температура, рівень рН, концентрація розчиненого кисню, швидкість перемішування та аерація.

Всі зазначені параметри вимірюються за допомогою вбудованих аналітичних сенсорів ферментера, які занурюються безпосередньо в культуральне середовище. Це дозволяє оперативно коригувати умови процесу в реальному часі.

За необхідності корекції кислотно-лужного балансу в систему дозовано вносять 6 %-й розчин хлороводневої кислоти або гідроксиду натрію. Температурний режим підтримується через термостатовану сорочку ферментера, що гарантує стабільність умов культивування протягом усього біотехнологічного циклу.

Додатково в кінці процесу контролюють кінцеву концентрацію життєздатних клітин, яка в готовому продукті повинна становити не менше 1×10^9 КУО/мл.

						Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		№ ар

ВИСНОВКИ

В результаті виконання кваліфікаційної роботи була розроблена технологія виробництва біопрепарату для захисту рослин на основі *Pseudomonas chlororaphis* MA342.

Для досягнення поставленої мети було проаналізовано фактори, що впливають на накопичення біомаси, і визначено оптимальні умови культивування продуценту.

Проаналізувавши фізіолого-біохімічні властивості штаму, встановлено, що для ефективного вирощування посівного матеріалу доцільно використовувати модифіковане середовище King's B, а для виробничого біосинтезу — багатокомпонентне середовище на основі гліцерину як основного джерела вуглецю. Було обґрунтовано параметри аеробного культивування: температура 28–30 °C, рН 6,8–7,2, швидкість перемішування 200–250 об/хв та аерація 1,0–1,5 vvm. Для підтримання стабільного рівня рН протягом ферментації застосовуються 6 %-і розчини HCl та NaOH.

Для забезпечення якості цільового продукту підібрано методики контролю, зокрема автоматичний моніторинг оптичної густини, визначення концентрації життєздатних клітин методом Коха, мікроскопічний контроль морфології клітин та перевірку на наявність сторонньої мікрофлори шляхом висіву на стандартний поживний агар і агар Сабуро.

Результати роботи свідчать, що використання штаму *Pseudomonas chlororaphis* MA342 є перспективним для отримання високоефективного біопрепарату, здатного забезпечити захист рослин від широкого спектру фітопатогенів. Розроблена технологія дозволяє отримувати продукт з високим титром життєздатних клітин і може бути впроваджена в промислове виробництво як екологічно безпечна альтернатива хімічним засобам захисту рослин.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Список використаних джерел

1. European Commission. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. A Farm to Fork Strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system. – Brussels, 2020. – 20 p.
2. Alattas H., Alharbi A., Alotaibi S., Alshehri D., Alghamdi A., Alotaibi M. Harnessing *Pseudomonas* spp. for sustainable plant crop protection // *Frontiers in Microbiology*. – 2024. – Vol. 15. – 1485197. – DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1485197>.
3. Anderson A. J., Kim Y. C. Biopesticides produced by plant-probiotic *Pseudomonas chlororaphis* // *Biological Control*. – 2018. – Vol. 125. – P. 102–110. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.06.003>.
4. Dobrzyński J. *Pseudomonas protegens* as a biocontrol agent against plant pathogens // *Polish Journal of Microbiology*. – 2025. – Vol. 74, No. 1. – P. 45–58.
5. Höfte M. *Pseudomonas* biocontrol agents // *Microbial Bioprotectants for Plant Disease Management* / ed. by M. Ongena, M. Höfte. – Cambridge : Burleigh Dodds Science Publishing, 2022. – P. 45–78.
6. Koppert Biological Systems. Cedomon. Product information and label. – 2024.
7. Johnsson L., Hökby E. Performance of *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 // *European Journal of Plant Pathology*. – 1998. – Vol. 104, No. 3. – P. 233–243.
8. Міністерство аграрної політики та продовольства України. Стратегія розвитку аграрного сектору України на період до 2030 року : затв. Кабінетом Міністрів України. – Київ, 2024. – 68 с.
9. Mavrodi O. V., Bonsall R. F., Delaney S. M. et al. Accumulation of 2,4-diacetylphloroglucinol by *Pseudomonas fluorescens* strains // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2007. – Vol. 73, No. 7. – P. 2046–2054.
10. Certis Biologicals. Howler EVO. Technical bulletin. – 2023.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

11. EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Pseudomonas chlororaphis* strain MA 342 // EFSA Journal. – 2017. – Vol. 15, No. 7. – 4878.
12. MarketsandMarkets. Europe Biopesticides Market by Type, Crop Type, Mode of Application and Region – Global Forecast to 2030. – 2025.
13. Mordor Intelligence. Europe Biopesticides Market – Growth, Trends, and Forecasts (2025–2030). – 2025.
14. Міністерство аграрної політики та продовольства України. Статистичні дані посівних площ зернових культур. – Київ, 2024.
15. Sabra W. et al. Kinetic analysis of biomass and secondary metabolite production by *Pseudomonas* strains // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2019. – Vol. 103, No. 11. – P. 4321–4332.
16. Sartorius Stedim Biotech. BIOSSTAT® D-DCU Stainless Steel Bioreactors. Technical specifications. – Göttingen, 2023. – 16 p.
17. Weller D. M., Thomashow L. S., Mavrodi D. V. Microbial control of root pathogens // Annual Review of Phytopathology. – 2002. – Vol. 40. – P. 309–348.
18. Sabra W., Zeng A.-P., Lünsdorf H., Deckwer W.-D. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – Vol. 66, No. 9. – P. 4037–4044. – DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000>.
19. Державні санітарні норми та правила «Гігієнічні вимоги до виробництва лікарських засобів» : Наказ МОЗ України від 14.02.2017 № 113.
20. ДСТУ ISO 22716:2015 Косметика. Належна виробнича практика (GMP). Настанови з належної виробничої практики (ISO 22716:2007, IDT). – К. : ДП «УкрНДНЦ», 2016. – 36 с.
21. Інструкція із застосування засобу «Санікон» з метою дезінфекції та миття на підприємствах харчової, фармацевтичної та переробної промисловості. – К. : ТОВ «Інтердез», 2019. – 18 с.

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

22. Методичні вказівки щодо застосування засобу «Бланідас Актив» з метою дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації обладнання та поверхонь. – К. : ТОВ «Бланідас», 2018. – 22 с.

						Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		№ ар

ДОДАТКИ

Додаток А

ОТРИМАННЯ БІОПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ *BACILLUS* ДЛЯ ЗАХИСТУ РОСЛИН

Аллахвердієва Т., Карімова А., Охмат О.А., Грецький І.О.

e-mail: ihorhretskyi@gmail.com

Київський національний університет технологій та дизайну
Україна, Київ

Сучасне сільське господарство стикається з необхідністю мінімізації хімічного навантаження на агроєкосистему при одночасному зростанні врожайності. Надмірне використання синтетичних пестицидів призводить до накопичення токсинів у ґрунті та продукції, появи резистентності у фітопатогенів та деградації довкілля. У зв'язку з цим значна увага приділяється створенню біопрепаратів на основі мікроорганізмів, серед яких особливе місце займають бактерії роду *Bacillus*. Вони забезпечують ефективний захист рослин від шкідників і патогенів, сприяють росту рослин, є екологічно безпечними та зменшують ризик розвитку резистентності. Дані мікроорганізми є перспективними агентами біологічного контролю завдяки здатності синтезувати широкий спектр антимікробних сполук, формувати ендоспори та зберігати життєздатність у несприятливих умовах [1–3].

Процес отримання біопрепаратів на основі *Bacillus* включає декілька основних етапів – ізоляцію активних штамів, їх селекцію, культивування, накопичення біомаси та створення препаративної форми. Виділення перспективних штамів проводять переважно із ґрунту, ризосфери рослин або природних екосистем. Відібрані культури оцінюють за антагоністичною активністю щодо фітопатогенів, здатністю утворювати спори та синтезувати біологічно активні речовини. Найбільш цінними є штами, що продукують сурфактин, ітурин, фенгіцин та інші ліпопептиди з вираженими фунгіцидними властивостями [1,3].

Для промислового отримання біопрепаратів застосовують глибинне культивування бактерій у ферментерах із використанням поживних середовищ, що містять джерела вуглецю, азоту, мінеральні солі та вітаміни. Важливими параметрами є температура, рН середовища, аерація та швидкість перемішування, оскільки вони впливають на інтенсивність спороутворення і синтез антимікробних метаболітів. Після завершення ферментації культуральну рідину концентрують та стабілізують шляхом сушіння або додавання захисних компонентів. Готові препарати випускають у формі порошків, суспензій, паст або гранул, що забезпечує зручність їх використання в агротехнологія [4].

Бактерії роду *Bacillus* широко поширені в природі та входять до складу ризосферної мікробіоти багатьох рослин. Найбільш часто для створення біопрепаратів використовують *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* та *Bacillus pumilus*. Їх застосування

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

пов'язане зі здатністю пригнічувати розвиток фітопатогенних грибів, бактерій та шкідників рослин шляхом синтезу антибіотиків, ліпопептидів, ферментів і токсичних білків [3].

Одним із найпоширеніших біопрепаратів є засоби, створені на основі *B. thuringiensis*. Цей вид бактерій виробляє кристалічні Cry-білки, які мають токсичний вплив на багатьох комах-шкідників. Після потрапляння до кишечника личинок ці токсини руйнують епітеліальні клітини, що призводить до загибелі комах. Біоінсектициди на основі *B. thuringiensis* ефективно діють проти лускокрилих, двокрилих і жуків, залишаючись при цьому безпечними для людини, тварин і корисних видів ентомофауни [2].

Ще одним важливим напрямком є розробка біофунгіцидів на основі бактерій *B. subtilis*. Ці мікроорганізми виробляють широкий спектр протигрибкових сполук, які ефективно пригнічують розвиток таких фітопатогенів, як *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Botrytis* та інших. Їхній механізм дії базується на антибіозі, конкуренції за поживні речовини, руйнуванні клітинних стінок патогенів і стимуляції системної резистентності рослин [3].

Отже, біопрепарати, створені на основі бактерій роду *Bacillus* є перспективним напрямом розвитку сучасного екологічного землеробства. Вони забезпечують високий рівень захисту рослин від захворювань і шкідників, сприяють зниженню залежності від хімічних пестицидів та підвищують екологічну безпечність аграрного виробництва. Удосконалення технологій культивування, стабілізації та формулювання бактеріальних препаратів сприятиме збільшенню їхньої ефективності та більш широкому використанню в системах сталого й органічного землеробства.

Література:

1. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group / S. Caulier et al. – Frontiers in microbiology. – 2019. – Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
2. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species / D. Fira et al. Journal of biotechnology. – 2018. – Vol. 285. P. 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
3. Applications and future challenges of *Bacillus* and its derivatives in crop protection / A. Kumar et al. – Springer nature discover plants. – 2026. – Vol. 3. URL: <https://doi.org/10.1007/s44372-026-00579-z>
4. Production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticide formulation using starch industry wastewater (SIW) as substrate: A techno-economic evaluation / L. R. Kumar et al. – Bioresource technology. – 2019. – Vol. 294. – P. 122144. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122144>

						Аркуш
						№ ар
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		