

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт физики высоких технологий
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология
Кафедра общей химии и химической технологии

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Исследование жизненной активности пробиотических микроорганизмов методом флуориметрии
УДК 579.8-035.82-056.13:535.24

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4В	Тимофеева Елена Викторовна		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Эрдман С.В.	к.т.н.		

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Криницына З.В.	к.т.н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Назаренко О.Б.	д.т.н.		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Зав. кафедрой	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
ОХХТ	Тихонов В.В.	к.т.н.		

Томск – 2016 г.

Запланированные результаты обучения по программе

Таблица 1 – Планируемые результаты обучения

Код результата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)	Требования ФГОС, критериев и/или заинтересованных сторон
<i>Профессиональные компетенции</i>		
P1	Применять <i>глубокие</i> естественно-научные, математические и инженерные <i>знания</i> для создания <i>новых</i> материалов	Требования ФГОС (ПК-2, 10, 12, 22, 23), Критерий 5 АИОР (п. 1.1), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P2	Применять <i>глубокие знания</i> в области современных технологий химического производства для решения <i>междисциплинарных</i> инженерных задач	Требования ФГОС (ПК-2, 4-7, ОК-4), Критерий 5 АИОР (пп. 1.1, 1.2), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P3	Ставить и решать <i>инновационные</i> задачи <i>инженерного анализа</i> , связанные с созданием материалов и изделий, с использованием системного анализа и моделирования объектов и процессов химической технологии	Требования ФГОС (ПК-2, 17, 20), Критерий 5 АИОР (пп. 1.2), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P4	Разрабатывать химико-технологические процессы, <i>проектировать</i> и использовать <i>новое</i> оборудование для создания материалов, конкурентоспособных на <i>мировом</i> рынке	Требования ФГОС (ПК-1, 17-21), Критерий 5 АИОР (п. 1.3), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P5	Проводить теоретические и экспериментальные <i>исследования</i> в области создания <i>новых</i> материалов, современных химических технологий, нанотехнологий	Требования ФГОС (ПК-14-16, ОК-2-6), Критерий 5 АИОР (п. 1.4), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P6	Внедрять, <i>эксплуатировать</i> современные высокотехнологичные линии автоматизированного производства, обеспечивать их <i>высокую эффективность</i> , соблюдать правила охраны здоровья и безопасности труда на химическом производстве, выполнять требования по защите окружающей среды	Требования ФГОС (ПК-1, 10), Критерий 5 АИОР (п. 1.5), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>

Универсальные компетенции		
P7	Использовать <i>глубокие знания по проектному менеджменту</i> для ведения <i>инновационной инженерной деятельности</i> с учетом юридических аспектов защиты интеллектуальной собственности	Требования ФГОС (ПК-3, 8, 13), Критерий 5 АИОР (п. 2.1), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P8	<i>Активно владеть иностранным языком</i> на уровне, позволяющем работать в иноязычной среде, разрабатывать документацию, презентовать и защищать результаты инновационной инженерной деятельности	Требования ФГОС (ПК-7, ОК-3), Критерий 5 АИОР (п. 2.2), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P9	Эффективно работать индивидуально, в качестве <i>члена и руководителя группы</i> , состоящей из специалистов различных направлений и квалификаций, демонстрировать ответственность за результаты работы и готовность <i>следовать корпоративной культуре</i> организации	Требования ФГОС (ПК-9, ОК-4, 5), Критерий 5 АИОР (пп. 1.6, 2.3.), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P10	Демонстрировать <i>глубокие знания социальных, этических и культурных аспектов</i> инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах <i>устойчивого развития</i>	Требования ФГОС (ПК-5, 6, 10), Критерий 5 АИОР (пп. 2.4, 2.5), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P11	<i>Самостоятельно учиться</i> и непрерывно <i>повышать квалификацию</i> в течение всего периода профессиональной деятельности	Требования ФГОС (ПК-11, ОК-1, 2, 6), Критерий 5 АИОР (2.6), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>

Взаимное соответствие целей ООП и результатов обучения и кредитная стоимость результатов обучения представлены в табл. 3, 4.

Таблица 3 – Взаимное соответствие целей ООП и результатов обучения

Результаты обучения	Цели ООП				
	Ц1	Ц2	Ц3	Ц4	Ц5
P1	+	+	+	+	+
P2	+	+		+	
P3	+	+	+	+	+
P4				+	
P5			+		+
P6	+	+		+	
P7		+			
P8			+		+
P9		+			
P10		+	+		
P11			+	+	+

Таблица 4 – Кредитная стоимость результатов обучения

<i>Профессиональные компетенции выпускника – 100 кредитов ECTS</i>							<i>Универсальные компетенции выпускника – 20 кредитов ECTS</i>				
Кредиты	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
	19	20	9	19	21	12	2	4	6	4	4

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт физики высоких технологий

Направление подготовки 18.04.01 «Химическая технология»

Кафедра общей химии и химической технологии

УТВЕРЖДАЮ:

Зав. кафедрой

Тихонов В.В.
(подпись) (дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ

на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

Магистерской диссертации

(бакалаврской работы, дипломного проекта/работы, магистерской диссертации)

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ4В	Тимофеевой Елене Викторовне

Тема работы:

Исследование жизненной активности пробиотических микроорганизмов методом флуориметрии	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	От 22.01.2016 № 283/с

Срок сдачи студентом выполненной работы:

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе	В качестве объектов исследования взять лактобактерии и колибактерии, и кислотно-основные индикаторы, провести литературный обзор по тематике научно-исследовательской работы, в экспериментальной части предоставить методики проведения экспериментов, проанализировать полученные результаты, сделать выводы.
Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов	Введение, литературный обзор, методика проведения экспериментов, финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение, социальная ответственность, заключение.
Перечень графического материала	Принципиальная технологическая схема глубинного культивирования микроорганизмов. Принципиальная схема спектрофлуориметра “Флюорат – 02 Панорама”

Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы	
Раздел	Консультант
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Доцент кафедры МЕН, к.т.н., Криницына Зоя Васильевна
Социальная ответственность	Профессор кафедры ЭБЖ, д.т.н., Назаренко Ольга Брониславовна
Раздел на иностранном языке	Доцент кафедры ИЯПР Сыскина Анна Александровна

Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:
1.1 Пробиотические микроорганизмы

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	
---	--

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент кафедры ОХХТ	Эрдман С.В.	к.т.н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4В	Тимофеева Е.В.		

Реферат

Выпускная квалификационная работа магистра на тему «Исследование жизненной активности пробиотических микроорганизмов методом флуориметрии» выполнена магистром группы 2ДМ4В Тимофеевой Е.В, на кафедре ОХХТ под руководством доцента, к.х.н. Эрдман С.В.

Ключевые слова: жизненная активность, лактобактерии, колибактерии, индикатор бромкрезоловый красный, фотометрический анализ, флуориметрический анализ.

Дипломная работа посвящена поиску и созданию новых способов определения жизненной активности микроорганизмов, с целью усовершенствования контроля технологического процесса их культивирования.

При выполнении данной работы в качестве пробиотических микроорганизмов были выбраны наиболее широко распространённые лактобактерии и колибактерии.

В качестве индикатора для определения жизненной активности исследуемых микроорганизмов был выбран кислотно – основной индикатор бромкрезоловый красный.

Исследование оптических свойств кислотно-основных индикаторов в контексте определения жизненной активности микроорганизмов ранее не проводилось и является новым подходом.

Данная дипломная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, заключения, списка литературы.

Дипломная работа изложена на 125 страницах машинописного текста, содержит 29 рисунков и 25 таблиц.

Список сокращений

ЭПКП - Энтеропатогенные кишечные палочки

NADH – Никотинамидадениндинуклеотид в восстановленной форме

МПБ – Мясо-пептонный бульон

БКЗ – Бромкрезоловый зеленый

МТС – Метил-тимоловый синий

БКК – Бромкрезоловый красный

ЛБ – Лактобактерии

КБ – Колибактерии

Гл – Глюкоза

УФ – Ультрафиолет

КОЕ – Колониеобразующая единица

ПДК – Предельно допустимая концентрация

Оглавление

	Введение	12
1	Литературный обзор	14
	1.1 Пробиотические микроорганизмы	14
	1.2 Характеристика лактобактерий	25
	1.3 Характеристика колибактерий	26
	1.4 Методы изучения ферментативной активности бактерий	27
	1.5 Характеристика кислотно-основных индикаторов	29
	1.5.1 Индикатор бромкрезоловый зеленый	29
	1.5.2 Индикатор метил-тимоловый синий	30
	1.5.3 Индикатор бромкрезоловый красный (пурпурный)	30
	1.6 Люминесценция	32
	1.7 Промышленное культивирование микроорганизмов	35
	1.7.1 Основные этапы общей схемы микробиологического производства	35
	1.7.2 Выращивание микроорганизмов в реакторе и контроль процесса культивирования	38
	1.7.2.1 Промышленное культивирование микроорганизмов с применением активной аэрации	39
	1.7.2.2 Технология культивирования микроорганизмов в покоем состоянии без аэрации	40
	1.7.2.3 Технология промышленного культивирования анаэробных микроорганизмов	40
	1.7.3 Периодические и хемостатные системы культивирования микроорганизмов	41
	1.7.3.1 Технологическая схема глубинного культивирования	42
2	Аппаратура и методика эксперимента	46
	2.1 Аппаратурное оформление	46
	2.2 Объекты исследования	47
	2.3 Приготовление суспензии бактерий и растворов индикаторов и методика эксперимента	48
3	Исследование оптических свойств кислотно-основных индикаторов в присутствии лактобактерий	49
	3.1 Индикатор метил-тимоловый синий	49

	3.2 Индикатор бромкрезоловый зеленый	49
	3.3 Индикатор бромкрезоловый красный	49
	3.4 Исследование влияния pH на индикатор бромкрезоловый красный	50
	3.5 Исследование взаимодействия лактобактерий с бромкрезоловым красным при различных концентрациях индикатора	52
4	Исследование оптических свойств индикатора бромкрезолового красного в присутствии колибактерий	56
	4.1 Исследование оптических свойств индикатора бромкрезолового красного фотометрическим методом	56
	4.2 Исследование взаимодействия колибактерий с бромкрезоловым красным	58
5	Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	67
	5.1 Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	67
	5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования	68
	5.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	69
	5.1.3 Диаграмма Исикава	70
	5.1.4 Оценка готовности проекта к коммерциализации	70
	5.1.5 Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования	72
	5.2 Инициация проекта	73
	5.3 Планирование управления научно-техническим проектом	76
	5.3.1 Иерархическая структура работ проекта	76
	5.3.2 Контрольные события проекта	77
	5.3.3 План проекта	78
	5.3.4 Бюджет научного исследования	80
	5.3.5 Организационная структура проекта	85
	5.3.6 Матрица ответственности	86
	5.3.7 План управления коммуникациями проекта	87
	5.3.8 Реестр рисков проекта	88
	5.4 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой,	88

	бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования	
	5.4.1 Оценка сравнительной эффективности исследования	89
6	Социальная ответственность	93
	6.1 Профессиональная социальная безопасность	94
	6.1.1 Анализ вредных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению	95
	6.1.2 Анализ опасных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению (техника безопасности)	100
	6.2 Экологическая безопасность (охрана окружающей среды)	103
	6.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях	104
	6.4 Правовые вопросы обеспечения безопасности	105
	Заключение	107
	Список публикаций	109
	Список литературы	110
	Приложение А	113

Введение

Пробиотики входят в состав функциональных продуктов питания, потребление которых с каждым годом неуклонно растет. Традиционно, к пробиотическим микроорганизмам относятся лактобактерии и колибактерии. Активное развитие промышленного культивирования пробиотических микроорганизмов предполагает совершенствование методов определения качественного и количественного состава культивируемых бактерий, а также, определение их жизненной активности, поскольку только живые пробиотические микроорганизмы приносят пользу здоровью человека.

Процесс промышленного культивирования микроорганизмов состоит из нескольких этапов и проводится в специальных аппаратах – биореакторах. Существуют различные приемы проведения процесса культивирования, однако, в независимости от применяемого способа необходим контроль жизненной активности культивируемых микроорганизмов. Известен ряд способов определения жизненной активности микроорганизмов, например, измерение количества содержащегося в культуральной жидкости кислорода, определение активности ферментов метаболизма микроорганизмов, определение выделяемых продуктов метаболизма и т.д.

Актуальной задачей является поиск и создание новых способов определения жизненной активности микроорганизмов, с целью усовершенствования контроля качества продукции, производимой в ходе технологического процесса культивирования.

Для решения данной задачи одними из перспективных методов являются спектроскопические методы, в частности, флуориметрия и фотометрия. Данные методы уже находят применение в биотехнологическом производстве для проведения микробиологических исследований.

Также, немаловажную роль в исследовании микроорганизмов играют кислотно-основные индикаторы, которые применяются в качестве добавки к питательной среде с целью определения значений pH образующихся

продуктов метаболизма, однако, исследование оптических свойств индикаторов в контексте определения жизненной активности микроорганизмов ранее не проводилось. В связи с этим, научная новизна работы заключается в применении спектроскопических методов анализа для определения жизненной активности микроорганизмов по изменению оптических свойств ряда кислотно-основных индикаторов за счет выработки определенных продуктов метаболизма.

Цель магистерской работы

Разработка способа определения жизненной активности пробиотических микроорганизмов по изменению оптических свойств кислотно-основных индикаторов спектроскопическими методами анализа.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследование оптических свойств ряда кислотно-основных индикаторов флуориметрическим и фотометрическим методами.
2. Исследование оптических свойств лактобактерий и колибактерий.
3. Исследование влияния кислотности среды на оптические свойства кислотно-основных индикаторов.
4. Анализ жизненной активности лактобактерий и колибактерий по изменению оптических свойств индикатора.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Пробиотические микроорганизмы

Пробиотические бактерии молочной кислоты могут сигнализировать иммунной системе через врожденные рецепторы поверхности клеток или через прямую лимфатическую клеточную активацию. На практике пробиотики применяют в качестве иммунотерапии, некоторые пробиотики стимулируют защиту иммунной системы, повышают устойчивость к микробным патогенам. Приведены экспериментальные и клинические данные для усиления антимикробной иммунной защиты с помощью пробиотических молочнокислых бактерий [1].

В течение почти века вера профессора Эли Мечникофф, что «дружелюбные» микробы, существующие в ферментированных пищевых продуктах, могли способствовать здоровью человека, была поддержана микробиологами. Только в последние два десятилетия, роль «дружественных» бактерий была полностью оценена. Кроме того, экспериментально и клинически, было показано, что повторное заселение желудочно-кишечного тракта соответствующими штаммами микробов может восстановить иммунную систему [1].

Эти наблюдения указывают на два важных принципа. Во-первых, в то время как микрофлора пищеварительного тракта, несомненно, важна в поддержке функциональной иммунной системы, есть процессы, которые приводят к этому балансу, можно быстро заселить желудочно-кишечный тракт соответствующими штаммами микробов – больше всего используют молочнокислые бактерии (лактобактерии или бифидобактерии) - которые поступают в качестве пробиотиков. Во-вторых, функционирование иммунной системы осуществляется в желудочно-кишечном тракте, и может влиять на сигнал. Этот последний пункт был предметом интенсивных исследований за последние несколько лет и поддерживает идею, что бактерии, которые проживают в желудочно-кишечном тракте, активно

общаются с иммунной системой. Недавние исследования показали, что клетки наблюдения иммунной системы желудочно-кишечного тракта периодически отбираются на микрофлору кишечника. Важным моментом в этом отношении может быть способность некоторых штаммов молочнокислых бактерий переместиться через слизистую оболочку кишечника, не вызывая инфекцию, после чего они могут взаимодействовать с лейкоцитами, в дальнейшем через лимфатический дренаж, и могут таким образом влиять системно на иммунитет. С другой стороны, есть свидетельство того, что некоторые штаммы молочнокислых бактерий могут непосредственно стимулировать иммунную систему в пищеварительном тракте на поверхности слизистой оболочки; что может способствовать увеличению выхода иммуноглобулина [1].

В то время как запутанность свободных сигналов, произведенных в желудочно-кишечном тракте осталась полностью объясненной, неопровержимым фактом остается то, что у (пробиотических) лактобактерий и бифидобактерий есть возможность смодулировать системный уровень иммунной системы. Это было использовано в исследовании здравоохранения. И далее, пробиотические штаммы, которые способны к увеличивающемуся производству антивещества в желудочно-кишечном тракте, стали применять как вспомогательный метод лечения для повышения иммунной системы [1].

Дальнейшее использование пробиотиков в здравоохранении связано с управлением микробными болезнетворными микроорганизмами. В то время как доказательства существовали в течение нескольких лет, пробиотики, которые введены перорально, могут бороться с инфекционными заболеваниями. Несколько потенциальных механизмов были предложены, чтобы доказать это явление, включая: производство молочной кислоты пробиотиками в желудочно-кишечном тракте, что может ограничить рост патогена; или что иммуномодулирующие сигналы могут стимулировать

иммунитет хозяина достаточно, чтобы предоставить степень усиленной защиты от болезнетворных микроорганизмов. В то время как ни одна из этих теорий не является взаимоисключающей, полное обсуждение всех этих возможностей выходит за рамки этого обзора. Вместо этого сосредоточимся на поддерживающих и наводящих на размышления доказательствах роли пробиотиков. Далее, в обзоре будет рассмотрено использование грамположительных бактерий молочной кислоты (преимущественно лактобациллы, но также и некоторые разновидности бифидобактерий) как пробиотики; однако важно знать, что другие таксоны были использованы как пробиотики в этой области, включая грамотрицательные энтеробактерии и дрожжи [1].

С точки зрения защиты от болезней несколько исследователей изучили защитные действия свободно модулирующих пробиотических бифидобактерий против диареи у новорожденных животных. Более свежее исследование показало, что прямой пероральный прием мышатами двух штаммов зараженных ротавирусом бифидобактерий, мог увеличить определенные для вируса уровни в сыворотке крови и желудочно-кишечном тракте. Защитные действия были также продемонстрированы против диареи у новорожденных животных, путем кормления иммуномодулирующими бифидобактериями. При исследовании диареи (в основном за счет ротавируса и кишечной палочки), было предпринято отвыкание поросят Шу от груди. Исследования показали, что предварительное кормление поросят до отвыкания от груди в условиях, которые соответствуют окружающей среде, может эффективно уменьшить показатель заболеваемости у животных, в результате увеличивается норма приема пищи, и повышается усвоение корма по сравнению с питанием без пробиотиков. Интересно отметить, что исследование поросенка Шу показали, что некоторые параметры иммунитета можно увеличить пробиотическим кормлением, так как и в сыворотке, и в

желудочно-кишечном тракте существуют определенные микроорганизмы, которые значительно увеличиваются при кормлении бифидобактериями [1].

Кормление пробиотиками, является безопасным средством борьбы с микробными микроорганизмами. Интересно отметить, что был проверен большой объем животных, и клинические исследования были сосредоточены на укреплении антивеществ желудочно-кишечного тракта, увеличить защиту иммунной системы с помощью пробиотиков. Конечно, это известно, что определенные штаммы лактобацилл и бифидобактерий могут эффективно увеличить производство антивеществ в слизистой оболочке, все же для многих микробных болезнетворных микроорганизмов, иммунная реакция пренебрегается. Аналогичным образом, экспериментальные и клинические исследования кишечных вирусных инфекций сосредоточились на улучшении гуморального иммунитета, который является основой иммунной системы, но все же немного исследований сообщили о клетках, которые имеют отношение к контролю вирусных болезнетворных микроорганизмов. В случае кишечных патогенов (таких как Листерия), где защита иммунитета, как думают, прочно зависит от механизма клеток, есть достоверные свидетельства, что пробиотическое кормление может действительно увеличить проходящие в естественных условиях клеточные реакции, все же здесь не сообщили об основных молекулах цитокина, которые управляют этими реакциями. Учитывая, что определенные штаммы пробиотических лактобацилл, как было показано, были мощными стимуляторами цитокинов и могут активировать сильные клеточные механизмы иммунной системы, есть очевидная возможность исследовать потенциальную роль этих пробиотиков для активации клеточных реакций иммунной системы, которые являются подходящими для контроля внутриклеточных патогенов [1].

В исследованиях сообщается, что пробиотики увеличивают защиту иммунной системы животных и людей. В дальнейших исследованиях

используем иммуномодулирующий пробиотик как защитное средство против условно-патогенных болезнетворных микроорганизмов [1].

В недавних исследованиях в области пробиотиков начали задумываться не только о защите желудочно-кишечного тракта, но и защите слизистых оболочек. В частности теперь очевидно, что пробиотическое кормление может влиять на иммунитет в тканях дыхательных путей, и этот эффект был рассмотрен достаточно, чтобы предоставить увеличенную защиту от бактериальных и вирусных микроорганизмов в дыхательных путях. Однако это исследование было совсем не исчерпывающим, и мы можем ожидать более детальные изучения обоих механизмов активации иммунной системы на участках слизистой оболочки. Недавнее исследование показало, что непосредственное введение пробиотика лактобактерий в носовую полость мышей, может увеличить легочную клеточную иммунную деятельность, и обеспечить повышенную защиту против внутриносевой проблемы Стрептококка. Существует возможность также, что иммуномодулирующие пробиотики, доставленные перорально или местно, могут обеспечить повышенную защиту от патогенов слизистой оболочки мочевого тракта, а также недавнее экспериментальное исследование показало, что прямая внутривезикулярная болезнь может вызвать мощный цитокин в слизистой оболочке мочевого пузыря мышей. Очевидно, что исследование в этой области совсем не исчерпывающее, а также современные исследования углубляются в механизм заражения и защиты от патогенных микроорганизмов, мы можем ожидать более подробное исследование иммуномодулирующих пробиотиков в этой области [1].

Лактобактерии и бифидобактерии являются чрезвычайно редкими причинами инфекции в организме человека. Это отсутствие патогенности распространяется во всех возрастных группах и у лиц с ослабленным иммунитетом. Штаммы, используемые для новых пробиотиков, должны быть выбраны из санитарной флоры человека и не должны нести внутреннюю

устойчивость к антибиотикам, которая могла бы помешать лечению редкой пробиотической инфекции. Выявленные редкие инфекции должны быть сохранены и изолированы, отправлены в справочные центры молекулярной характеристики [2].

Есть много источников воздействия на лактобактерии и бифидобактерии. Эти источники включают пробиотики, кисломолочные продукты (например, йогурт, сыр, квашеная капуста и другие ферментированные овощи и маслины), а также собственную микрофлору хозяина. Во многих традиционных продуктах питания, такие бактерии играют важную роль в предотвращении порчи и роста патогенных микроорганизмов. Некоторые пробиотические продукты, которые содержат лактобактерии или бифидобактерии, имеют долгий срок хранения, в некоторых случаях, в течение многих десятилетий. У здоровых людей лактобациллы обычно присутствуют в полости рта (10^3 - 10^4 КОЕ/г), подвздошной кишке (10^3 - 10^7 КОЕ/г), и толстом кишечнике (10^4 - 10^8 КОЕ/г) [2].

Случаи заражения из-за лактобактерий и бифидобактерий чрезвычайно редки и, как оценивается, представляют 0.05%-0.4% случаев инфекционного эндокардита. Из интереса, увеличение потребления пробиотических лактобактерий и бифидобактерий, не привело к увеличению оппортунистических инфекций у потребителей [2].

В большинстве случаев, редкие инфекции лактобацилл, которые возникают у пациентов, имеют серьезный характер; большинство этих пациентов умирает в течение года после развивающейся инфекции. Лактобациллы являются частым маркером серьезной или смертельной болезни [2].

Чрезмерно быстрый рост лактобацилл может быть особенностью пациентов с синдромом короткой кишки и часто ассоциируется с D-лактацидозом. Лечение антибиотиком и диетическими углеводами, являются,

важными факторами, предрасполагающими пероральное поступление D-лактопродуцирующих бактерий с применением антибиотиков. Потребление штаммов, которые производят L-лактат, не представляют проблем для пациентов и могут быть полезны в их лечении [2].

Лактобациллы и бифидобактерии повсеместно используются в рационе, и появляются в толстой кишке вскоре после рождения. Классический подход оценки степени риска, подобный тому, который используется для патогенных микроорганизмов, не представляется возможным или обоснованным. Некоторые исследования лактобацилл попытались определить факторы ядовитости. В случае подхода оценки степени риска для патогенных микроорганизмов, патогенность проявляется и, как правило, является последствием нескольких свойств. Часто, такими факторами как адгезия, считают факторы ядовитости, при изучении патогенных микроорганизмов. Например, в желудочно-кишечном тракте есть слизистая оболочка [2].

Нет никаких доказательств того, что при пероральном поступлении, пробиотические лактобациллы, или бифидобактерии представляют больше инфекционной угрозы, чем синантропные штаммы. Однако риск находится в “незначительном” диапазоне. Было 180 случаев лактобацилл, зарегистрированных в течение последних 30 лет. Однако было только 69 случаев инфекционного эндокардита, приписанного к лактобациллам, во время того же самого периода [2].

Было зарегистрировано два случая, в которых изолированные лактобактерии были неотличимы от пробиотических штаммов, недавно потребляемых пациентом [2].

При разработке новых пробиотиков, в идеале вид должен быть отобран из фекальной флоры здоровых людей - добровольцев, которые не глотали продукты в течение ~1 месяца из числа пробиотических бактерий молочной кислоты, у которых есть долгая история безопасного

использования в продуктах питания. Не все из штаммов, как известно, человеческого происхождения, это не является главным условием для безопасности. Данные исследований предоставляют информацию о безопасности пробиотиков, используемых в существующих продуктах, также можно исследовать на безопасность новых пробиотических продуктов[2].

Если продукт совершенно новый (например, микроорганизмы, которые он содержит, не присутствуют в обычном режиме), то в нем больше данных которые могут потребоваться. Таким образом, началом исследования можно считать 90-дневное кормление крыс. Однако есть представление, что животные имеют степень риска, при такой оценке микробов. Нет никакого устойчивого согласия для таких моделей, даже между авторами данного исследования. Несмотря на это отсутствие согласия, модель 90-дневного вскармливания крысы имеет то преимущество, что соответствует опубликованным рекомендациям для оценки безопасности. Такие исследования должны быть разработаны, чтобы обратить особое внимание на структуру и функцию органов пищеварительной системы, а также на расширенный гематологический анализ, чтобы проверить любые микроорганизмы [2].

Некоторые модели оценки безопасности, предложенные в литературе, имеют минимальную ценность. Недавно, изменения были предложены в протоколах для LD50 (средняя летальная доза), а также для испытания участия нескольких органов. Испытание, для которого конечная точка базируется исключительно на смерти лабораторных животных, является спорным [2].

Используют модели животных с ослабленным иммунитетом для оценки полезных функций пробиотиков. Мыши с иммунодефицитом используют для оценки безопасности пробиотических бактерий, для защиты от кандидоза. В экспериментах, оценивающих безопасность, некоторые

пробиотики лактобактерий были связаны со смертью собак возраст меньше 4 недель. Тестировали новые пробиотики на ослабленном иммунитете новорожденных мышей [2].

Были изучены многие бактерии в пищеварительном тракте. Некоторые такие маркеры недавно стали пропагандироваться для скрининга пробиотиков. Эти маркеры включают формирование биогенных аминов, нитроредуктазу, β -глюкуронидазу, растворение тромбов, агрегацию тромбоцитов, адгезию фибриноген, деградацию муцина и гемолиза. Передаваемая устойчивость к антибиотикам является еще одним фактором. Некоторые измерения в пробирке могут иметь потенциальную ценность, но не обязательно являются хорошими результатами активности в естественных условиях. Актуальность многих из этих маркеров требует дальнейшего исследования, и, в частности, должны быть предложены желаемые результаты. Кроме того, маркерами считаются компоненты, присутствующие в нормальном желудочно-кишечном тракте. Оценка осложнена фактом, что изменения ферментативной активности в различных частях желудочно-кишечного тракта исключительно не зависят от способности глотавших бактерий (в продуктах или пробиотиках [2].

Безопасность пробиотиков должна быть подтверждена исследованиями на человеке. Хотя некоторые исследования, основаны на моделях животных или в пробирке, но исследования на человеке предпочтительнее, если это возможно. В дополнение, измерения массы тела или кровяного давления, параметры гематологического анализа и химического анализа сыворотки/плазмы, подробно описаны Вольфом, также может предоставить полезную информацию о функционировании иммунной и кроветворной систем и, также, на целостности внутренних органов, таких как почки и печень. Известны клинически диапазоны нормы для этих параметров, и изменения могут указать на вызванное пробиотиком воздействие [2].

Много штаммов лактобацилл стойкие к ванкомицину. Принято считать, что антибиотическая невосприимчивость/сопротивление не, само по себе представляет опасность. Гены устойчивы к ванкомицину разновидностей лактобацилл, и расположены в хромосоме, откуда нелегко перенести. Ванкомицин не использовался в случае использования лактобактерий. Когда используется в качестве пробиотиков, отобранные штаммы должны быть восприимчивы к ~2 главным антибиотикам. В настоящее время трудно интерпретировать исследования переноса генов в естественных условиях, а так же методы, применяемые в дальнейшем развитии [2].

Способность бактерий молочной кислоты хорошо известна, и заключается в ингибировании роста различных грамположительных или грамотрицательных бактерий. Это ингибирование может быть обусловлено производством органических кислот, таких как молочная и уксусная кислота, перекись водорода, бактериоцины, и возможно биосурфактанты, которые активны в отношении некоторых патогенных микроорганизмов и могут быть получены с помощью различных видов лактобацилл. С другой стороны, несколько исследований предположили, что клейкие пробиотические бактерии могли предотвратить прикрепление патогенных микроорганизмов и стимулировать их удаление из зараженного кишечного тракта [3].

Эти антагонистические свойства могут быть очень полезны в пробиотических продуктах. Кроме этого, успешные пробиотические бактерии должны быть в состоянии пережить заболевания желудка и заселить кишечник временно, придерживаясь эпителия кишечника. Такие пробиотические микроорганизмы, являются перспективными на лечение расстройств кишечника, полученных из-за неправильной микрофлоры пищеварительного тракта и измененным пищеварительным трактом слизистой оболочки. Наиболее изученные пробиотики - бактерии молочной кислоты, особенно лактобактерии и бифидобактерии [3].

Лактобациллы были проверены на ингибирование типичных возбудителей желудочно-кишечного тракта, используя два метода: в первом, лактобактерии и энтеропатогены инкубируют отдельно в бульоне под аэробизмом. Аликвоту каждой культуры лактобацилл смешивают с равными объемами каждой из энтеропатоген культур, и возобновляют инкубацию. Образцы из смешанных культур наносили в течение 24 часов с интервалом 4 часов на адаптированные средства. Чашки инкубировали при температуре 37°C в течение 48 ч и посчитали колониеобразующие единицы (КОЕ). Эксперимент был выполнен дважды. Метод, описанный Джэйкобсеном, использовался для определения агарового пятна. Кратко, две аликвоты испытательных культур были отобраны на агаровые пластины и инкубировались в течение 24 ч. После того 100 мл бактерий индикатора были смешаны с 7 мл мягкого агара с использованием вышеупомянутой среды для каждого штамма. Затем пластины инкубировали при температуре 37°C в течение 48 ч в аэробизме, или в 5%-й атмосфере CO₂, в зависимости от штамма, и наблюдались зоны инкубирования. Когда четкие зоны достигли больше чем 1 мм, их оценивали как положительные. Каждый тест был выполнен дважды. Этот метод использовался для листерий, кампилобактерий и клостридий [3].

Все образцы были проверены с помощью анализа диффузии, пластины подготавливаются путем добавления 100 мл культуры кишечной палочки в 10 мл раствора содержащего 12% агара. После затвердевания были сделаны скважины (5 мм диаметром) стерильным бурильным молотком, и заполнены 15 мкл каждого образца [3].

Эксперименты были выполнены с кишечной палочкой и лактобактериями, и они показали значительную возможность прилипать к клеткам Сасо-2. Кратко, для испытаний лактобактерий были добавлены Сасо-2, и инкубировали их вместе в течение 45 минут; в дальнейшем добавляли кишечную палочку, и инкубация была продолжена в течение еще

45 минут. Для сравнения лактобактерий и радиоактивного патогена, микроорганизмы были добавлены в лунки и инкубировали их в течение 90 минут [3].

1.2 Характеристика лактобактерий

Лактобациллы (лактобактерии, молочнокислые бактерии) — грамположительные, микроаэрофильные бактерии (рис.1.).



Рисунок 1 – Чистая культура *Lactobacillus* окраска по Граму

Обладают сахаролитическим характером метаболизма, а именно, используют углеводы, как источник энергии и расщепляют их с образованием молочной кислоты. Продукция органических кислот, пероксида водорода и образование антибиотикоподобных веществ обеспечивают антагонистические свойства лактобактерий в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Механизм проявления антагонистических свойств можно описать следующим образом: образование органических кислот приводит к снижению pH среды, что предотвращает рост и развитие других микроорганизмов. Пероксид водорода, который так же образуется в результате метаболизма, подавляет рост бактерий.

Известно, что основным процессом, обеспечивающим взаимоотношения макро- и микроорганизмов, является адгезия [4].

Лактобациллы имеют множество биологических свойств, активно участвуют в обменных процессах микроорганизма. Так же лактобациллы

можно рассмотреть как объект исследования для разработки пробиотических препаратов, продуктов функционального питания [5].

Известно, что условия культивирования и состав питательной среды влияют на активность кислотообразования, что является одним из наиболее известных свойств лактобацилл [2].

1.3 Характеристика колибактерий

Кишечная палочка (*E.coli*) — типичный представитель нормальной микрофлоры желудочно – кишечного тракта человека, проявляет антагонистические свойства против патогенных кишечных бактерий, гнилостных бактерий. Также кишечная палочка расщепляет клетчатку, и принимает участие в синтезе витаминов группы В, Е, К [6].

E.coli — мелкие грамотрицательные палочки, длина 2-3 мкм (рис.2), ширина 0,5—0,7 мкм с закругленными концами, не образуют спор, некоторые из штаммов имеют микрокапсулу [6].



Рисунок 2 - Чистая культура *E.coli*, окраска по Граму

Кишечная палочка является факультативным анаэробом, неприхотливым к питательным средам, хорошо растет при температуре 37°C и pH среды 7,2 – 7,4. *E. coli* обладает высокой ферментативной активностью, в течение суток расщепляет лактозу [6].

E. coli часто используют на практике как объект биотехнологии и генетической инженерии. Так же, количественное содержание бактерий

E. coli является показателем фекального загрязнения объектов окружающей среды [6].

При ослабленной иммунной системе условно-патогенные штаммы, обитающие в кишечнике, могут стать причиной гнойно-воспалительных заболеваний за пределами пищеварительного тракта: циститы, отиты, менингиты и т.д. [6].

Существуют так же патогенные штаммы *E.coli*, которые при попадании в организм извне, вызывают кишечные эпидемические эшерихиозы [6]. Автором [7] представлены три патогенных штамма бактерий *E.coli*: энтероинвазивный штамм (O124), энтероксигенный штамм (O148), энтерогеморрагический штамм (O157). Штамм O124 вызывает спазмы в животе, диарею, рвоту, лихорадку, появление крови и слизи в кале больного. Попадание в организм штамма O148 вызывает сильную диарею, длящуюся в течение нескольких дней, вызывающую сильное обезвоживание организма. Штамм O157 вызывает сильные боли в животе, кровавый понос и гемолико-уремический синдром, передается чаще всего орально-фекальным путем. Фактором патогенности *E.coli* является образование эндотоксина, оказывающего нейротропное, энтеротропное и пирогенное действие.

Очевидно, что для проявления антагонистического действия по отношению к патогенным микроорганизмам, пробиотики должны обладать высокой жизненной активностью. Под жизненной активностью микроорганизмов обычно подразумевают широкий спектр свойств исследуемых бактерий, наиболее часто исследуемыми из которых являются ферментативная активность и способность вырабатывать в процессе метаболизма определенные продукты.

1.4 Методы изучения ферментативной активности бактерий

Во всех метаболических реакциях бактериальных клеток существует деятельность ферментов, принадлежащих 6 классам: оксиредуктазы,

трансферазы, гидролазы, лигазы, лиазы, изомеразы. Ферментативный спектр является таксономическим признаком, характерным для семейства, рода и — в некоторых случаях — для видов. Поэтому при установлении таксономического положения бактерий, пользуются определением спектра ферментативной активности [8].

Для исследования активности ферментов при изучении микроорганизмов наиболее широко используют дифференциально-диагностические среды, в состав подобных сред входит ряд субстратов - сахара или белки [9].

При изучении гидролитической активности бактерий широко используют моносубстратные дифференциально-диагностические среды Гисса (пестрый ряд Гисса), лактозосодержащие среды Эндо, Плоскирева, Левина, полисубстратные среды Клиглера и Олькеницкого, дисубстратные среды Ресселя.

Протеолитические ферменты способны изменять (разжижать) желатину. В пробирке с посевом микроорганизмов бактерии по-разному изменяют «столбик» желатины. Например, «столбик» желатины имеет форму гвоздя при росте холерного вибриона, а при росте стафилококка форму чулка [10].

Окислительно-восстановительные ферменты, дегидрогеназы, каталазу определяют по изменению органического красителя - акцептора водорода. Способность микроорганизмов использовать в качестве источника углерода цитрат оценивают в специальных тестах, основанных на работе ферментов.

На практике в бактериологических лабораториях наиболее широко применяют микро- и экспресс - методы для исследования биохимических свойств микроорганизмов. При разложении белка в некоторых случаях могут выделяться специфические продукты, такие как индол, сероводород, аммиак. Для определения таких продуктов используют специальные индикаторные бумажки, которые помещают между горлышком и ватной пробкой в

пробирку с МПБ (мясо-пептонный бульон) или пептонной водой, засеянными изучаемыми микроорганизмами [10].

Также, немаловажную роль в исследовании жизненной активности микроорганизмов является определение продуктов, вырабатываемых ими в процессе метаболизма. Данный анализ проводится с использованием кислотно – основных индикаторов, изменение окраски которых указывает на среду выделяемых продуктов и позволяет предположить какие именно продукты выделяются в процессе метаболизма.

1.5 Характеристика кислотно-основных индикаторов

1.5.1 Индикатор бромкрезоловый зеленый

Бромкрезоловый зеленый - кристаллический порошок светло-коричневого цвета. Индикатор плохо растворим в воде, растворим в 95 % спирте и растворах щелочей, практически нерастворим в эфире.

Переход окраски раствора от желтой к синей в интервале pH 3,8—5,4 [11].

Химическая формула: $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$. Структурная формула индикатора представлена на рисунке 3.

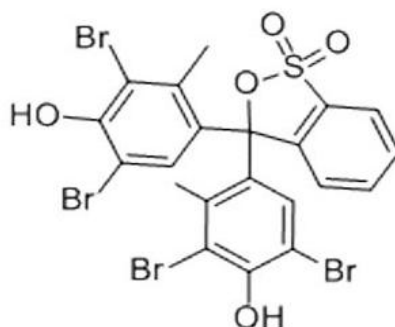


Рисунок 3 – Структурная формула индикатора бромкрезолового зеленого

В аналитической химии бромкрезоловый зеленый применяется в кислотно-основном титровании - переход окраски раствора от желтой к синей в интервале pH 3,8—5,4. В *In Vitro* диагностике данный реагент

используется для определения альбумина в сыворотке и плазме на автоматических и полуавтоматических анализаторах [12].

1.5.2 Индикатор метил-тимоловый синий

Метил-тимоловый синий – темно-фиолетовые или черные кристаллы. Растворяется в воде, CH_3COOH , не растворяется в этаноле, ацетоне. Водные растворы не неустойчивы. Часто используются в смеси с кристаллическим NaCl или KNO_3 . Кислотно-основной индикатор при pH 6,5-8,5 переход окраски от желтой к синей, при pH 10,5-11,5 от синей к серой, при pH 11,5-12,7 от серой к синей [13].

Химическая формула: $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{Na}_4\text{O}_{13}\text{S}$. Структурная формула представлена на рисунке 4.

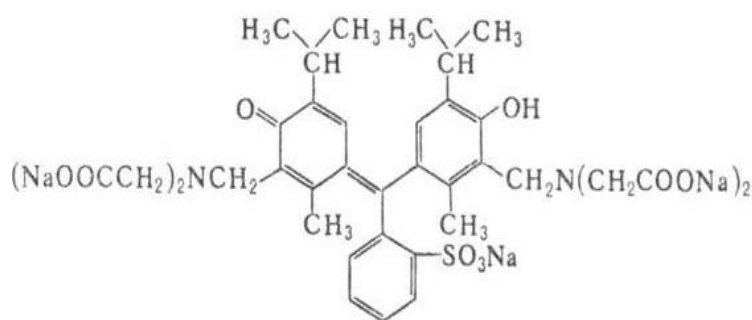


Рисунок 4 – Структурная формула индикатора метил-тимолового синего

Метил-тимоловый синий применяется для маскировки значительных количеств Fe, а также Al, Ti триэтанол-амин [14].

1.5.3 Индикатор бромкрезоловый красный (пурпурный)

Данный индикатор применяется для колориметрического определения концентрации водородных ионов.

Бромкрезоловый пурпурный индикатор - порошок светло-розового, розового или сиреневого цвета. В сухом эфире нерастворим; растворяется в водных растворах щелочей, этиловом спирте, ацетоне; малорастворим в бензоле, ледяной уксусной кислоте и холодной воде.

Химическая формула: $C_{21}H_{16}Br_2O_5S$. Структурная формула представлена на рисунке 5.

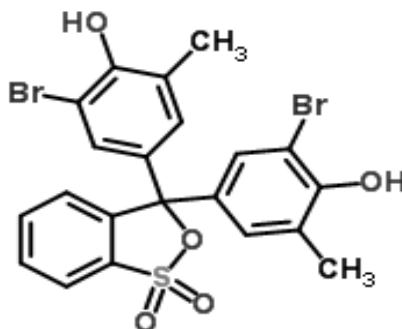


Рисунок 5 – Структурная формула бромкрезолового красного

Интервал перехода окраски индикатора лежит в области от pH 5,2 (желтая окраска) до pH 6,8 (пурпурная окраска). В сильно концентрированных растворах минеральных кислот желтая окраска превращается в оранжевую, а затем в фиолетовую.

Бромкрезоловый пурпурный относится к 3 классу опасности, а значит, представляет собой умеренно опасное вещество. Способен оказывать негативное воздействие на почки, печень, нервную систему и кровь, раздражать слизистые оболочки верхних дыхательных путей. Однако кожу и слизистые оболочки глаз не раздражает. Не всасывается через кожу. Обладает довольно слабо выраженными кумулятивными свойствами. При попадании на кожу пораженное место промывается большим количеством воды с мылом.

Вещество горючее, самовоспламеняется при температуре 595 градусов по Цельсию. Пылевоздушная взвесь не представляет взрывоопасности. В рабочей зоне следует иметь средства пожаротушения [15].

Испытания в лабораториях проводятся в вытяжном шкафу при работающей вентиляции. При работе с бромкрезоловым пурпурным

индикатором нужно пользоваться средствами индивидуальной защиты, соблюдать меры личной гигиены.

Индикатор бромкрезоловый пурпурный транспортируется автомобильным или железнодорожным транспортом. Хранится индикатор в упаковке производителя в крытых складских помещениях. Попадание прямых солнечных лучей нежелательно.

Бромкрезоловый пурпурный характеризуется наиболее высоким и стабильным бактериостатическим эффектом [15].

1.6 Люминесценция

Люминесценцией называется свечение атомов, молекул, ионов и других более сложных комплексов, возникающее в результате электронного перехода в этих частицах при их возвращении из возбужденного состояния в нормальное [16]. Схематично этот процесс можно представить в виде диаграммы Яблонского (рис.6)

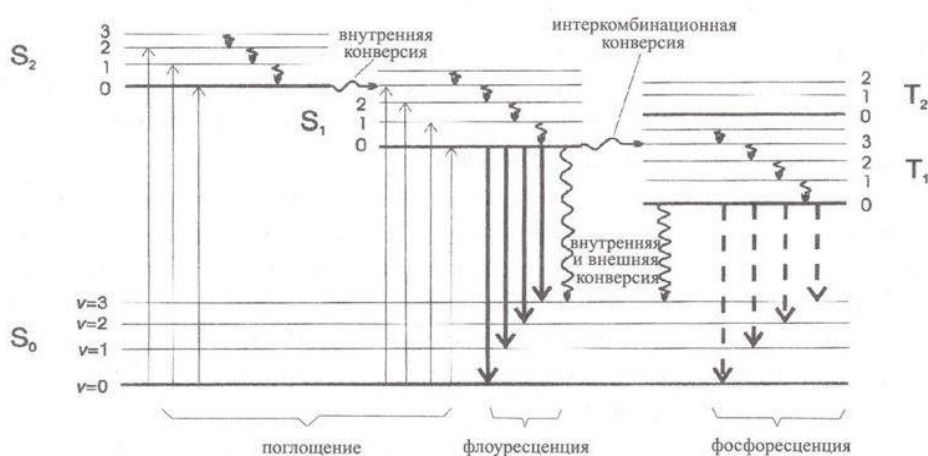


Рисунок 6 – диаграмма Яблонского

Существует несколько типов электронных переходов (Таблица 1). Каждому типу электронного перехода соответствует положение полосы в спектре.

Таблица 1 - Типы электронных переходов в молекулах

Тип перехода	Описание			
	Структура полос	Влияние полярности растворителя	Кислая среда	Положение полосы в спектре
$\sigma - \sigma^*$				дальняя УФ-область, от 10 0 до 200 нм
$\pi - \pi^*$	заметна в большинстве растворителей;	переходы сдвигаются в батохромную сторону (красную)	не влияет	средняя и ближняя УФ-область, от 130 до 300 нм
$n - \pi^*$	отчетливая в неполярных растворителях; размазанная в полярных;	переходы сдвигаются в гипсохромную (синюю) область	исчезает	ближняя УФ-область или видимая; от 250 до 5 00 нм
$n - \sigma^*$				средняя УФ-область, от 190 до 250 нм

$\sigma - \sigma^*$ переход характерен для соединений с насыщенными углерод-углеродными связями (алканы, циклоалканы). Для осуществления такого перехода требуется наибольшая энергия.

$\pi - \pi^*$ переход характерен для ненасыщенных соединений, требует меньше энергии, интенсивность полос в этом переходе максимальна.

$n - \pi^*$ переход характерен для кислород, азот, серо- и галогенсодержащих соединений, проявляющийся в ближней УФ области при длине волны ~200-250 нм.

$n - \sigma^*$ переход - запрещённый, характерен для карбонильных соединений, т.к. интенсивность в данном переходе маленькая.

Поглощение света веществом при длине волны в первую очередь зависит от наличия двойных связей и от их количества.

Хромофорными, называют группу атомов, вызывающих поглощение в УФ и видимых областях спектра; Такие группы атомов содержат кратные связи или атом со свободной парой электронов ($C=O$, NO , $N=N$). Помимо хромофорных групп, в протекании люминесценции принимают участия

ауксохромные группы – это функциональные группы, не имеющие собственного поглощения, однако их введение в вещество с хромофорными группами может усиливать сигнал или приводить к смещению сигнала вдоль оси длин волн ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ и др.) [24-26].

При комнатной температуре большинство молекул находится на самом нижнем колебательном уровне основного электронного состояния. При действии на молекулу возбуждающего излучения, она попадает на верхний колебательный уровень любого возбужденного состояния, однако, процесс испускания всегда происходит с нижнего уровня первого возбужденного состояния и поэтому форма спектра люминесценции не зависит от длины волны возбуждающего света. Это явление известно как правило Вавилова [20-23].

Наибольшее распространение на практике получила фотолюминесценция – явление, при котором свечение возникает под действием кванта света. Широкое практическое применение данный вид люминесценции получил ввиду возможности контроля условий проведения анализа путем варьирования длин волн возбуждения [17 - 19]. Выбирая определенную длину волны возбуждающего света, можно подвести энергию к определенному компоненту химической системы и избавиться, таким образом, от осложнений, возможных в случае поглощения энергии всей системой.

Изучение большинства разновидностей люминесценции может дать определенную информацию о химическом составе системы и о процессах, протекающих после поглощения энергии возбуждения. В аналитических целях люминесцентный анализ применяется для идентификации веществ, для обнаружения малых концентраций веществ, для контроля изменений, претерпеваемых веществом, для определения степени чистоты веществ. Высокая чувствительность метода позволяет фиксировать малую степень превращения веществ, а иногда по люминесценции промежуточных

соединений становится возможным установить механизм химической реакции [27].

Люминесценция нашла широкое применение в различных прикладных биологических, биомедицинских и биотехнологических исследованиях, в частности для изучения структуры белков методом флуоресцентных зондов и меток, изучения свойств молекулы ДНК, а так же для исследования свойств различных микроорганизмов, в том числе, промышленно культивированных.

1.7 Промышленное культивирование микроорганизмов

1.7.1 Основные этапы общей схемы микробиологического производства

1. Подготовка питательной среды

Питательная среда служит источником органического углерода – основного строительного элемента жизни. Микроорганизмы поглощают широкий спектр органических соединений от метана (CH_4), метанола (CH_3OH) и углекислоты (CO_2) до природных биополимеров. Также клетке необходим азот, фосфор и другие элементы (K, Mg, Zn, Fe, Cu, Mo, Mn и др.) Одной из главных стадий подготовки питательной среды, является стерилизация, с целью удаления всех ненужных микроорганизмов. Существует несколько методов стерилизации: термическая, радиационная, фильтрационная, химическая [28].

2. Получение чистых штаммов для внесения в ферментер

Штамм - центральное звено биотехнологического процесса, то есть совокупность микроорганизмов одного вида, обладающих специфическими физиолого-биохимическими признаками.

Перед началом процесса ферментации, необходимо получить чистую высокопродуктивную культуру. Хранение данной культуры должно проводиться в условиях, обеспечивающих жизнеспособность и

продуктивность – при низкой температуре, в небольших объемах. Также важно не допускать ее загрязнения посторонними микроорганизмами [28].

3. Ферментация – основной этап биотехнологического процесса

Ферментация – это все операции, начиная от внесения микробов в подготовленную и нагретую до необходимой температуры среду до окончания биосинтеза целевого продукта или роста клеток. Весь процесс протекает в специальной установке – ферментере (биореакторе).

Биореакторы изготавливаются из нержавеющей стали, имеют сложное строение (рис. 7).

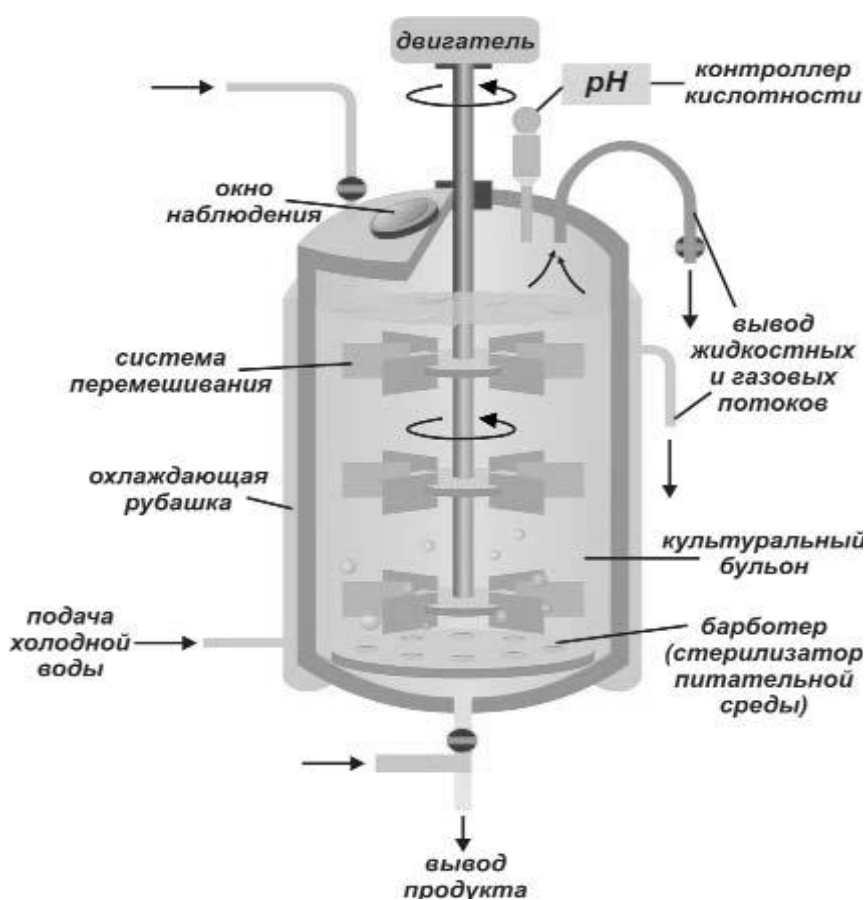


Рисунок 7 – Схема биореактора

Биореактор имеет рубашку, которая нагревается паром и охлаждается водой. Внутри реактора установлена электромагнитная мешалка, скорость вращения 150-200 об/мин, и трубка для подачи воздуха. На крышке биореактора расположены отверстия для подвода и отвода трубок, окно

наблюдения, окно для освещения и отверстие для вставления четырёх сифонов, служащих для внесения посевного материала, взятия проб, внесения пеногасителя, глюкозы и других питательных веществ, а при необходимости и факторов роста. В современных реакторах имеются различные измерительные приборы, например, измерение pH среды проводится с помощью электронного потенциометра. Температура в реакторе регулируется автоматически [28].

Для точного определения pH используют pH-метром со стеклянным электродом. Необходимо отметить, что следует доводить температуру буфера, используемого для калибровки pH-метра, до температуры измеряемой пробы, поскольку pH буфера зависит от температуры. Так, pH стандартного фосфатного буфера равен 6,98 при 0°C, 6,88 при 20°C и 6,84 при 37°C. Значения pH стандартных буферов при различных температурах приведены в «Справочнике по химии и физике» [29]. Если проба во время измерения перемешивается на магнитной мешалке, то таким же путем нужно перемешать стандартный буфер. Необходимо проверять pH среды перед использованием, а также после автоклавирования и стерилизации, поскольку проведение этих процессов приводит к заметным сдвигам pH.

В тех случаях, когда нет необходимости в высокой точности измерений, например, при работе с обычными средами, pH определяют с помощью раствора индикаторного красителя или индикаторной бумаги. При правильном их подборе pH можно определять с точностью до 0,2 единицы [30].

При подготовке биореактора к работе и в процессе его эксплуатации необходимо, чтобы при внесении компонентов среды и отбора проб не нарушалась стерильность, и не происходило заражение биореактора микроорганизмами из внешней среды. Большинство биореакторов оснащены трубкой для отбора проб, которая проходит через крышку реактора и немного не доходит до его дна.

Иногда пробы отбирают также из выводной трубки реактора, но это не рекомендуется делать при отборе малых объемов, поскольку на стенках выводной трубки могут находиться бактерии; при их попадании в пробу могут быть получены искаженные результаты. При отборе проб в процессе непрерывного культивирования необходимо следовать инструкции фирмы — изготовителя реактора. Если пробы отбирают не из выводной трубки, а через специальный отвод, их объем должен составлять менее 10 % рабочего объема реактора, так чтобы равновесие системы нарушалось не сильно. Трубку для отбора проб следует предварительно тщательно очищать. Некоторые реакторы оборудованы воздушной системой очистки, которая обеспечивает сброс в реактор содержимого трубки после отбора проб. При использовании этой системы нет необходимости в ее предварительной очистке [28].

4. Выделение и очистка конечного продукта

В конечной стадии ферментации, продукт очищают от других составляющих бульона. Существует несколько технологических способов очистки: фильтрация, сепарирование (осаждение частиц взвеси под действием центробежной силы), химическое осаждение и др.

5. Получение товарных форм продукта

Получение товарных форм продукта, заключительная стадия биотехнологического цикла. Товарный продукт представляет собой смесь, либо очищенный продукт для использования в медицинских целях [31].

1.7.2 Выращивание микроорганизмов в реакторе и контроль процесса культивирования

Особенности культивирования некоторых микроорганизмов с применением [28]:

1. Активной аэрации микробных культур.
2. В покоем состоянии без применения механических мешалок (без аэрации).

3. В состоянии анаэробноз.

1.7.2.1 Промышленное культивирование микроорганизмов с применением активной аэрации

Процесс осуществляют в асептических условиях, в реакторах объёмом от 0,01 до 100 м³. Перед началом процесса аппарат тщательно моют, проверяют герметичность стерильность и стерилизуют острым паром. Также, одновременно стерилизуют все коммуникации. Затем простерилизованная охлажденная до 25-35°C питательная среда поступает в реактор, добавляется посевной материал в количестве 5-10 % объёма питательной среды (0,2-0,4 млрд. живых микробных клеток в один мл по оптической концентрации), включается система аэрации и перемешивающее устройство. От вида культивируемых микроорганизмов зависит скорость вращения механической мешалки, например, для листерий и сальмонелл скорость вращения механической мешалки составляет 150-180 об/мин. [28].

Коэффициент заполнения реактора составляет 0,5-0,8. Превышение коэффициента приводит к значительному уносу пены с отходящим воздухом и нарушению асептических условий.

Температура культивирования регулируется путём подачи охлаждающей воды в рубашку и другие теплообменные устройства аппарата. Оптимальная температура варьируется от 25 до 37°C, зависит от вида микроорганизмов [28].

Для контроля pH культуральной жидкости в ходе процесса используют соответствующие титрующие агенты, такие как щёлочь, кислота, раствор аммиака и др. Длительность процесса культивирования микроорганизмов в культиваторе составляет 18-24 ч, спорообразующих - 40-48 ч и 200-250 ч - для актиномицетов и микроскопических грибов [28].

По показателям приборов (изменение температуры, pH культуральной жидкости, расхода воздуха, скорости вращения мешалки) контролируют

процесс культивирования. Также, контроль процесса можно осуществлять путём периодического отбора проб, через 1-12 ч в зависимости от продолжительности культивирования [28].

В отобранных пробах определяют содержание углеводов, общего и аммонийного азота, фосфора, биомассы, целевого продукта метаболизма, морфологию микробных клеток, наличие посторонней микрофлоры.

1.7.2.2 Технология культивирования микроорганизмов в покоем состоянии без аэрации

Существуют микроорганизмы, которые не требуют принудительной аэрации питательной среды, они относятся к группе микроаэрофильных. В данном случае возможно два способа культивирования: баллонный и реакторный.

Баллонный способ применяют для культивирования лептоспир. Температура составляет 27-28°C, продолжительность культивирования 5-7 суток. В шестнадцатилитровых стеклянных баллонах с десятью литрами сывороточной среды, выращиваются микробные культуры лептоспир каждого серологического варианта.

Реакторный способ культивирования проводят в ферментерах, которые могут быть объединены в единую технологическую цепочку. Так, на Ставропольской биофабрике при культивировании лептоспир было смонтировано 54 реактора объёмом от 250 до 5000 л [28].

1.7.2.3 Технология промышленного культивирования анаэробных микроорганизмов

Существуют микроорганизмы, которые способны жить и размножаться при отсутствии атмосферного кислорода, их называют анаэробными.

Методы промышленного культивирования данных микроорганизмов имеют свои особенности [28]:

1. При технологии промышленного культивировании анаэробных микроорганизмов необходимо создать условия полного вытеснения из питательной среды свободного кислорода. Заполняют анаэро(бо)стат газовой смесью водорода и двуокиси углерода, а остаточный кислород удаляют путём каталитического связывания с воздухом. Либо, для достижения анаэробных условий, также добавляют в среду восстанавливающий агент, такой как цистин, сульфид натрия, аскорбиновую кислоту.

2. Определяют степень анаэробноза окислительно-восстановительным потенциалом (Eh). Для этого необходимо добавить окислительно-восстановительный индикатор в среду. Наиболее часто используют резазурин, смена окраски от сине-розового до бесцветного. При бесцветном состоянии окислительно-восстановительный потенциал достигает 100 мВ, и указывает на наличие анаэробных условий.

3. При культивировании анаэробов необходимо постоянно регулировать рН среды, поддерживая её в пределах 7,2-7,8. В процессе роста анаэробов быстро снижается рН среды в кислую сторону, что приводит к ингибированию их роста.

1.7.3 Периодические и хеостатные системы культивирования микроорганизмов

При глубинном выращивании микроорганизмов существует два способа культивирования – периодическая и непрерывная система.

Периодическую систему также называют “закрытой”, т.е. ни один из компонентов не может ни поступать, ни покидать систему. В такой культуре из-за недостатка субстрата, либо из-за гибели микробных клеток, скорость роста микроорганизмов после ускорения снижается, и стремится к нулю. Тем самым “закрытые” системы микроорганизмов находятся в неустойчивом состоянии.

Непрерывная система, либо хемотропная “открытая”, система в которой все питательные компоненты могут поступать в систему. Также могут покидать реактор, в виде продуктов синтеза микроорганизмов, например это могут быть витамины, антибиотики, ферменты. В данной системе можно регулировать в нужной нам среде размножения скорость поступления питательной среды в культуру, и покидания продуктов синтеза либо биомассы.

1.7.3.1 Технологическая схема глубинного культивирования

При глубинном способе культивирования возможно менять состав питательной среды, концентрацию компонентов, тем самым увеличивать выход целевого продукта с единицы объема ферментационного оборудования, а в технологическом процессе уменьшается доля ручного труда. Также данный способ предлагает более простую дальнейшую переработку биомассы микроорганизмов с целью получения и очистки готового продукта. Принципиальная технологическая схема глубинного культивирования микроорганизмов представлена на рисунке 8 [32].

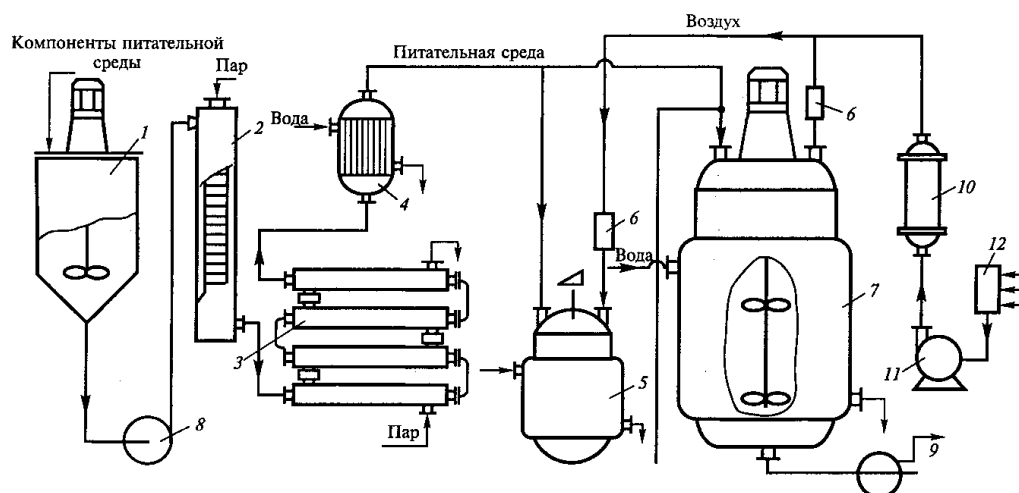


Рисунок 8 - Принципиальная технологическая схема глубинного культивирования микроорганизмов:

1 - смеситель питательной среды; 2 – колонна для непрерывной стерилизации потока питательной среды; 3 - теплообменник - выдерживатель;

4 - теплообменник для охлаждения потока питательной среды; 5 - инокуляторы (или посевные аппараты); 6 - индивидуальный фильтр для очистки воздуха; 7 - ферментер; 8,9 - насосы; масляный фильтр для предварительной очистки воздуха; 11 - компрессор; 12 - головной фильтр для очистки воздуха.

При осуществлении периодического режима предварительно приготовленную среду с необходимыми микроорганизмами, вносят в простерилизованный ферментер. Продолжительность биохимических процессов составляет от нескольких часов до нескольких суток. При данном способе культивирования, клеточная культура проходит все фазы своего развития (рис.9.) [32]:

1) Lag-фаза (фаза задержанного роста) - клетка растет медленно и адаптируется к новой среде обитания в объеме ферментера;

2) Фаза ускорения – в данной фазе закончилась адаптация, и клетки начинают интенсивно размножаться;

3) Log-фаза, при которой происходит интенсивное деление клеток и сбалансированность роста всей популяции;

4) Фаза замедленного роста, в данной фазе заканчиваются питательные субстраты и накапливаются токсические продукты метаболизма;

5) Const- фаза также ее называют стационарная фаза, при которой прирост новых клеток количественно равняется числу погибающих;

6) Фаза отмирания, характеризуется прогрессирующей гибелью клеток.

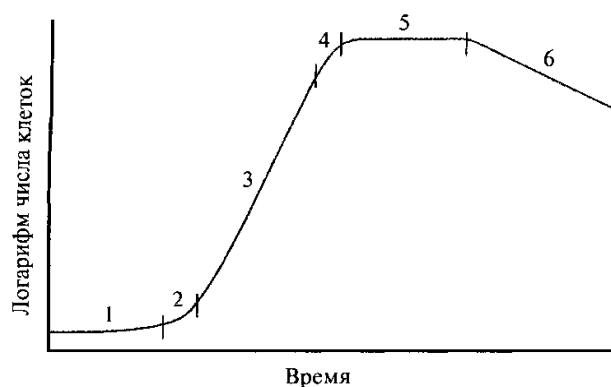


Рисунок 9 – Кривая роста бактериальной культуры при периодической ферментации:

1 – лаг-фаза; 2 – фаза ускорения; 3 – экспоненциальная фаза; 4 – фаза замедления; 5 – стационарная фаза; 6 – фаза отмирания.

Непрерывный способ производства, происходит одновременно в равных объемах подача сырья и отвод культуральной жидкости, которая содержит клетки продуцента и целевой продукт. В результате через некоторое время в ферментере устанавливается равновесие процессов размножения клеток и отмирания живых клеток, тем самым устанавливается концентрация клеток, задаваемом технологическим режимом. Теоретически, такой процесс при неизменных параметрах культивирования может быть бесконечно долго [32].

Постановка задачи исследования

Проведенный литературный обзор показал, что пробиотические микроорганизмы, такие как лактобактерии и колибактерии, находят широкое применение не только в медицине и фармацевтическом деле, но и в пищевой промышленности в качестве полезной добавки к продуктам оздоровительного питания. Рост потребления пробиотических продуктов питания приводит к необходимости промышленного культивирования лакто- и колибактерий.

Очевидно, что в независимости от применяемого способа культивирования необходим контроль жизненной активности культивируемых пробиотиков. Существующие способы определения данного показателя, такие как измерение количества содержащегося в культуральной жидкости кислорода, определение активности ферментов метаболизма микроорганизмов, определение выделяемых продуктов метаболизма и т.д. обычно являются длительными и дорогостоящими, что приводит к необходимости создания новых экспрессных и простых в применении способов определения жизненной активности пробиотических микроорганизмов.

ГЛАВА 2. АППАРАТУРА И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1 Аппаратурное оформление

В качестве метода исследования был выбран метод люминесцентного анализа. Данный метод обладает высокой чувствительностью, экспрессностью и простотой аппаратного оформления. Все исследования проводились на спектрофлуориметре “Флюорат – 02 Панорама”

Спектрофлуориметр состоит из источника, имеющего непрерывный спектр в видимой и УФ областях, монохроматор для выделения требуемой длины волны возбуждения, держателя образца и второго монохроматора регистрации с фотоумножителем для анализа света флуоресценции (Рис. 10).

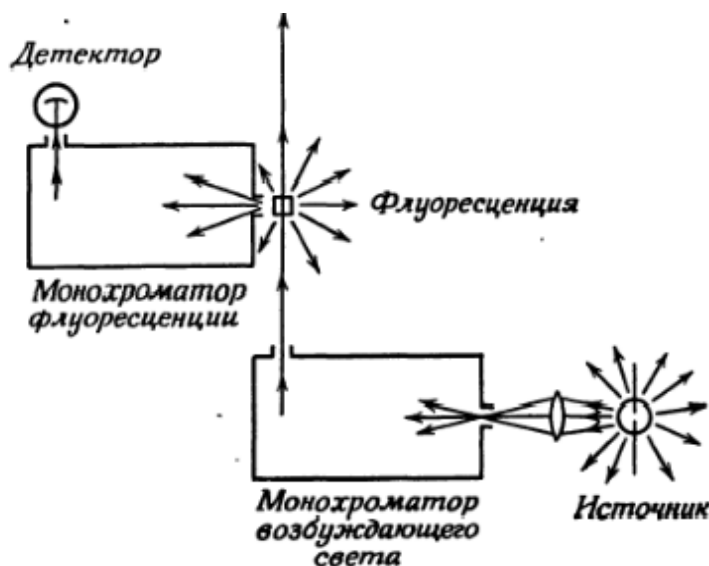


Рисунок 10 – Принципиальная схема спектрофлуориметра

Подготовка и проверка работы спектрофлуориметра «Панорама» производили в соответствии с инструкцией по эксплуатации и техническому описанию соответствующего прибора. В работе была использована мерная лабораторная стеклянная посуда:

- колбы наливные вместимостью 25, 50, 100 мл;
- цилиндр вместимостью 20 мл;
- колбы мерные вместимостью 25 мл.

Добавки исследуемых веществ осуществляли при помощи дозатора типа ДО-100-1000 с дискретностью установки доз 5 мкл и погрешностью не более 1,5 % отн.;

Для каждого раствора какого-либо вещества использовали отдельную пипетку или сменный наконечник дозатора.

Для проведения экспериментальных исследований в работе использовали кварцевые кюветы объемом 4 мл с объемом анализируемой пробы 3 мл.

2.2 Объекты исследования

Медицинский препарат «Лактобактерин», представляющий собой микробную массу живых, антагонистически активных лактобактерий штаммов *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, или *L. plantarum* 38, или *L. fermentum* 90T-C4 или *L. fermentum* 39, лиофилизированную в среде культивирования с добавлением защитной сахарозо-желатиновой или сахарозо-желатино-молочной среды (произв. ФГУП «НПО «Микроген», Россия).

Медицинский препарат «Колибактерин» сухой представляет собой микробную массу живых бактерий кишечной палочки штамма M17, высушенных в среде культивирования с добавлением сахарозо-желатиновой защитной среды (произв. ФГУП «НПО «Микроген», Россия).

Кислотно-основной индикатор бромкрезоловый зеленый (ГОСТ 4919.1-77.).

Кислотно-основной индикатор метилтимоловый синий (ГОСТ 4919.1-77.).

Кислотно-основной индикатор бромкрезоловый красный (пурпуровый) (ГОСТ 4919.1-77.).

2.3 Приготовление суспензии бактерий и растворов индикаторов и методика эксперимента

Суспензию лактобактерий готовили путем растворения содержимого ампулы в 25 мл физ.раствора (0,9 % раствор натрия хлорида). Содержание бактерий в приготовленном растворе составило $2 \cdot 10^9$ КОЕ.

Суспензию колибактерий готовили путем растворения содержимого ампулы в 15 мл физ.раствора. Содержание бактерий в приготовленном растворе составило $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ.

Воду, используемую в работе, очищали дистилляцией с использованием дистиллятора ДЭ-4.

Растворы индикаторов метилтимолового синего, бромкрезолового зеленого и бромкрезолового красного с концентрацией 0,01 моль/л готовили путем растворения в дистиллированной воде содержимого навесок, взвешенных на лабораторных аналитических весах с точностью 0,0002 г.

Перед проведением экспериментов проверяли чистоту кювет. Перед началом каждой серии опытов снимали спектр фонового растворителя, с целью контроля его чистоты и чистоты посуды. В случае отсутствия пиков на спектре флуоресценции, растворитель и посуда считались чистыми.

Дистиллированную воду, объемом 3 мл, помещали в кювету. Кювету устанавливали в кюветное отделение, закрывали крышку и снимали синхронный спектр исследуемого вещества в диапазоне длин волн 200 – 650 нм. Всю операцию повторяли не менее трех раз.

Далее в кювету помещали анализируемый стандартный раствор и снимали синхронный спектр в аналогичных условиях. На спектре выделяли длину волны с максимальным пиком, далее данную длину волны устанавливали в качестве длины волны возбуждения флуоресценции и снимали спектр регистрации со смещением 20 нм от значения длины волны возбуждения. Полученный спектр флуоресценции применяли для анализа вещества в реальном объекте.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КИСЛОТНО-ОСНОВНЫХ ИНДИКАТОРОВ В ПРИСУТСТВИИ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

3.1 Индикатор метил-тимоловый синий

Для определения влияния лактобактерий на оптические свойства индикатора метилтимолового синего, были приготовлены бактериальные суспензии с добавлением 1 мл и 2 мл индикатора МТС.

Положение максимума флуоресценции суспензии ЛБ при добавлении метил-тимолового синего совпадает с положением максимума флуоресценции раствора чистого индикатора. Так как не было получено нового сигнала при взаимодействии лактобактерий с раствором индикатора, спектры флуоресценции не приводятся, а индикатор МТС не применялся в дальнейшей работе.

3.2 Индикатор бромкрезоловый зеленый

Для определения влияния лактобактерий на оптические свойства индикатора бромкрезолового зеленого, были приготовлены бактериальные суспензии с добавлением 1 мл и 2 мл индикатора.

Аналогично индикатору метилтимоловому синему при добавлении суспензии ЛБ к раствору индикатора бромкрезолового зеленого не было получено нового сигнала, отличного от сигнала индикатора и ЛБ. В связи с этим, спектры флуоресценции также не приводятся, а индикатор БКЗ не применялся в дальнейшей работе.

3.3 Индикатор бромкрезоловый красный

Для определения влияния индикатора на лактобактерии, были приготовлены бактериальные суспензии, к которым добавляли 1 и 2 мл индикатора. Спектры флуоресценции исследуемых растворов представлены на рисунке 11.

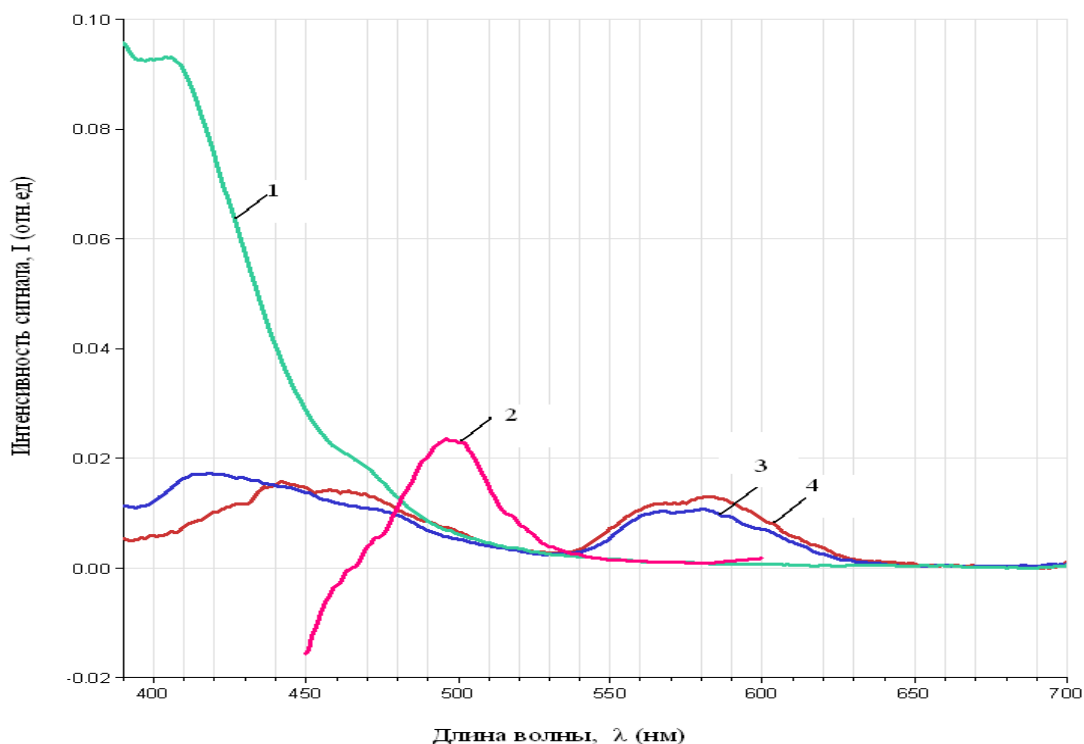


Рисунок 11 - Синхронные спектры флуоресценции исследуемых растворов:
 1 – ЛБ $2 \cdot 10^8$; 2 – БКК 0,01 моль/л; 3 – ЛБ $2 \cdot 10^8$ + 1мл БКК 0,01 моль/л;
 4 – ЛБ $2 \cdot 10^8$ + 2мл БКК 0,01 моль/л.

Из рисунка 11 видно, что положение максимума пика флуоресценции бромкрезолового красного (500 нм) не совпадает с положениями пиков спектра флуоресценции лактобактерий. При добавлении 1 мл бромкрезолового красного к лактобактериям наблюдаются появление нового сигнала при длине волны 590 нм, а при добавлении 2 мл раствора индикатора, наблюдается небольшое увеличение интенсивности сигнала в данной области.

3.4 Исследование влияния pH на индикатор бромкрезоловый красный

Для определения природы полученного сигнала при длине волны 590 нм было проведено исследование влияния pH раствора на свойства бромкрезолового красного. Для данного анализа были взяты буферные смеси с различным значением pH:

- калий тетраоксалат $\text{KH}_3(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{pH}=1.65$;
- калий гидрофталат $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$, $\text{pH}=4.01$;
- калий дигидрофосфат KH_2PO_4 + натрий гидрофосфат Na_2HPO_4 , $\text{pH}=6.86$;
- натрий тетраборат 10-водный $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{pH}=9.18$.

Данные буферные системы соответствуют кислой, нейтральной и щелочной средам. Результаты исследования влияния pH на оптические свойства индикатора БКК представлены на рисунке 12.

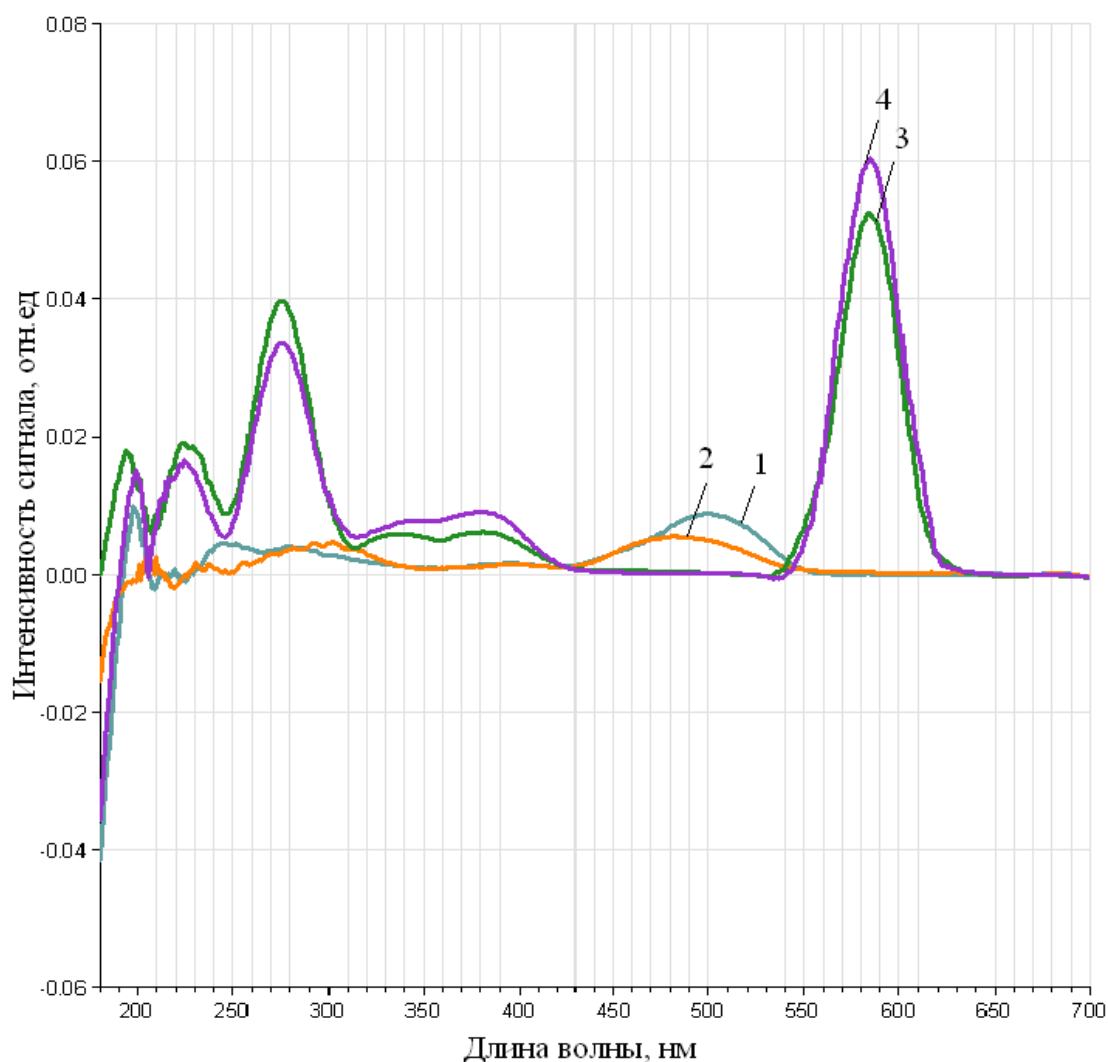


Рисунок 12 - Синхронный спектр флуоресценции индикатора бромкрезолового красного при различных pH :

- 1 - 1,65 10мл +1мл БКК 0,001 моль/л; 2 - 4,01 10мл +1 мл БКК 0,001 моль/л;
3 – 6,86 10мл +1 мл БКК 0,001 моль/л; 4 – 9,18 10мл +1 мл БКК 0,001 моль/л.

Исследования показали, что при взаимодействии индикатора с растворами различных pH, появляются сигналы не характерные для чистого индикатора. При добавлении растворов щелочных pH, появляется сигнал в области 590 нм, а при добавлении растворов кислых pH появляется сигнал в области 430 нм. Положение максимума флуоресценции при 590 нм совпадает с ранее полученным сигналом при взаимодействии лактобактерий с бромкрезоловым красным, следовательно, характер взаимодействия лактобактерий с индикатором аналогичен поведению индикатора в щелочной среде, это может быть связано с тем, что в процессе метаболизма лактобактерии вырабатывают продукты, обладающие щелочной средой.

3.5 Исследование взаимодействия лактобактерий с бромкрезоловым красным при различных концентрациях индикатора.

Для исследования взаимодействия БКК с лактобактериями при различных концентрациях индикатора были приготовлены рабочие растворы индикатора следующих концентраций: $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л и $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Анализируемые растворы были приготовлены путем последовательного разбавления исходного раствора с концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л.

Целью данного исследования является подбор рабочей концентрации индикатора, при которой возможно проводить исследование жизненной активности лактобактерий.

На рисунках 13 и 14, представлены синхронные спектры флуоресценции раствора индикатора БКК (концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л и $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л соответственно) при добавлении лактобактерий.

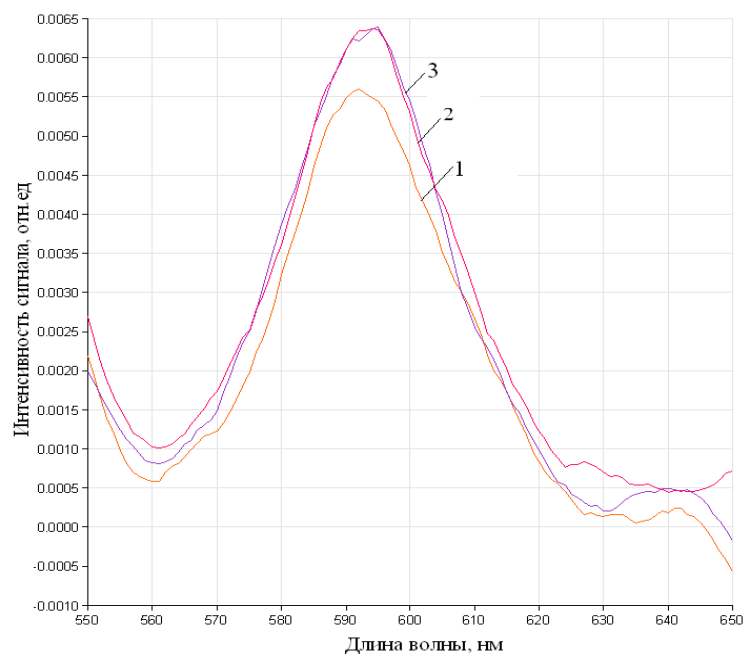


Рисунок 13 - Синхронный спектр флуоресценции исследуемых веществ:

1 – БКК $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 2 – БКК $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л + 1мл ЛБ $2 \cdot 10^8$;

3 – БКК $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л + 2мл ЛБ $2 \cdot 10^8$.

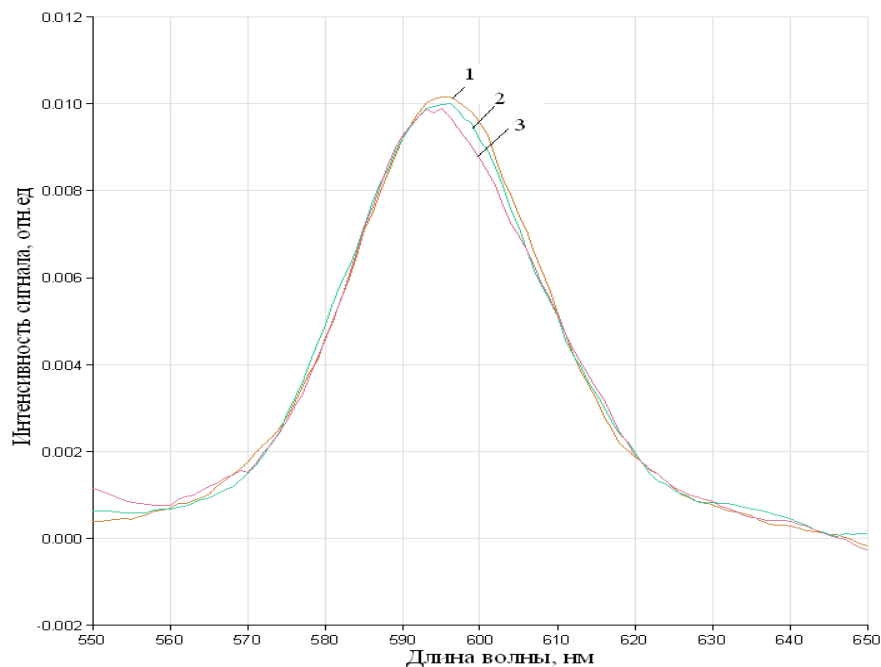


Рисунок 14 - Синхронный спектр флуоресценции исследуемых веществ:

1 – БКК $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 2 – БКК $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л + 1мл ЛБ $2 \cdot 10^8$;

3 – БКК $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л + 2мл ЛБ $2 \cdot 10^8$.

Исследование показало, что интенсивность сигнала не меняется при добавлении ЛБ, предположительно, это связано с низкой концентрацией индикатора.

На рисунках 15 и 16, представлены синхронные спектры флуоресценции раствора индикатора БКК (концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л и $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л соответственно) при добавлении лактобактерий.

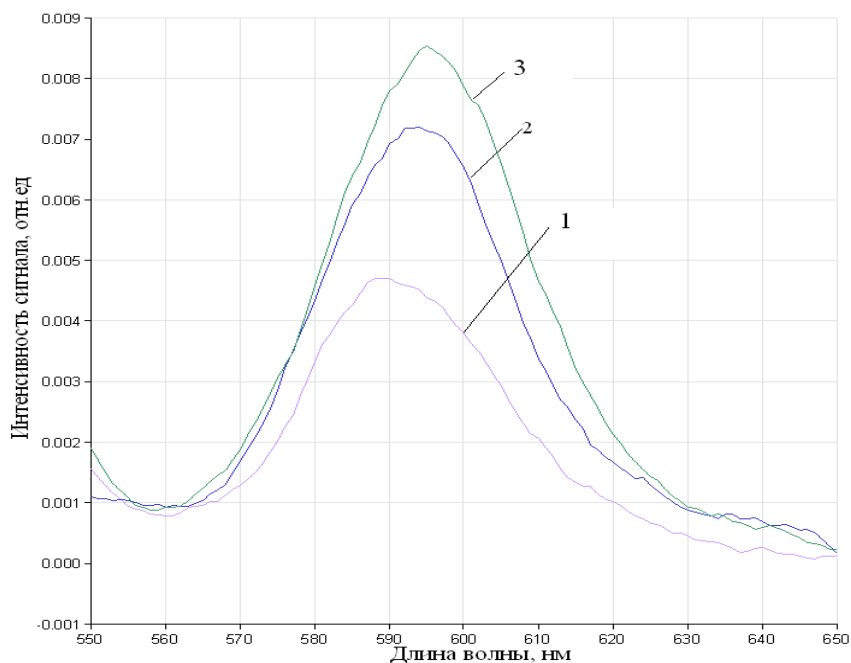


Рисунок 15 - Синхронный спектр флуоресценции исследуемых веществ:

1 – БКК $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 2 – БКК $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л + 1мл ЛБ $2 \cdot 10^8$;

3 – БКК $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л + 2мл ЛБ $2 \cdot 10^8$.

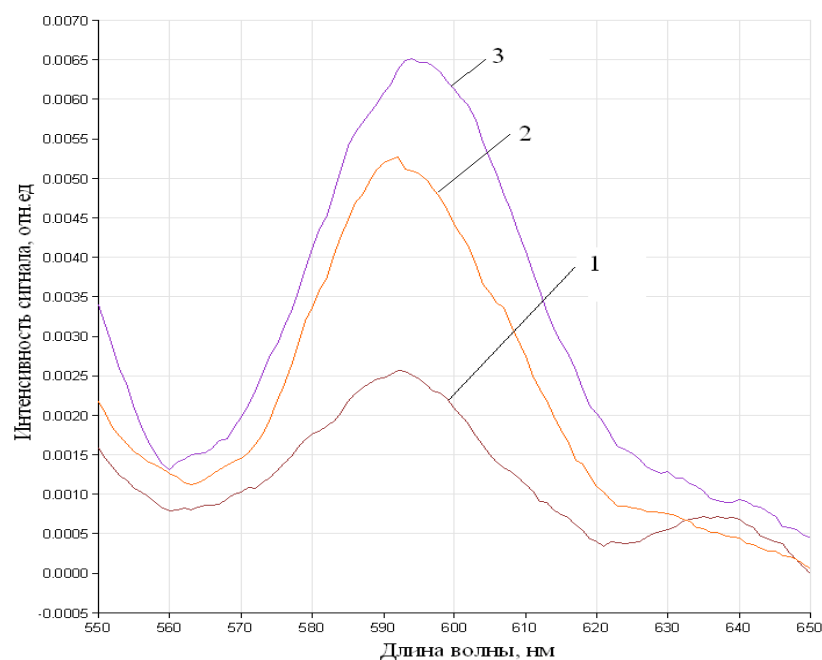


Рисунок 16 - Синхронный спектр флуоресценции исследуемых веществ:

1 – БКК $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 2 – БКК $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л + 1мл ЛБ $2 \cdot 10^8$;

3 – БКК $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л + 2мл ЛБ $2 \cdot 10^8$.

Проведенный эксперимент показал, что интенсивность флуоресцентного сигнала индикатора увеличивается в области 590 нм при добавлении ЛБ, это связано с продуктами, вырабатываемыми бактериями в процессе метаболизма.

Исследования, проведенные на примере лактобактерий, показали, что при добавлении раствора индикатора к бактериальной суспензии, появляется сигнал при длине волны 590 нм, что соответствует поведению индикатора в щелочной среде, а при 430 нм – поведению индикатора в кислой среде. Также было установлено, что при увеличении добавки суспензии лактобактерий к раствору индикатора наблюдается рост сигнала при 590 нм, что можно объяснить активной выработкой продуктов метаболизма, имеющих щелочную среду. Данный факт свидетельствует о том, что исследуемые лактобактерии обладают высокой жизненной активностью, которую можно определить по изменению флуоресцентных свойств индикатора бромкрезолового красного.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИНДИКАТОРА БРОМКРЕЗОЛОВОГО КРАСНОГО В ПРИСУТСТВИИ КОЛИБАКТЕРИЙ

4.1 Исследование оптических свойств индикатора бромкрезолового красного фотометрическим методом

Следующим этапом работы стало исследование влияния колибактерий на оптические свойства индикатора бромкрезолового красного. Для данного исследования был выбран метод фотометрического анализа, основанный на регистрации спектров пропускания исследуемых растворов.

Для исследования также был приготовлен водный раствор индикатора, однако, при добавлении суспензии колибактерий к раствору БКК не наблюдалось никакого изменения спектра пропускания или появления нового сигнала при их взаимодействии. В связи с этим было принято решение приготовить щелочной раствор индикатора в соответствии с литературными данными.

Для приготовления щелочного раствора индикатора растирали 0,04 г бромкрезолового пурпурного с 0,74 мл 0,1 М раствора гидроокиси натрия, после растворения доливали дистиллированной водой до 100 мл и получали 0,04%-ный водный раствор натриевой соли красителя.

При регистрации спектров пропускания приготовленного раствора наблюдалось зашкаливание сигнала, в связи с чем, исходный раствор был разбавлен в 10 раз.

На рисунке 17 представлен спектр пропускания раствора индикатора.

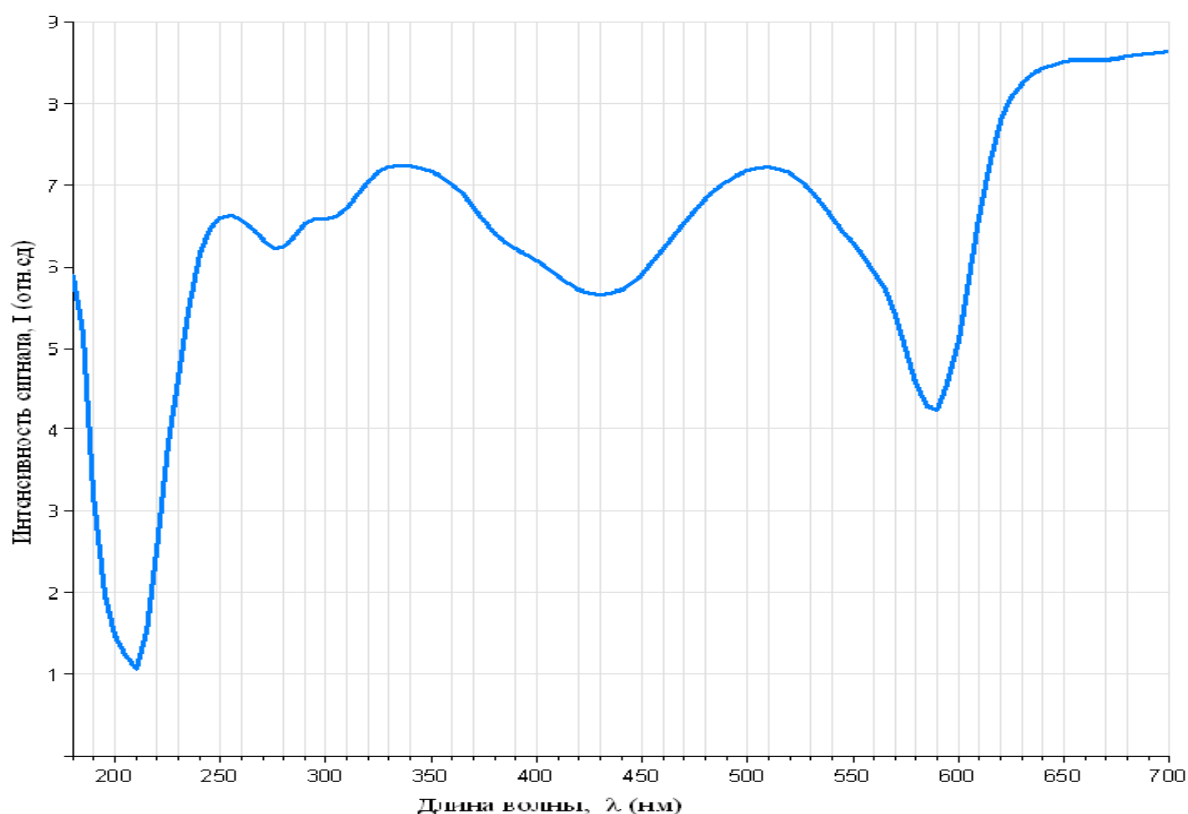


Рисунок 17 - Спектр пропускания 0,004% водного раствора натриевой соли индикатора бромкрезолового красного

Исходный раствор индикатора имеет два пика с минимумами пропускания при 430 и 590 нм. Ранее было установлено, что появление сигнала при длине волны 590 нм соответствует поведению индикатора в щелочной среде, а при 430 нм – в кислой среде.

Основываясь на полученных данных, было проведено исследование влияния добавки суспензии колибактерий на изменение оптических свойств индикатора БКК.

4.2 Исследование взаимодействия колибактерий с бромкрезоловым красным

К исходному раствору индикатора была сделана добавка колибактерий с содержанием $1 \cdot 10^6$ КОЕ. Изменение интенсивности пропускания раствора индикатора фиксировалось через 1 и 2 часа анализа. Результаты представлены на рисунке 18.

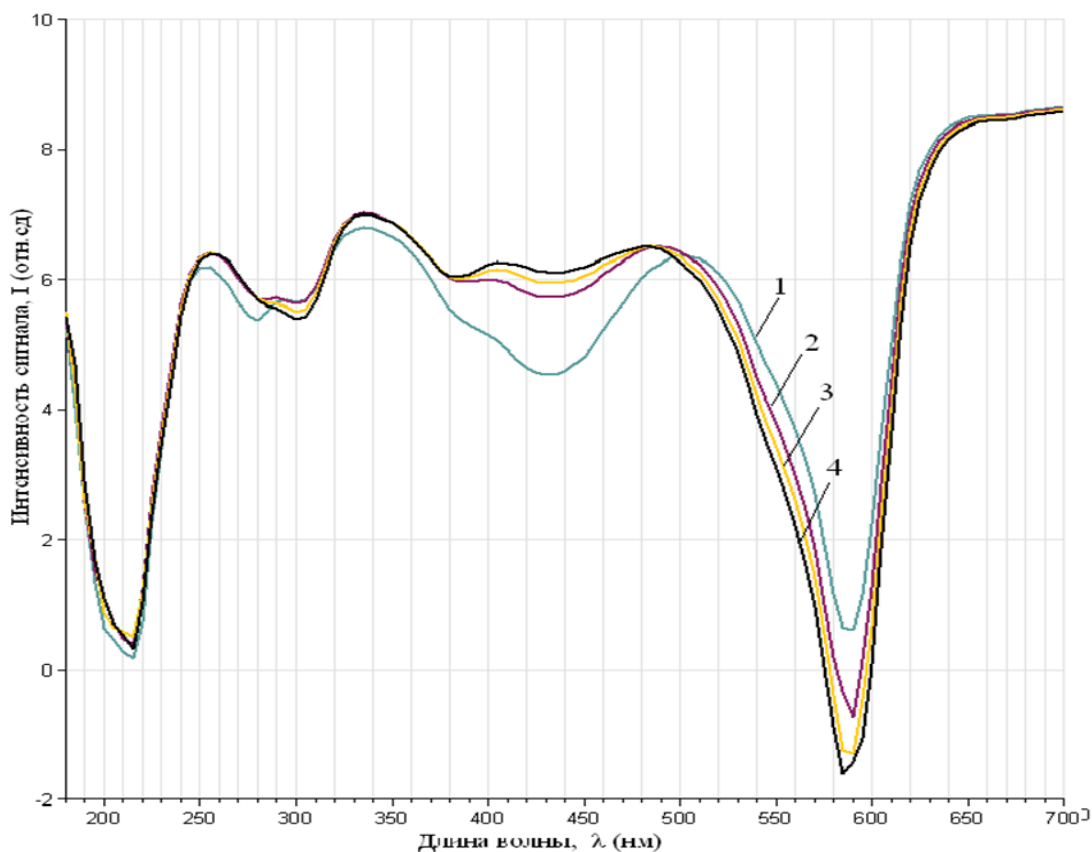


Рисунок 18 - Спектры пропускания анализируемых веществ:

- 1 – 0,004% NaOH + БКК; 2 – 1мл КБ $1 \cdot 10^6$ КОЕ + (0,004% NaOH + БКК);
- 3 – ч/з 1 час 1мл КБ $1 \cdot 10^6$ КОЕ + (0,004% NaOH + БКК);
- 4 - ч/з 2 час 1мл КБ $1 \cdot 10^6$ КОЕ + (0,004% NaOH + БКК).

Из рисунка видно, что в области 590 нм интенсивность пропускания уменьшается. Это связано с выработкой бактериями в процессе метаболизма продуктов, имеющих щелочную среду и увеличением их содержания в культуральной среде, что доказывает высокую жизненную активность

бактерий по истечению времени анализа (2 часа). В области 430 нм, наблюдается увеличение интенсивности пропускания, что свидетельствует об уменьшении содержания в культуральной среде продуктов, имеющих кислую среду, а также подтверждает предположение о том, что вырабатываемый в процессе бактериального метаболизма продукт имеет щелочную среду.

Далее, было исследовано влияние добавки глюкозы в культуральную среду колибактерий на их жизненную активность, так как известно, что глюкоза является питательным субстратом для исследуемых микроорганизмов.

Для анализа были приготовлены суспензии колибактерий с содержанием микроорганизмов $1 \cdot 10^6$ и $1 \cdot 10^8$ КОЕ. В каждый флакон с суспензией исследуемых бактерий была сделана добавка раствора глюкозы объемом 5 мл. Регистрация изменения интенсивности пропускания была проведена непосредственно после внесения глюкозы и через час после добавки.

На рисунке 19 представлен спектр пропускания раствора анализируемого индикатора при добавлении к нему суспензии колибактерий с концентрацией $1 \cdot 10^6$ КОЕ.

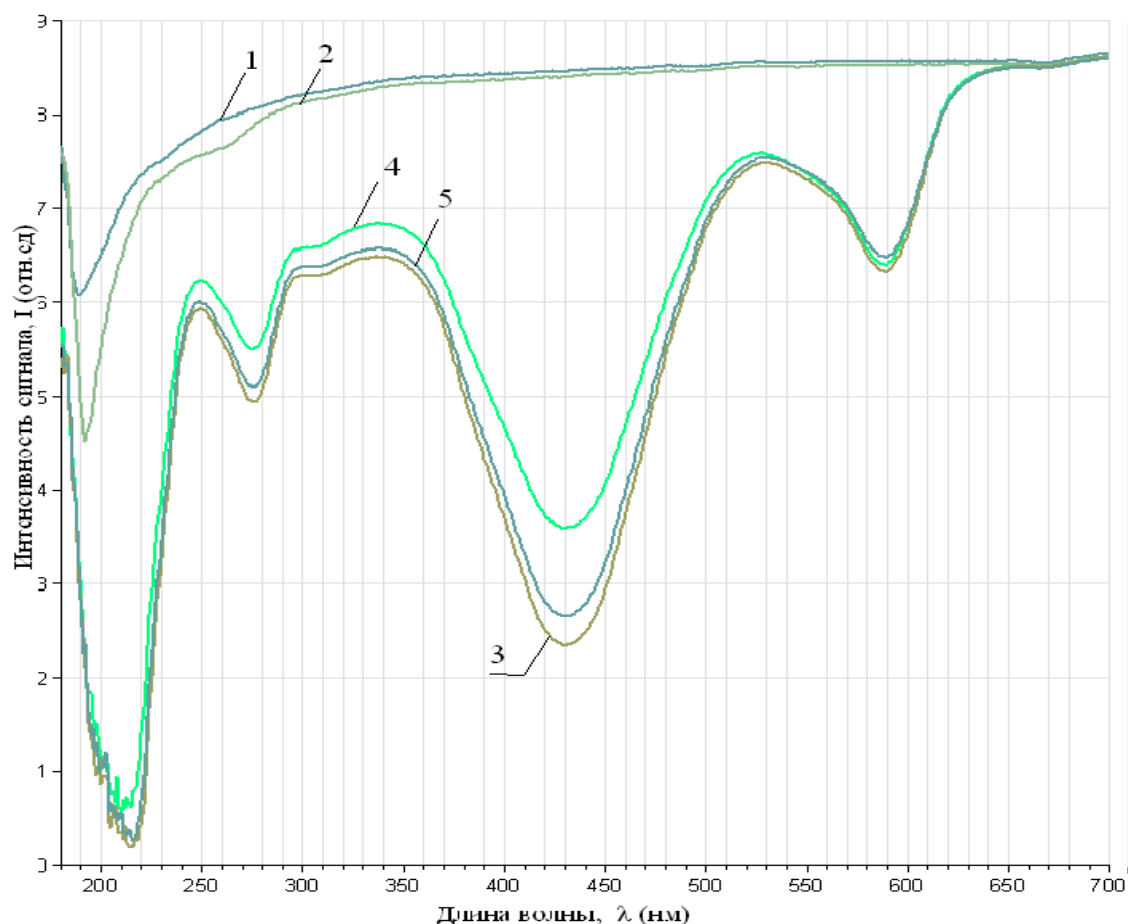


Рисунок 19 - Спектр пропускания исследуемых растворов:

- 1 – КБ $1 \cdot 10^6$ КОЕ; 2 – 5мл КБ $1 \cdot 10^6$ КОЕ + 5мл Гл; 3 – 0,004 % NaOH + БКК; 4 - 1мл КБ $1 \cdot 10^6$ КОЕ + (0,004 % NaOH + БКК);
5 - ч/з 1 час 1мл (КБ $1 \cdot 10^6$ КОЕ + Гл) + (0,004 % NaOH + БКК).

Из рисунка видно, что при добавлении глюкозы в культуральную жидкость по истечению времени анализа в области 430 нм наблюдается уменьшение пропускания, за счет выработки продуктов имеющих кислую среду (кислоты).

Следующим этапом работы стало исследование изменения оптических свойств БКК при добавлении суспензии колибактерий в зависимости от времени их культивирования. Добавки бактериальной суспензии осуществлялись каждые 24 часа в течение 5 суток. Для наглядности представления полученных результатов были построены

диаграммы изменения кислотности культуральной среды в процессе жизнедеятельности колибактерий (рис.20).

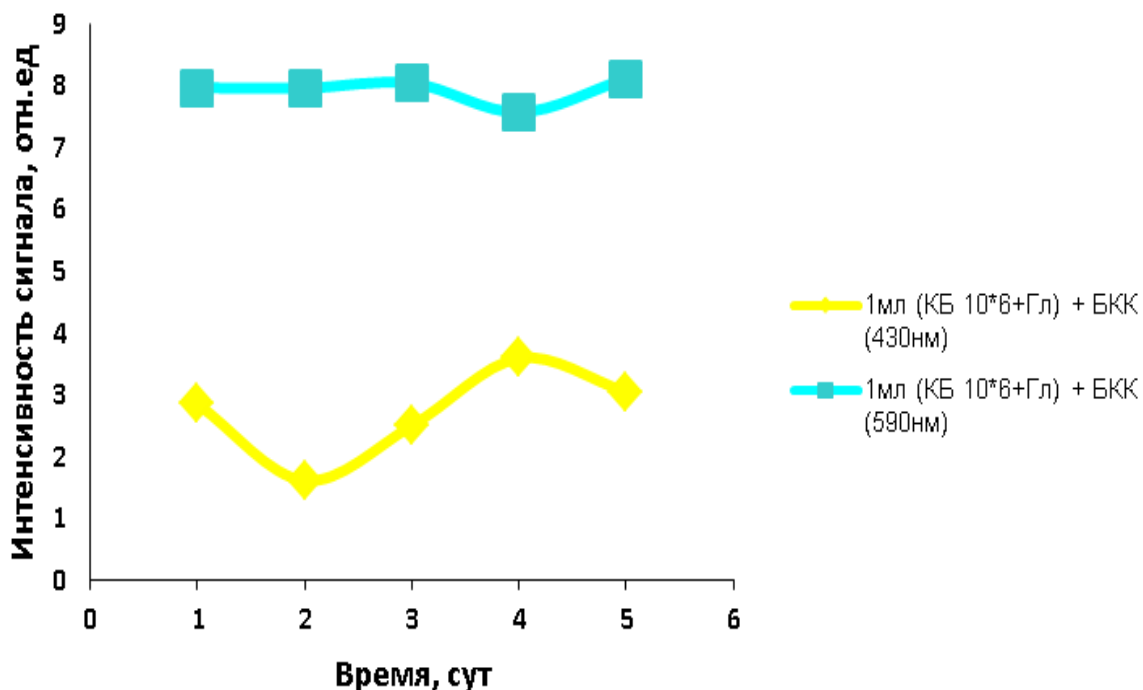


Рисунок 20 - Изменение интенсивности пропускания раствора индикатора от времени культивирования колибактерий

Из рисунка видно, что с течением времени анализа происходит изменение кислотности среды – при увеличении содержания продуктов, имеющих кислотную среду, интенсивность пропускания уменьшается в области 430 нм, что свидетельствует о высокой жизненной активности исследуемых колибактерий. В тоже время, интенсивность пропускания в области 590 нм увеличивается, что говорит об уменьшении содержания в культуральной среде продуктов, имеющих щелочную среду. Подобная динамика может быть показателем способности колибактерий поддерживать необходимое для их роста значение кислотности среды.

Для доказательства жизненной активности бактерий был применен способ сканирования по регистрации флуоресценции, при длине волны возбуждения 360 нм, интервал регистрации флуоресценции 390-650 нм.

Данные параметры регистрации соответствуют регистрации флуоресценции внутриклеточного кофермента никотинамидадениндинуклеотида (NADH), который является маркером жизненной активности бактериальных клеток.

На рисунке 21 представлен график зависимости интенсивности флуоресценции внутриклеточного NADH от времени анализа.

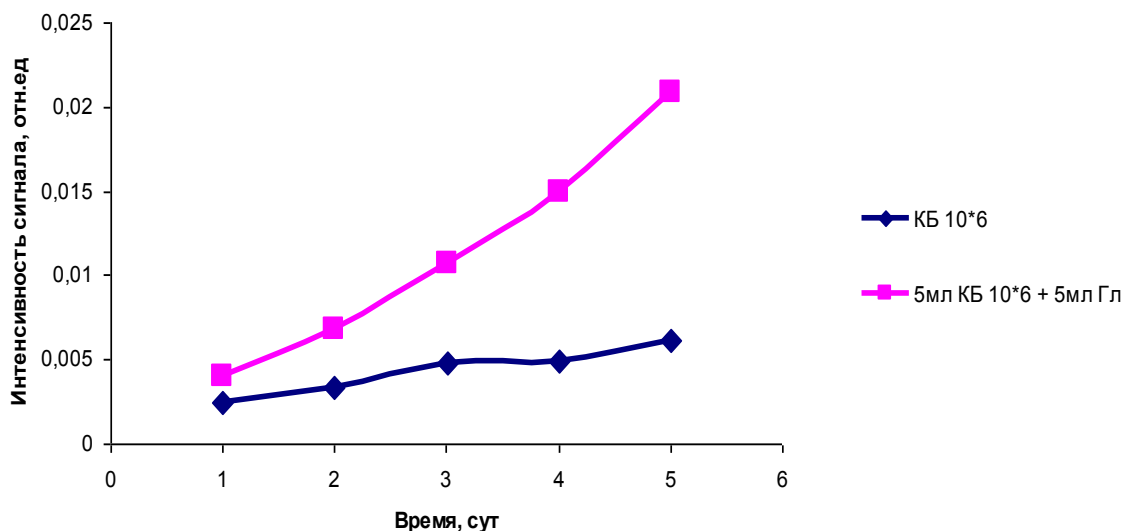


Рисунок 21 - Зависимость интенсивности флуоресценции внутриклеточного NADH от времени анализа

Исследование показано, что по истечению времени анализа интенсивность флуоресцентного сигнала внутриклеточного кофермента NADH увеличивается, что связано с высокой жизненной активностью колибактерий. Аналогичная зависимость была получена при исследовании влияния жизненной активности колибактерий на изменение оптических свойств индикатора БКК.

Было установлено, что при добавлении глюкозы в качестве питательного субстрата жизненная активность колибактерий увеличивается, что подтверждается увеличением интенсивности флуоресценции NADH, а также, динамикой изменения интенсивности пропускания раствора индикатора бромкрезолового красного.

Также, аналогичным образом было проведено исследование суспензии колибактерий с содержанием микроорганизмов $1 \cdot 10^8$ КОЕ.

На рисунке 22 представлен спектр пропускания раствора анализируемого индикатора при добавлении к нему суспензии колибактерий с концентрацией $1 \cdot 10^8$ КОЕ.

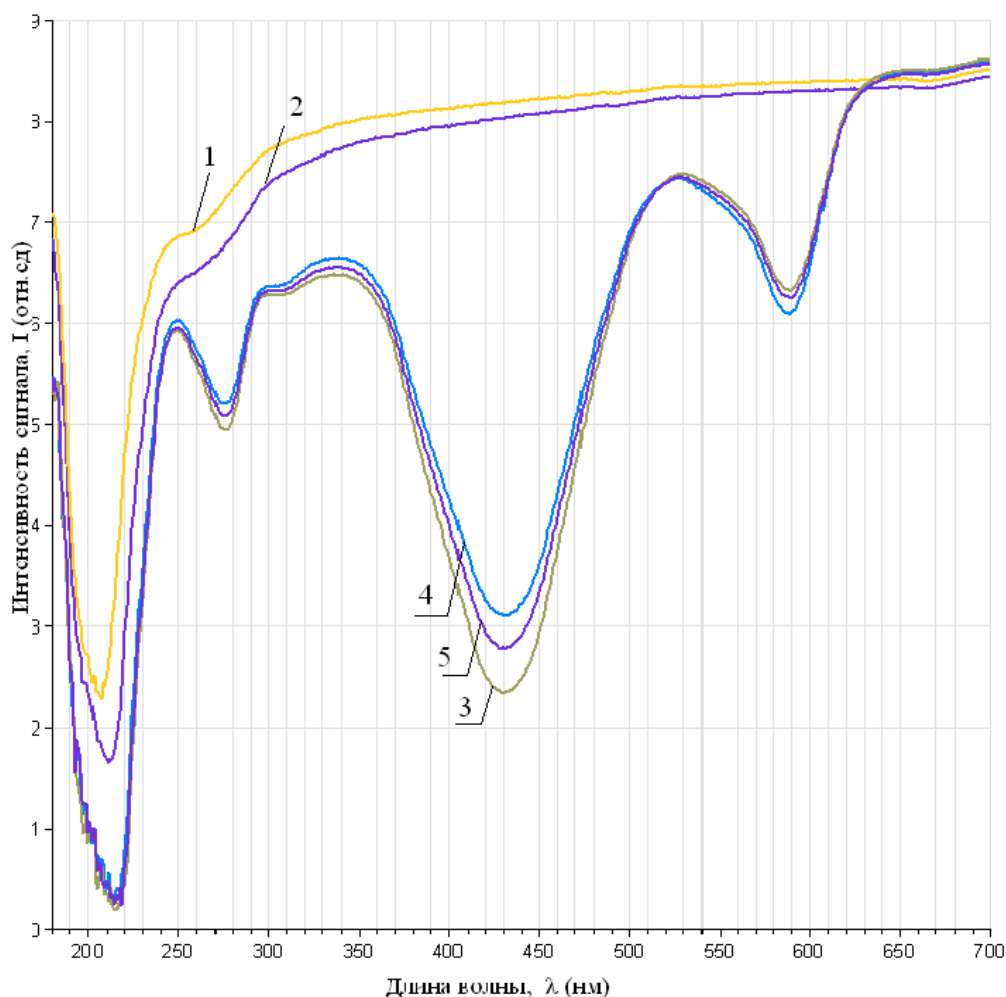


Рисунок 22 - Спектр пропускания исследуемых растворов:

- 1 – КБ 10^8 КОЕ; 2 – 5мл КБ $1 \cdot 10^8$ КОЕ + 5мл Гл; 3 – 0,004 % NaOH + БКК;
- 4 - 1мл КБ $1 \cdot 10^8$ КОЕ +(0,004 % NaOH + БКК);
- 5 - ч/з 1 час 1мл (КБ $1 \cdot 10^8$ КОЕ + Гл) +(0,004 % NaOH + БКК).

Из рисунка видна аналогичная предыдущему случаю динамика изменения кислотности среды по изменению интенсивности пропускания раствора индикатора в зависимости от времени культивирования

колибактерий. При добавлении глюкозы в бактериальную суспензию по истечению времени анализа в области 430 нм также наблюдается уменьшение интенсивности пропускания за счет выработки продуктов имеющих кислую среду (кислоты).

На рисунке 23 представлена динамика изменения кислотности среды в процессе жизнедеятельности колибактерий.

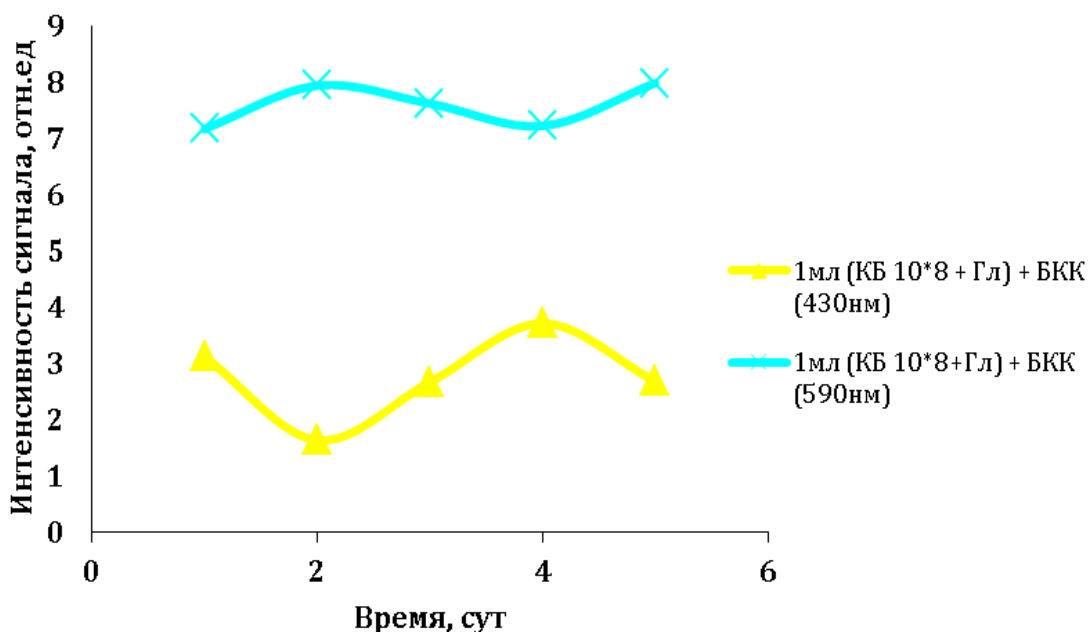


Рисунок 23 - Изменение интенсивности пропускания раствора индикатора от времени культивирования колибактерий

Из рисунка 23 видно, что с течением времени анализа происходит изменение кислотности среды, что свидетельствует о высокой жизненной активности исследуемых колибактерий. Подобная динамика может быть показателем способности колибактерий поддерживать необходимое для их роста значение кислотности среды.

Для доказательства жизненной активности колибактерий также был применен способ сканирования по регистрации флуоресценции при длине волны возбуждения 360 нм, интервал регистрации флуоресценции 390-650 нм.

На рисунке 24 представлен график зависимости интенсивности флуоресценции внутриклеточного NADH от времени анализа.

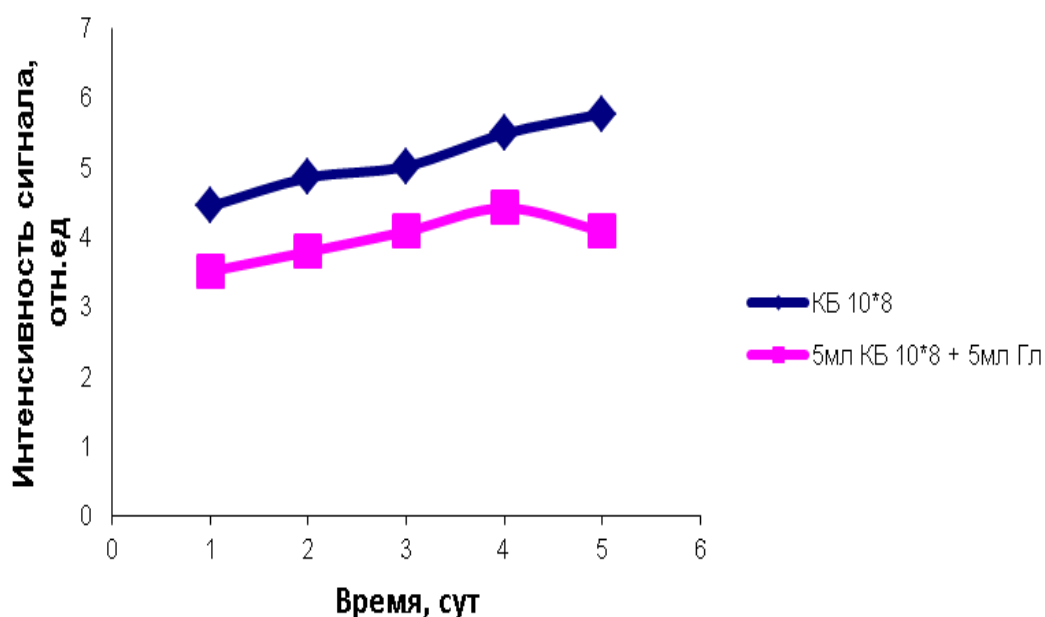


Рисунок 24 - Зависимость интенсивности флуоресценции внутриклеточного NADH от времени анализа

Исследование показало аналогичное поведение флуоресцентного сигнала внутриклеточного кофермента NADH в зависимости от времени культивирования колибактерий, как в случае содержания бактерий $1 \cdot 10^6$ КОЕ, так и в случае содержания $1 \cdot 10^8$ КОЕ. Однако в случае большего содержания микроорганизмов не наблюдается резкого увеличения интенсивности флуоресценции NADH, а при добавлении глюкозы на 5 сутки анализа наблюдается небольшое уменьшение интенсивности его флуоресценции, что может быть объяснено высоким содержанием колибактерий в суспензии и гибелью микроорганизмов из-за выработки большого количества продуктов метаболизма.

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ4В	Тимофеевой Елене Викторовне

Институт	ИФВТ	Кафедра	ОХХТ
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	Химическая технология

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих	Амортизация специального оборудования составила 28400 рублей, итоговая плановая себестоимость НИ 368025 рублей.
2. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений	Отчисления на социальные нужды 30 %, составили 46312,8 рубль.

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ	1.1. Потенциальные потребители результатов исследования 1.2. Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения 1.3. Диаграмма Исикава 1.4. Оценка готовности проекта к коммерциализации 1.5. Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования
2. Разработка устава научно-технического проекта	2.1. Устав проекта 2.2. Организационная структура проекта 2.3. Ограничения и допущения проекта
3. Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок	3.1. Иерархическая структура работ проекта 3.2. Контрольные события проекта 3.3. План проекта 3.4. Бюджет научного исследования 3.5. Организационная структура проекта 3.6. Матрица ответственности 3.7. План управления коммуникациями проекта 3.8. Реестр рисков проекта
4. Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности	4.1 Оценка сравнительной эффективности исследования

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

1. Оценка конкурентоспособности технических решений
2. Диаграмма Исикава
3. График проведения НТИ
4. Иерархическая структура работ проекта
5. Проектная организационная структура проекта
6. Потенциальные риски

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Криницына З.В.	к.т.н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4В	Тимофеева Е.В.		

5 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

Тема данной выпускной квалификационной работы «Исследование жизненной активности пробиотических микроорганизмов методом флуориметрии».

В настоящее время активно развивается промышленное культивирование пробиотических микроорганизмов. Пробиотики входят в состав функциональных продуктов питания, потребление которых с каждым годом неуклонно растет. К пробиотикам традиционно относятся лактобактерии и колибактерии.

Процесс промышленного культивирования микроорганизмов состоит из нескольких этапов и проводится в специальных аппаратах – биореакторах. Существуют различные приемы проведения процесса культивирования, однако, в независимости от применяемого способа необходим контроль жизненной активности культивируемых микроорганизмов. Существует несколько способов определения жизненной активности микроорганизмов, например, измерение количества содержащегося в культуральной жидкости кислорода, определение активности ферментов метаболизма микроорганизмов и т.д.

Научная новизна работы заключается в применении спектроскопических методов анализа для определения жизненной активности микроорганизмов по изменению оптических свойств ряда кислотно-основных индикаторов.

5.1 Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Целевым рынком пробиотических микроорганизмов являются продукты питания и напитки (в основном, молочные продукты и йогурты в частности), пищевые добавки, фармацевтические препараты.

Сегментировать рынок пробиотических микроорганизмов можно в зависимости от содержания в продуктах питания. Карта сегментирования представлена на рисунке 25.



Рисунок 25 – Карта сегментирования рынка пробиотических микроорганизмов.

В результате сегментирования выявили, что основными сегментами рынка в пробиотических микроорганизмов являются лактобактерии и колибактерии.

Т.к. задачей является определения жизненной активности микроорганизмов, с целью усовершенствования контроля технологического процесса их культивирования, то основной сегмент рынка, на который мы будем ориентироваться – это традиционные пробиотические микроорганизмы, лактобактерии и колибактерии.

5.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения позволяет провести оценку сравнительной эффективности научной разработки и определить направления для ее будущего повышения. Целесообразно проводить данный анализ с помощью оценочной карты, которая приведена в таблице 2.

Таблица 2 – Оценочная карта для сравнения конкурентных технических решений (разработок)

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		Б _ф	Б _{к1}	Б _{к2}	К _ф	К _{к1}	К _{к2}
1	2	3	4	5	6	7	8
Технические критерии оценки ресурсоэффективности							
1. Чувствительность	0,3	5	5	3	1,5	1,5	0,9
2. Малый расход ферментов и реактивов	0,2	5	3	5	1,5	0,9	1,5
Экономические критерии оценки эффективности							
3. Быстрота определения	0,3	4	3	4	0,6	0,3	0,8
4. Позволяет следить за течением реакции во времени	0,2	4	3	3	0,3	0,4	0,4
Итого	1				3,9	3,1	3,6

Б_ф- наша разработка;

Б_{к1}- по измерение количества содержащегося в культуральной жидкости кислорода;

Б_{к2}- по определение активности ферментов метаболизма микроорганизмов.

К конкурентным преимуществам способа определения жизненной активности микроорганизмов, можно отнести: чувствительность и быстрота определения. Все эти критерии позволяют использовать метод флуориметрии для определения жизненной активности пробиотических микроорганизмов по изменению оптических свойств ряда кислотно-основных индикаторов.

5.1.3 Диаграмма Исикава

Диаграмма причины-следствия Исикавы (Cause-and-Effect-Diagram) - это графический метод анализа и формирования причинно-следственных связей, инструментальное средство для систематического определения причин проблемы и последующего графического представления.

Область применения диаграммы:

- Выявление причин возникновения проблемы;
- Анализ и структурирование процессов на предприятии;
- Оценка причинно-следственных связей.

Сначала формулируется существующая проблема, или дефект качества. Главные категории потенциальных причин – это оборудование, материалы, человек, процессы, менеджмент, измерительные средства и т. д. Для каждой главной категории на диаграмму наносятся все вероятные причины проблемы. Диаграмма Исикавы представлена на рисунке 26.

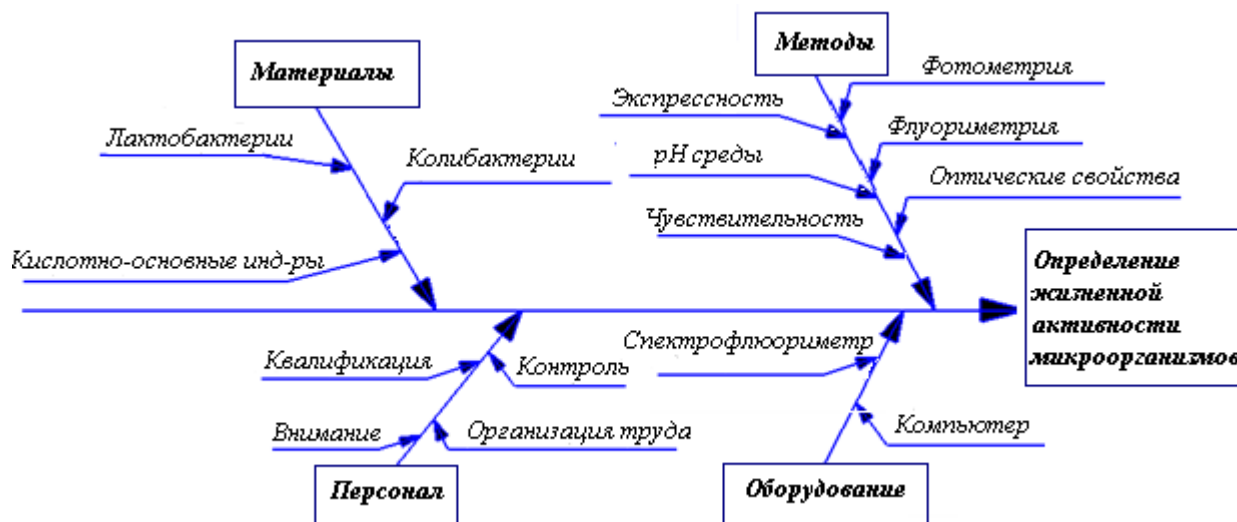


Рисунок 26 – Диаграмма Исикавы

5.1.4 Оценка готовности проекта к коммерциализации

На какой бы стадии жизненного цикла не находилась научная разработка полезно оценить степень ее готовности к коммерциализации и

выяснить уровень собственных знаний для ее проведения (или завершения). Для этого необходимо заполнить специальную форму, содержащую показатели о степени проработанности проекта с позиции коммерциализации и компетенциям разработчика научного проекта. Перечень вопросов приведен в таблице 3.

Таблица 3 - Бланк оценки степени готовности научного проекта к коммерциализации

п/п	Наименование	Степень проработанности научного проекта	Уровень имеющихся знаний у разработчика
1.	Определен имеющийся научно-технический задел	4	4
2.	Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела	5	4
3.	Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке	5	4
4.	Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок	1	2
5.	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	4	3
6.	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	1	2
7.	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	1	2
8.	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	1	2
9.	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	2	2
10	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	3	3
11	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	1	2
12	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	1	1
13	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	1	2
14	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	1	1
15	Проработан механизм реализации научного проекта	2	2
	ИТОГО БАЛЛОВ	33	40

При проведении анализа по таблице, приведенной выше, по каждому показателю ставится оценка по пятибалльной шкале. При этом система измерения по каждому направлению (степень проработанности научного проекта, уровень имеющихся знаний у разработчика) отличается. Так, при оценке степени проработанности научного проекта 1 балл означает не проработанность проекта, 2 балла – слабую проработанность, 3 балла – выполнено, но в качестве не уверен, 4 балла – выполнено качественно, 5 баллов – имеется положительное заключение независимого эксперта. Для оценки уровня имеющихся знаний у разработчика система баллов принимает следующий вид: 1 означает не знаком или мало знаю, 2 – в объеме теоретических знаний, 3 – знаю теорию и практические примеры применения, 4 – знаю теорию и самостоятельно выполняю, 5 – знаю теорию, выполняю и могу консультировать.

Оценка готовности научного проекта к коммерциализации (или уровень имеющихся знаний у разработчика) определяется по формуле:

$$B_{\text{сум}} = \sum B_i, \quad (1)$$

где $B_{\text{сум}}$ – суммарное количество баллов по каждому направлению;

B_i – балл по i -му показателю.

Значение $B_{\text{сум}}$ позволяет говорить о мере готовности научной разработки и ее разработчика к коммерциализации. Так, значение $B_{\text{сум}}$ получилось от 44 до 30, что значит перспективность средняя.

Объемы инвестирования в текущую разработку крайне низки. Улучшение инвестирования позволило бы провести новые более качественные испытания.

5.1.5 Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования

При коммерциализации научно-технических разработок продавец (а это, как правило, владелец соответствующих объектов интеллектуальной

собственности), преследует вполне определенную цель, которая во многом зависит от того, куда в последующем он намерен направить (использовать, вложить) полученный коммерческий эффект. Это может быть получение средств для продолжения своих научных исследований и разработок (получение финансирования, оборудования, уникальных материалов, других научно-технических разработок и т.д.), одноразовое получение финансовых ресурсов для каких-либо целей или для накопления, обеспечение постоянного притока финансовых средств, а также их различные сочетания.

При этом время продвижения товара на рынок во многом зависит от правильности выбора метода коммерциализации. Нами выбран инжиниринг.

Инжиниринг как самостоятельный вид коммерческих операций предполагает предоставление на основе договора инжиниринга одной стороной, именуемой консультантом, другой стороне, именуемой заказчиком, комплекса или отдельных видов инженерно-технических услуг, связанных с проектированием, строительством и вводом объекта в эксплуатацию, с разработкой новых технологических процессов на предприятии заказчика, усовершенствованием имеющихся производственных процессов вплоть до внедрения изделия в производство и даже сбыта продукции.

5.2 Инициация проекта

Группа процессов инициации состоит из процессов, которые выполняются для определения нового проекта или новой фазы существующего. В рамках процессов инициации определяются изначальные цели и содержание и фиксируются изначальные финансовые ресурсы. Определяются внутренние и внешние заинтересованные стороны проекта, которые будут взаимодействовать и влиять на общий результат научного проекта. Данная информация закрепляется в Уставе проекта.

Устав проекта документирует бизнес-потребности, текущее понимание потребностей заказчика проекта, а также новый продукт, услугу или результат, который планируется создать.

Устав научного проекта магистерской работы:

1. *Цели и результат проекта.* Информация о заинтересованных сторонах проекта представлена в таблице 4.

Таблица 4 - Заинтересованные стороны проекта

Заинтересованные стороны проекта	Ожидания заинтересованных сторон
ЗАО «Партнер»	Сверхвысокая чувствительность
Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности»	Экспрессность
Исполнители	Получение новых научных званий

В таблице 5 представлена информация о иерархии целей проекта и критериях достижения целей.

Таблица 5 - Цели и результат проекта

Цели проекта:	Научно обосновать, применение спектроскопических методов анализа для определения жизненной активности микроорганизмов.
Ожидаемые результаты проекта:	Научно обоснованы, применения спектроскопических методов анализа для определения жизненной активности микроорганизмов по изменению оптических свойств ряда кислотно-основных индикаторов.
Критерии приемки результата проекта:	Результат должен технологически, экономически и экологически обоснован.
Требования к результату проекта:	Требование:
	Проблема проекта должна быть актуальной, имеющей технологическое, экономическое и экологическое значение.

2. *Организационная структура проекта.* Рабочая группа и функции каждого участника проекта представлена в табличной форме (таблица 6).

Таблица 6 - Рабочая группа проекта

№ п/п	ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудо- затраты, час.
1	Эрдман С.В.	руководитель проекта	Отвечает за реализацию проекта, координирует деятельность участников проекта.	2778
2	Криницына З.В.	эксперт	Консультирует по вопросам финансового менеджмента, ресурсоэффективности и ресурсосбережения	64
3	Назаренко О.Б	эксперт	Консультирует по вопросам безопасности жизни деятельности	64
4	Сыскина А.А.	эксперт	Консультирует по части английского языка	18
5	Тимофеева Е.В.	исполнитель	Выполняет отдельные работы по проекту	2778
ИТОГО:				5702

3. *Ограничения и допущения проекта.*

Ограничения проекта – это все факторы, которые могут послужить ограничением степени свободы участников команды проекта, а так же «границы проекта» - параметры проекта или его продукта, которые не будут реализованных в рамках данного проекта.

Таблица 7 - Ограничения проекта

Фактор	Ограничения/ допущения
3.1. Бюджет проекта	Нет
3.1.1. Источник финансирования	Нет
3.2. Сроки проекта:	Октябрь 2014 – Июнь 2016
3.2.1. Дата утверждения плана управления проектом	01.10.2014
3.2.2. Дата завершения проекта	15.06.2016

5.3 Планирование управления научно-техническим проектом

Группа процессов планирования состоит из процессов, осуществляемых для определения общего содержания работ, уточнения целей и разработки последовательности действий, требуемых для достижения данных целей.

5.3.1 Иерархическая структура работ проекта

Иерархическая структура работ (ИСР) – детализация укрупненной структуры работ. В процессе создания ИСР структурируется и определяется содержание всего проекта. На рисунке 27 представлена иерархическая структура работы над проектом получения нового метода определения жизненной активности микроорганизмов по изменению оптических свойств ряда кислотно-основных индикаторов.

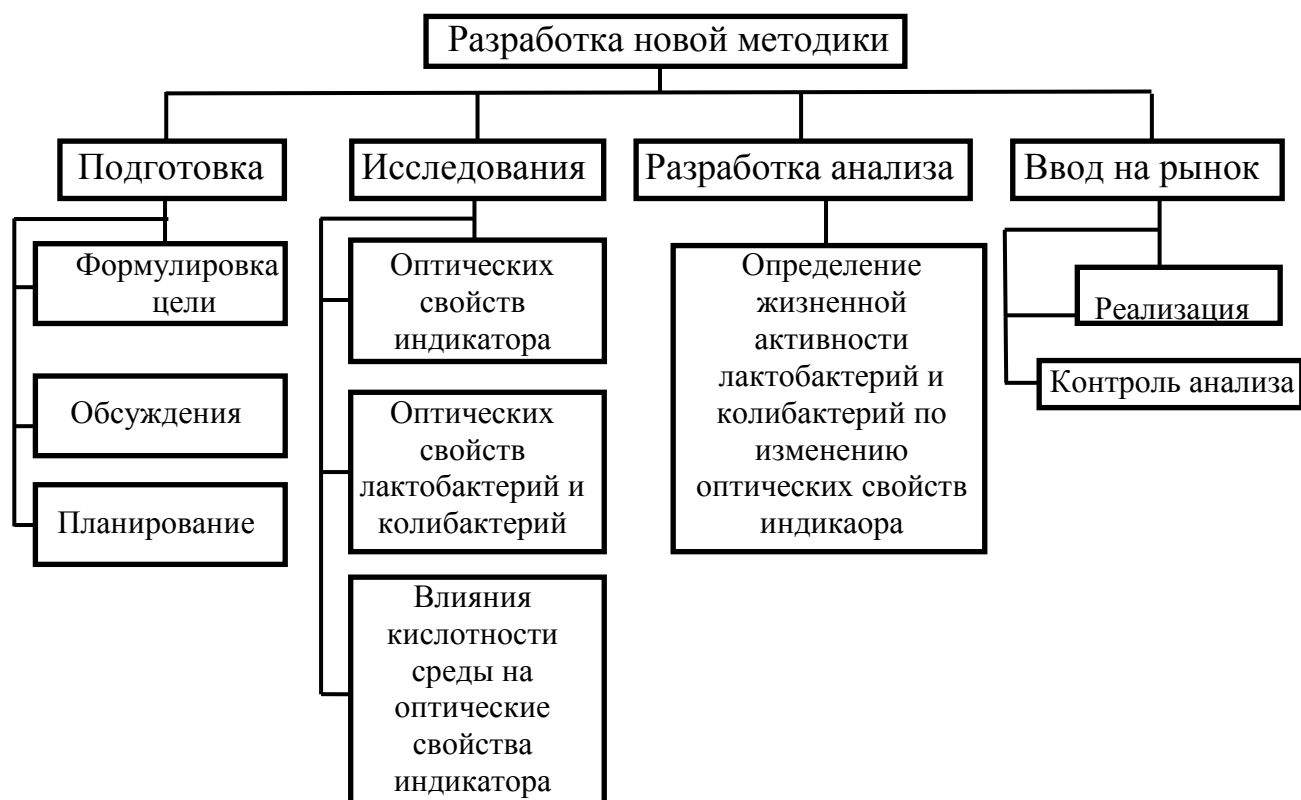


Рисунок 27 – Иерархическая структура работ

5.3.2 Контрольные события проекта

Таблица 8 - Контрольные события проекта

№ п/п	Контрольное событие	Дата	Результат (подтверждающий документ)
1	Разработка технического задания	15.09.15	Утвержденное техническое задание
2	Теоретические и экспериментальные исследования	29.12.15	Отчет НИР
3	Обобщение и оценка результатов	28.12.15	Отчет НИРС
4	Оценка эффективности исследования и применения полученных данных	04.04.16	Отчет
5	Разработка социальной ответственности по теме	15.04.16	Отчет
6	Оформление комплекта документации	01.05.16	Отчет

5.3.3 План проекта

В рамках планирования научного проекта были построены календарный и сетевой графики проекта.

Линейный график представлен в виде таблицы (таблица 9).

Таблица 9 - Календарный план проекта

Код работы (из ИСР)	Название	Длительность, дни	Дата начала работ	Дата окончания работ	Состав участников (ФИО ответственных исполнителей)
1	Составление технического задания	13	01.09.14	15.09.14	Эрдман С.В.
2	Изучение литературы	87	16.09.14	27.12.14	Эрдман С.В., Тимофеева Е.В.
3	Выбор направления исследования	18	12.01.15	31.01.15	Эрдман С.В., Тимофеева Е.В.
4	Теоретические и экспериментальные исследования	229	02.02.15	29.01.16	Эрдман С.В., Тимофеева Е.В.
5	Обобщение и оценка результатов	21	01.02.16	26.02.16	Эрдман С.В., Тимофеева Е.В.
6	Разработка технической документации и проектирование	51	29.02.16	29.04.16	Эрдман С.В., Тимофеева Е.В., Криницына З.В., Назаренко О.Б., Рыманова И.Е.
7	Оформление комплекта документации	20	04.05.16	27.05.16	Тимофеева Е.В.
И т о г о:		439			

Диаграмма Ганта – это тип столбчатых диаграмм (гистограмм), который используется для иллюстрации календарного плана проекта, на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ (таблица 10).

Таблица 10 – Календарный план-график проведения НИОКР по теме

Код рабо- ты (из ИСР)	Вид работ	Исполни тели	Тк, кал. дни	Продолжительность выполнения работ																																			
				2014												2015												2016											
				сентяб.	окт.	нояб.	дек.	январь	фев.	март	апр.	май	ию	январь	фев.	март	апр.	май	ию	январь	фев.	март	апр.	май	ию	январь	фев.	март	апр.	май	ию	январь	фев.	март	апр.	май	ию		
1	Составление технического задания	Руководи тель	13																																				
2	Изучение литературы	Руководи тель, диплом- ник	87																																				
3	Выбор направления исследования	Руководи тель, диплом- ник	18																																				
4	Теоретические и эксперименталь- ные исследования	Руководи тель, диплом- ник	229																																				
5	Обобщение и оценка результатов	Руководи тель, диплом- ник	21																																				
6	Разработка технической документации и проектирование	Руководи тель, диплом- ник	51																																				
7	Оформление комплекта документации	Диплом- ник	20																																				

 - руководитель;  дипломник.

5.3.4 Бюджет научного исследования

При планировании бюджета научного исследования должно быть обеспечено полное и достоверное отражение всех видов планируемых расходов, необходимых для его выполнения. В процессе формирования бюджета, планируемые затраты группируются по статьям, представленным в таблице 11.

Таблица 11 - Группировка затрат по статьям

Статьи	Сумма, руб.
Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	28400
Основная заработная плата	137835
Дополнительная заработная плата	16540
Отчисления на социальные нужды	46312
Накладные расходы	138938
Итого плановая себестоимость	368025

Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ

В данную статью включают все затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, контрольно-измерительной аппаратуры, стендов, устройств и механизмов), необходимого для проведения работ по конкретной теме. Определение стоимости спецоборудования производится по действующим прейскурантам, а в ряде случаев по договорной цене.

Стоимость оборудования, используемого при выполнении конкретного научного проекта и имеющегося в данной научно-технической организации, учитывается в виде амортизационных отчислений. Все расчеты по приобретению спецоборудования и оборудования, имеющегося в организации, но используемого для выполнения конкретной темы.

Приобретен Спектрофлуориметр «ФЛЮОРАТ-02-ПАНОРАМА», стоимостью 700 тыс. руб. со сроком пользования 25 лет. Годовая норма амортизационных отчислений — 4%. Доставка и монтаж составляет 10 тыс.

руб. Отсюда годовая сумма амортизационных отчислений составляет 28,4 тыс. руб.

Таблица 12 - Расчет затрат по статье «Спецоборудование для научных работ»

№ п/п	Наименование оборудования	Кол-во единиц оборудования	Амортизационные отчисления, тыс.руб.	Общая стоимость оборудования, тыс.руб.
1	Спектрофлюориметр «ФЛЮОРАТ-02-ПАНОРАМА»	1	28,4	28,4
	Всего за оборудование		28,4	

Основная заработная плата

В настоящую статью включается основная заработная плата научных и инженерно-технических работников, рабочих макетных мастерских и опытных производств, непосредственно участвующих в выполнении работ по данной теме. Величина расходов по заработной плате определяется исходя из трудоемкости выполняемых работ и действующей системы оплаты труда. В состав основной заработной платы включается премия, выплачиваемая ежемесячно из фонда заработной платы (размер определяется Положением об оплате труда).

Статья включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением проекта, (включая премии, доплаты) и дополнительную заработную плату.

$$C_{зп} = З_{осн} + З_{доп}, \quad (2)$$

где $З_{осн}$ – основная заработная плата;

$З_{доп}$ – дополнительная заработная плата.

Основная заработная плата ($З_{осн}$) руководителя (лаборанта, инженера) от предприятия (при наличии руководителя от предприятия) рассчитывается по следующей формуле:

$$З_{осн} = З_{дн} \cdot T_{раб}, \quad (3)$$

где $Z_{\text{осн}}$ – основная заработная плата одного работника;

T_p – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн.;

$Z_{\text{дн}}$ – среднедневная заработная плата работника, руб.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_{\text{м}} \cdot M}{F_{\text{д}}}, \quad (4)$$

где $Z_{\text{м}}$ – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

при отпуске в 48 раб. дней $M=10,4$ месяца, 6-дневная неделя;

$F_{\text{д}}$ – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн. (таблица 13).

Таблица 13 - Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Инженер
Календарное число дней	577	577
Количество нерабочих дней (выходные дни и праздничные дни)	110	110
Потери рабочего времени		
- отпуск	0	0
- невыходы по болезни	0	0
Действительный годовой фонд рабочего времени	467	467

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_{\text{м}} = Z_{\text{б}} \cdot (k_{\text{пр}} + k_{\text{д}}) \cdot k_{\text{р}}, \quad (5)$$

где $Z_{\text{б}}$ – базовый оклад, руб.;

$k_{\text{пр}}$ – премиальный коэффициент, (определяется Положением об оплате труда);

$k_{\text{д}}$ – коэффициент доплат и надбавок (в НИИ и на промышленных предприятиях – за расширение сфер обслуживания, за профессиональное мастерство, за вредные условия: определяется Положением об оплате труда);

$k_{\text{р}}$ – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Основная заработная плата руководителя (от ТПУ) рассчитывается на основании отраслевой оплаты труда. Отраслевая система оплаты труда в ТПУ предполагает следующий состав заработной платы:

1) оклад – определяется предприятием. В ТПУ оклады распределены в соответствии с занимаемыми должностями, например, ассистент, ст. преподаватель, доцент, профессор. Базовый оклад Z_6 определяется исходя из размеров окладов, определенных штатным расписанием предприятия.

2) стимулирующие выплаты – устанавливаются руководителем подразделений за эффективный труд, выполнение дополнительных обязанностей и т.д.

3) иные выплаты; районный коэффициент.

Расчёт основной заработной платы приведён в таблице 14

Таблица 14 - Расчёт основной заработной платы

Исполнители	Z_6 , руб.	$k_{пр}$	k_d	k_p	Z_m , руб.	$Z_{дн}$, руб.	T_p , раб. дн.	$Z_{осн}$, руб.
Руководитель	22052	0,1	0,2	1,3	8600	191	439	84080
Инженер	14099	0,1	0,2	1,3	5498	122	439	53755

Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала

В данную статью включается сумма выплат, предусмотренных законодательством о труде, например, оплата очередных и дополнительных отпусков; оплата времени, связанного с выполнением государственных и общественных обязанностей; выплата вознаграждения за выслугу лет и т.п. (в среднем – 12 % от суммы основной заработной платы).

Дополнительная заработная плата рассчитывается исходя из 10-15% от основной заработной платы, работников, непосредственно участвующих в выполнении темы:

$$Z_{доп} = k_{доп} \cdot Z_{осн} \quad (6)$$

где $Z_{\text{доп}}$ – дополнительная заработная плата, руб.;

$k_{\text{доп}}$ – коэффициент дополнительной зарплаты;

$Z_{\text{осн}}$ – основная заработная плата, руб.

В таблице 15 приведена форма расчёта основной и дополнительной заработной платы.

Таблица 15 - Заработная плата исполнителей НТИ

Заработная плата	Руководитель	Инженер
Основная зарплата	84080	53755
Дополнительная зарплата	10089	6450
Зарплата исполнителя	94169	60206
Итого по статье $C_{\text{зп}}$	154376	

Отчисления на социальные нужды

Статья включает в себя отчисления во внебюджетные фонды.

$$C_{\text{внеб}} = k_{\text{внеб}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}), \quad (7)$$

где $k_{\text{внеб}}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный фонд, фонд обязательного медицинского страхования и пр.).

На 2016 г. в соответствии с Федеральным закона от 24.07.2009 №212-ФЗ установлен размер страховых взносов равный 30%.

$$C_{\text{внеб}} = k_{\text{внеб}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}) = 0,3 \cdot 154376 = 46312 \text{ руб.}$$

Накладные расходы

В эту статью включаются затраты на управление и хозяйственное обслуживание, которые могут быть отнесены непосредственно на конкретную тему. Кроме того, сюда относятся расходы по содержанию, эксплуатации и ремонту оборудования, производственного инструмента и инвентаря, зданий, сооружений и др. В расчетах эти расходы принимаются в размере 70 - 90 % от суммы основной заработной платы научно-производственного персонала данной научно-технической организации.

Накладные расходы составляют 80-100 % от суммы основной и дополнительной заработной платы, работников, непосредственно участвующих в выполнении темы.

Расчет накладных расходов ведется по следующей формуле:

$$C_{\text{накл}} = k_{\text{накл}} \cdot (З_{\text{осн}} + З_{\text{доп}}), \quad (8)$$

где $k_{\text{накл}}$ – коэффициент накладных расходов.

$$C_{\text{накл}} = k_{\text{накл}} \cdot (З_{\text{осн}} + З_{\text{доп}}) = 0,9 \cdot 154376 = 138938 \text{ руб.}$$

5.3.5 Организационная структура проекта

В практике используется несколько базовых вариантов организационных структур: функциональная, проектная, матричная.

Наиболее подходящая организационная структура проектная (таблица 16).

Таблица 16 - Выбор организационной структуры научного проекта

Критерии выбора	Функциональная	Матричная	Проектная
Степень неопределенности условий реализации проекта	Низкая	Высокая	Высокая
Технология проекта	Стандартная	Сложная	Новая
Сложность проекта	Низкая	Средняя	Высокая
Взаимозависимость между отдельными частями проекта	Низкая	Средняя	Высокая
Критичность фактора времени (обязательства по срокам завершения работ)	Низкая	Средняя	Высокая
Взаимосвязь и взаимозависимость проекта от организаций более высокого уровня	Высокая	Средняя	Низкая

Проектная организационная структура научного проекта приведена на рисунке 28.

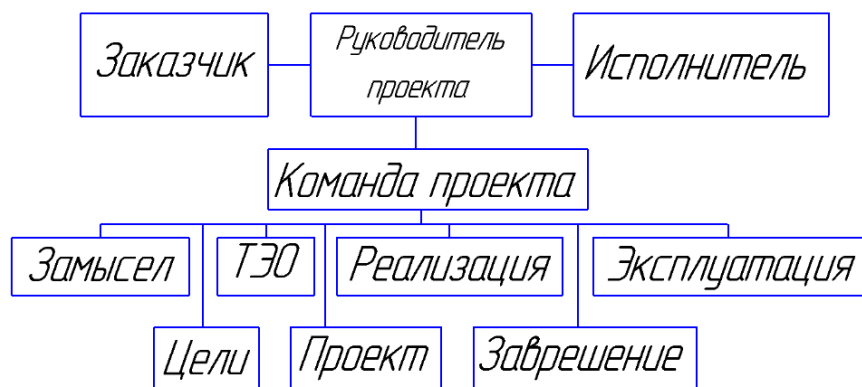


Рисунок 28 - Проектная структура проекта

5.3.6 Матрица ответственности

Для распределения ответственности между участниками проекта формируется матрица ответственности (таблица 17).

Таблица 17 - Матрица ответственности

Этапы проекта	Эрдман С.В., руководитель проекта	Креницына З.В., эксперт	Назаренко О.Б., эксперт	Рыманова И.Е., эксперт	Тимофеева Е.В., исполнитель
Составление технического задания	О				
Изучение литературы					И, О
Выбор направления исследования	О, И				И, О
Теоретические и экспериментальные исследования	О, И				И, О
Обобщение и оценка результатов	О, И				И, О
Разработка технической документации и проектирование	О				И, О
Оформление комплекта документации	О, С	О, С	О, С	О, С	И, О

Степень участия в проекте может характеризоваться следующим образом:

Ответственный (О)– лицо, отвечающее за реализацию этапа проекта и контролирующее его ход.

Исполнитель (И) – лицо (лица), выполняющие работы в рамках этапа проекта.

Утверждающее лицо (У) – лицо, осуществляющее утверждение результатов этапа проекта (если этап предусматривает утверждение).

Согласующее лицо (С) – лицо, осуществляющее анализ результатов проекта и участвующее в принятии решения о соответствии результатов этапа требованиям.

5.3.7 План управления коммуникациями проекта

План управления коммуникациями отражает требования к коммуникациям со стороны участников проекта. План управления коммуникациями приведен в таблице 18.

Таблица 18 - План управления коммуникациями

№ п/п	Какая информация передается	Кто передает информацию	Кому передается информация	Когда передает информацию
	Статус проекта	Руководитель проекта	Представителю заказчика	Ежеквартально
	Обмен информацией о текущем состоянии проекта	Исполнитель проекта	Участникам проекта	Еженедельно
	Документы и информация по проекту	Ответственное лицо по направлению	Руководителю проекта	Не позже сроков графиков и к. точек
	О выполнении контрольной точки	Исполнитель проекта	Руководителю проекта	Не позже дня контрольного события по плану управления

5.3.8 Реестр рисков проекта

Идентифицированные риски проекта включают в себя возможные неопределенные события, которые могут возникнуть в проекте и вызвать последствия, которые повлекут за собой нежелательные эффекты.

Таблица 19 - Реестр рисков

№	Риск	Вероятность наступления (1-5)	Влияние риска (1-5)	Уровень риска	Способы смягчения риска	Условия наступления
1	Технический	3	5	высокий	Повышение требований, проработка технологии	Неисправность оборудования
2	Организационный	5	5	высокий	Финансирование проекта, расстановка приоритетов	Нехватка ресурсов
3	Управление проектом	1	4	низкий	Долгосрочное планирование	Некомпетентное управление

5.4 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования

Эффективность научного ресурсосберегающего проекта включает в себя социальную эффективность, экономическую и бюджетную эффективность. Показатели общественной эффективности учитывают социально-экономические последствия осуществления инвестиционного проекта как для общества в целом, в том числе непосредственные результаты и затраты проекта, так и затраты и результаты в смежных секторах экономики, экологические, социальные и иные внеэкономические эффекты.

Показатели экономической эффективности проекта учитывают финансовые последствия его осуществления для предприятия, реализующего данный проект. В этом случае показатели эффективности проекта в целом характеризуют с экономической точки зрения технические, технологические и организационные проектные решения.

Бюджетная эффективность характеризуется участием государства в проекте с точки зрения расходов и доходов бюджетов всех уровней.

Кроме выше перечисленных видов эффективности можно выделить ресурсный эффект (характеризуется показателями, отражающими влияние инновации на объем производства и потребления того или иного вида ресурса), научно-технический (оценивается показателями новизны и полезности) и др.

5.4.1 Оценка сравнительной эффективности исследования

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности.

Интегральный показатель финансовой эффективности научного исследования получают в ходе оценки бюджета затрат трех (или более) вариантов исполнения научного исследования (таблица 20). Для этого наибольший интегральный показатель реализации технической задачи принимается за базу расчета (как знаменатель), с которым соотносятся финансовые значения по всем вариантам исполнения.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}}, \quad (9)$$

где I_{ϕ}^p - интегральный финансовый показатель разработки;

Φ_{pi} – стоимость i-го варианта исполнения;

$\Phi_{\max}$ – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т.ч. аналоги).

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в размах (значение больше единицы), либо соответствующее численное удешевление стоимости разработки в размах (значение меньше единицы, но больше нуля).

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом:

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i b_i^a, \quad I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i b_i^p \quad (10)$$

где I_m – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов;

a_i – весовой коэффициент i -го параметра;

b_i^a, b_i^p – балльная оценка i -го параметра для аналога и разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

n – число параметров сравнения.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности рекомендуется проводить в форме таблицы, пример которой приведен ниже.

Таблица 20 - Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Объект исследования	Весовой коэффициент параметра	Спектроскопический метод Исп. 1	Метод измерения активности ферментов метаболизма Исп. 2
Чувствительность	0,20	5	3
Малый расход ферментов и реактивов	0,15	5	3
Быстрота определения	0,25	4	5
Позволяет следить за течением реакции во времени	0,40	4	4
Итого	1,00	4,35	3,9

$$I_{p-уч1} = 5 \cdot 0,2 + 5 \cdot 0,15 + 4 \cdot 0,25 + 4 \cdot 0,40 = 4,35$$

$$I_{p-уч2} = 3 \cdot 0,2 + 3 \cdot 0,15 + 5 \cdot 0,25 + 4 \cdot 0,40 = 3,9$$

Сравнение интегрального показателя эффективности текущего проекта и аналогов позволит определить сравнительную эффективность проекта. Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финр}^a} \quad (11)$$

где $\mathcal{E}_{cp}$ – сравнительная эффективность проекта; $I_{мэ}^p$ – интегральный показатель разработки; $I_{финр}^a$ – интегральный технико-экономический показатель аналога.

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финр}^a} = \frac{4,35}{3,9} = 1,12$$

Сравнение значений интегральных показателей эффективности позволяет понять и выбрать более эффективный вариант решения поставленной в магистерской диссертации технической задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности. Спектроскопический метод для исследования более эффективны с экономической, социальной и финансовой точки зрения, чем метод измерения активности ферментов метаболизма.

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ4В	Тимофеевой Елене Викторовне

Институт	ИФВТ	Кафедра	ОХХТ
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	Химическая технология

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	<i>Исследование жизненной активности пробиотических микроорганизмов методом флуориметрии</i>
--	--

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Производственная безопасность 1.1. Анализ вредных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению: 1.2. Анализ опасных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению (<i>техника безопасности</i>):	1.1. - действие вредных фактора на организм человека; - приведение допустимых норм с необходимой размерностью (со ссылкой на соответствующий нормативно-технический документ); - предлагаемые средства защиты; (сначала коллективной защиты, затем – индивидуальные защитные средства). 1.2. - электробезопасность (в т.ч. статическое электричество, - правила пожарной безопасности в лаборатории (источники, средства защиты).
2. Экологическая безопасность:	- анализ воздействия объекта на атмосферу (выбросы); - анализ воздействия объекта на гидросферу (сбросы); - анализ воздействия объекта на литосферу (отходы).
3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:	- перечень возможных ЧС при разработке и эксплуатации проектируемого решения; - выбор наиболее типичной ЧС; - разработка превентивных мер по предупреждению ЧС; - разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий.
4. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:	- специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства;

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	
--	--

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Назаренко О.Б.	Д.Т.Н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4В	Тимофеева Елена Викторовна		

6 Социальная ответственность

В разделе «Социальная ответственность» рассмотрены вопросы охраны труда, связанные с работой в химической лаборатории, а также мероприятий по предотвращению воздействия на здоровье опасных и вредных факторов для работников лаборатории и создания безопасных условий труда для обслуживающего персонала в ходе выполнения работ по исследованию жизненной активности пробиотических микроорганизмов методом флуориметрии. При исследовании жизненной активности пробиотических микроорганизмов, одной из основных задач является внедрение на всех рабочих местах совершенных средств техники безопасности и безвредных условий труда, обеспечения санитарно-гигиенических условий, устраняющих производственный травматизм и профессиональные заболевания.

В рамках выпускной квалификационной работы (ВКР) и в соответствии с темой работы “Исследование жизненной активности пробиотических микроорганизмов методом флуориметрии” рабочим местом является лаборатория № 115 химического корпуса ТПУ размером 36 м², где и выполнялась данная работа. Рабочей зоной лаборатории считаем пространство высотой до 2 м от уровня пола. Рабочее место можно считать постоянным, т.к. работающий находится в нем не менее половины рабочего времени или более двух часов непрерывно. В лаборатории установлена отопительная система.

В соответствии с СП 60.13330.2012, устанавливается объем производственного помещения не менее 15 м³ на одного работника, для обеспечения нормальных условий труда. В лаборатории № 115 работает 4 работника, что удовлетворяет правилам.

В Федеральном законе РФ от 28 декабря 2013 г. N 426-ФЗ "О специальной оценке условий труда" Статья 3. Специальная оценка условий труда говорится, что необходимо выявить все вредные и опасные факторы для оценки их влияния на работника. Выполнение научно-исследовательской

работы по данной тематике требует четкого соблюдения правил по технике безопасности и охраны труда работников: при работе с химическими реактивами; едкими и ядовитыми веществами, при работе с электрооборудованием и т.п.

6.1 Профессиональная социальная безопасность

Опасные и вредные факторы при работах по исследованию жизненной активности пробиотических микроорганизмов методом флуориметрии представлены в таблице 21

Таблица 21 - Основные элементы производственного процесса, формирующие опасные и вредные факторы.

Наименование видов работ и параметров производственного процесса	Ф а к т о р ы (ГОСТ 12.0.003-74 ССБТ)		Нормативные документы
	Вредные	Опасные	
1	2	3	4
Работа с электрическими приборами (спектрофлуориметр)	- отклонение показателей микроклимата в помещении; - шум.	- Электрический ток;	-ГОСТ 12.2.003-91 ССБТ. Оборудование производственное. Общие требования безопасности. -СанПиН 2.2.4.548-96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений. - СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278-03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий. – М.: Госкомсанэпиднадзор, 2003.
Работа с химическими реактивами	токсические; раздражающие; сенсibilизирующие канцерогенные; мутагенные; влияющие на репродуктивную функцию;		-ГОСТ 12.1.005–88 (с изм. №1 от 2000 г.). ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны (01. 01.89). СанПиН 2.1.6.1032-01. -Гигиенические требования к обеспечению качества атмосферного воздуха населенных мест. – М.: Госкомсанэпиднадзор России, 2001.

6.1.1 Анализ вредных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению

Работа в аналитической лаборатории требует соблюдение техники безопасности, охраны труда работников, индивидуальной защиты. Условия труда должны быть максимально безвредными.

Научно-исследовательская работа по теме: «Исследование жизненной активности пробиотических микроорганизмов методом флуориметрии» связана с химическими реактивами, и посудой, электроприборами. Используются вредные и опасные химические вещества, при несоблюдении мер безопасности они могут причинить вред здоровью и угрозу жизни.

В аналитической лаборатории химик - аналитик подвергается физическим факторам: параметры микроклимата (температура воздуха, относительная влажность воздуха, скорость движения воздуха), параметры световой среды (искусственное освещение (освещенность) рабочей поверхности).

При нарушении санитарно-гигиенического режима в аналитической лаборатории на работников могут воздействовать неблагоприятные факторы производственной среды. Основными из них являются, прежде всего, контакт с токсичными химическими веществами, значительное напряжение зрения при выполнении анализов, работе с приборами и взвешивании на аналитических весах. Характеристика химических веществ, используемых при выполнении НИР, согласно ГН 2.2.5.1313-03, представлена в таблице 22.

Таблица 22 - Характеристика химических веществ

№	Наименование	Физические свойства	Величина ПДК, мг/м ³	Класс опасности	Токсическое действие
1	Индикатор Бромкрезоловый красный	Порошок светло-розового, розового или сиреневого цвета. В сухом эфире нерастворим; растворяется в водных растворах щелочей, этиловом спирте, ацетоне; в бензоле, ледяной уксусной кислоте и холодной воде малорастворим.	1	2	Негативно воздействует на почки, печень, нервную систему и кровь, раздражает слизистые оболочки верхних дыхательных путей.
2	Гидроксид натрия	Белое твёрдое вещество. Сильно гигроскопичен, на воздухе «расплывается». Хорошо растворяется в воде, при этом выделяется большое количество теплоты.	0,5	2	Вызывает серьезное раздражение дыхательных путей и кожи с возможными ожогами

Минимизировать возможный незначительный риск для здоровья в процессе выполнения работы и снизить содержание реактивов в воздухе рабочей зоны позволили следующие мероприятия:

1. Использование средства индивидуальной защиты (очки, щитки, маски, респираторы, резиновые перчатки, спецодежда).
2. Герметизация тары хранения и оборудования для проведения реакции.
3. Вытяжная система вентиляции (вытяжной шкаф). Так как работа связана с малыми количествами опасных веществ, и не превышает ПДК веществ, указанных в таблице 2, то меры безопасности являются: соблюдение техники безопасности, использование индивидуальных средств защиты, работа в вытяжном шкафу, наличие вентиляции.

Микроклимат.

Показателями метеорологических условий производственной среды согласно ГОСТ 12.1.005 – 89 являются температура, относительная влажность и скорость движения воздуха. Негативные значения показателей микроклимата становятся причиной уменьшения производственных показателей в работе, простуды, радикулита, хронического бронхита и многих других заболеваний. Устанавливаются оптимальные и допустимые значения этих параметров с учетом избытка теплоты, тяжести выполнения работ и сезонов года. В таблице 3 представлены нормы показателей метеорологических условий в рабочей зоне, которые соблюдаются в данной лаборатории.

В соответствии с СанПиН 2.2.4.548–96, работа в лаборатории, выполняемая в положении стоя или сидя, и требующая определенного физического напряжения, связанная с постоянной ходьбой, перемещение мелких (до 1 кг) изделий или предметов относится к физической работе (категория IIa).

Таблица 23 – Оптимальные нормы микроклимата в рабочей зоне производственных помещений

Сезон года	Категория тяжести выполняемых работ	Температура, °С		Относительная влажность, %		Скорость движения, м/с	
		Фактич.	Опт.	Фактич.	Опт.	Фактич.	Опт.
Холодный	IIa	18	19-21	50-40	60-40	0,2	0,2
Теплый	IIa	24	20-22	50-40	60-40	0,2	0,2

К средствам коллективной защиты можно отнести установки кондиционирования воздуха, основная задача которых поддерживать параметры воздуха в установленных пределах, для обеспечения надежной работы и комфортных условий для работников.

В лаборатории необходимо создать приток свежего воздуха. Воздух, который используется для вентиляции лаборатории, должен быть очищен от пыли.

Для обеспечения допустимых норм микроклимата в рабочей зоне необходимо установить в холодный период времени отопительную систему.

Освещенность.

О важности вопросов производственного освещения в лаборатории говорит то, что условия деятельности персонала связаны с преобладанием зрительной информации. Неудовлетворительное и некачественное освещение утомляет зрение, может стать причиной его снижения, реже слепоты. Плохо освещенные участки рабочего места могут стать причиной травматизма.

Источник естественного освещения – поток энергии солнца. Естественное освещение является наиболее гигиеничным. Однако по условиям зрительной работы в лаборатории естественного освещения, как правило, недостаточно, поэтому на рабочих местах оказывается задействованным и искусственное освещение.

Оно может быть обеспечено с помощью люминесцентных ламп ЛВ (белого цвета) мощностью 20, 40, 80 Вт. Для рабочих мест с искусственным освещением регламентирована допустимая освещенность, согласно действующим санитарным нормам и правилам СП 52.13330.2011.

Согласно СП 52.13330.2011, лаборатория, в которой проводятся работы, относится к I группе помещений по задачам зрительной работы, в которых производится различение объектов зрительной работы, при фиксированном направлении линии зрения работающих на рабочую поверхность, а именно взвешивание малых количеств веществ (бромкрезолового красного).

В таблице 24 приведены нормы искусственного освещения.

Таблица 24 – Нормы искусственного освещения

Характеристика зрительной работы	Разряд зрительной работы	Искусственное освещение	
		Освещенность, лк	
		При комбинир. освещении	При общем освещении
Наивысшей точности	I	5000	1500

Шум.

Шум является одним из наиболее распространенных вредных факторов на производстве, он крайне негативно влияет на здоровье человека. Длительное воздействие шума вызывает ухудшение слуха, реже приводит к глухоте, но также уменьшается внимание и увеличивается расход энергии человеком при выполнении какого – либо вида работ.

Согласно ГОСТ 12.1.003 – 83, нормируемой шумовой характеристикой рабочих мест при шуме являются уровни звуковых давлений в децибелах в октавных полосах. В таблице 5 приведены допустимые уровни звукового давления на рабочем месте.

Для рабочего места характерно наличие шумов: установки кондиционирования создают аэродинамический шум, преобразователи напряжения – электрический.

Таблица 25 – Допустимы уровни звукового давления на рабочем месте

Вид деятельности	Частота, Гц							
	Уровень звукового давления, дБ							
	63	125	250	500	1000	2000	4000	8000
Научная деятельность	71	61	54	49	45	42	40	38

В соответствии с ГОСТ 12.1.003 – 83 должны проводиться работы по снижению шума в помещениях лаборатории. Для подобных целей используются шумобезопасная техника, звукоизоляция, звукопоглощение, рациональная планировка помещения и т.д.

6.1.2 Анализ опасных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению (*техника безопасности*)

Электробезопасность

Электробезопасность установок, к которым относится оборудование, представляют предмет особого внимания.

Влияние тока на человеческий организм можно описать с позиции:

- 1) термического действия – вызывает ожоги, нагрев внутренних тканей;
- 2) электролитического действия – характеризуется разложением органических жидкостей (крови);
- 3) механического действия – характеризуется разрывом тканей, перелом костей;
- 4) биологического действия – раздражение и возбуждение живых тканей в организме, нарушение внутренних биоэлектрических процессов и т.д.

Строгое выполнение организационных и технических мероприятий при проведении работ с электроустановками, очень важно в целях предупреждения электротравматизма, кроме этого используют средства защиты, к которым относятся: электрическая изоляция токоведущих частей, защитное заземление и отключение, электрическое разделение сети. Использование этих средств позволяет обеспечить защиту людей от прикосновения к токоведущим частям, от опасности перехода напряжения к металлическим нетоковедущим частям, от шагового напряжения.

Преднамеренное соединение с землей металлических нетоковедущих частей, которые могут оказываться под напряжением, называют защитным заземлением (ГОСТ 12.1.009 – 76). Чтобы защитить человека от поражения электрическим током, защитное заземление должно удовлетворять ряду требований, изложенных в ПУЭ и ГОСТ 12.1.030 – 81 “ССВТ. Электробезопасность. Защитное заземление. Зануление”. Эти требования зависят от напряжения электроустановок и мощности источника питания.

Особое внимание необходимо уделять защите от статического электричества. Для его снижения применяют специальное покрытие полов, которое выполнено из линолеума антистатического поливинилхлоридного. К другому методу защиты можно отнести нейтрализацию зарядов ионизированным воздухом.

При выполнении данной научно-исследовательской работы использовались следующие электроприборы: весы аналитические лабораторные, спектрофлуориметр и т.д.

Все помещения лаборатории соответствуют требованиям электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019-79.

Все электрооборудование с напряжением свыше 36 В, а также оборудование и механизмы, которые могут оказаться под напряжением, заземлены.

Помещение лаборатории согласно ГОСТ Р12.1.019-2009 является помещением без повышенной опасности по условиям опасности поражения электрическим током, в котором отсутствуют условия, создающие повышенную или особую опасность. Для предотвращения воздействия тока на человека в лаборатории выполнялись следующие условия:

1. ограждения токоведущих частей;
2. применение блокировки аппаратов и ограждающих устройств для предотвращения ошибочных операций и доступа к токоведущим частям;
3. применение предупреждающей сигнализации, надписей;
4. целостность электрооборудования.

Кроме того, для адекватной работы приборов в помещении поддерживались следующие условия:

1. температура окружающей среды 20 °С;
2. относительная влажность 40 - 50%;
3. окружающая среда — невзрывоопасна, не содержащая значительного количества токопроводящей пыли, агрессивных газов.

Безопасность работы обеспечена в конструкции электрооборудования. Металлический корпус приборов исключает возможность прикосновения к токоведущим частям, имеется зануление (класс защиты 1). В электрической схеме оборудования предусмотрен выключатель со световой сигнализацией для включения прибора.

Правила пожарной безопасности в лаборатории

При работе в лаборатории опасность пожаров и взрывов зависит от физико-химических свойств и количества имеющихся в лаборатории материалов, веществ, от конструктивных особенностей и режима работы оборудования, а также от наличия источников загорания и условий для быстрого распространения огня.

В Национальном Исследовательском Томском политехническом университете, где проводились исследования, предприняты все необходимые по нормативным документам меры для предотвращения возникновения пожаров. При возникновении пожара необходимо принять все меры по его локализации и тушению. Для этого всегда обеспечен проход между лабораторными столами, выходы не загромождены. При возникновении загорания все сотрудники знают инструкции и план эвакуации, в соответствии с заранее разработанной программой.

Для тушения возможного загорания и пожаров лаборатория оснащена специальным оборудованием:

1. огнетушитель углекислотный газовый типа ОУ-2 для тушения всех видов горючих веществ и электроустановок, кроме веществ, горящих без доступа воздуха;
2. порошковый огнетушитель ОПС-10, предназначен для тушения небольших очагов возгорания щелочных металлов.
3. асбестовое одеяло, которое используется при тушении обесточенных электропроводов, горячей одежды.

4. ящик с песком для тушения обесточенных горящих на горизонтальной поверхности проводов.

Для обнаружения пожара, оповещения и эвакуации людей установлена система пожарной сигнализации и разработан план эвакуации (рисунок 29), с которым ознакомлены сотрудники лаборатории.

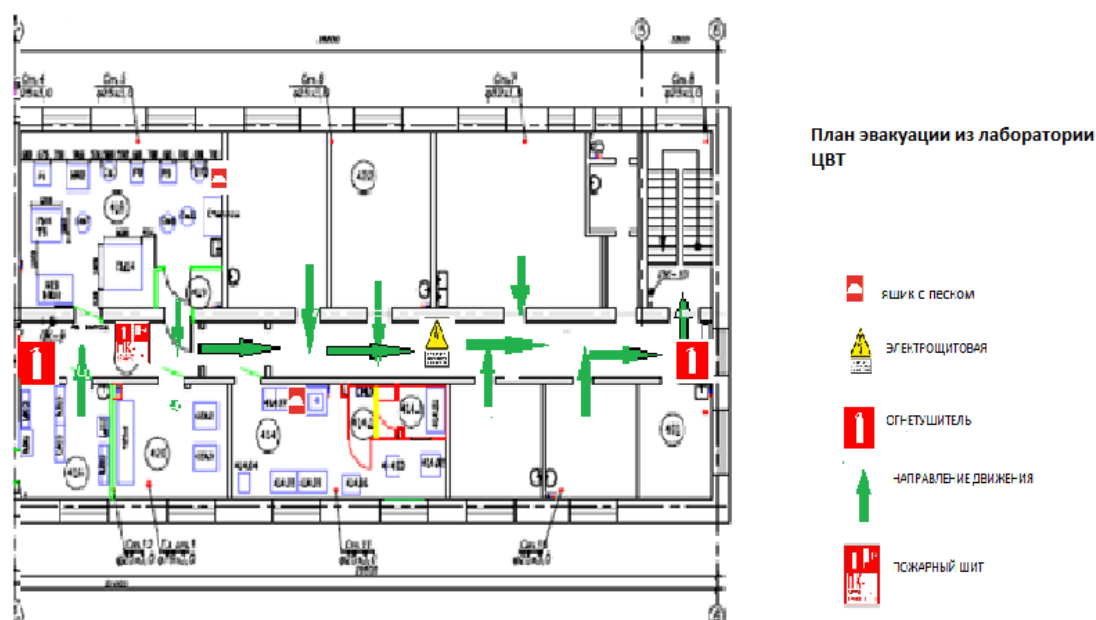


Рисунок 29 - План эвакуации при возникновении пожара в лаборатории № 115 в Томском политехническом университете, корпус №2.

Таким образом, лаборатория, оснащена всеми противопожарными устройствами и соответствует требованиям пожарной безопасности.

6.2 Экологическая безопасность (охрана окружающей среды)

Аналитическая деятельность по определению жизненной активности пробиотических микроорганизмов не связана с выбросом вредных веществ, следовательно, выбросов в атмосферу и литосферу нет. Что касается сбросов в гидросферу, то канализационные стоки от деятельности сбрасываются в общегородскую канализацию.

В случае поломки основного оборудования лаборатории – электроприборов, оргтехники и т.д, не подлежащей ремонту, их должны

рационально складировать и провести захоронение отходов, обезвреживание и их утилизацию.

Для случая люминесцентных ламп, необходимо заключить договор с фирмой, занимающейся их утилизацией, чтобы своевременно поставлять вышедшие из строя или перегоревшие лампы, с целью уменьшения вреда окружающей среды из-за наличия в лампах такого опасного вещества, как ртуть.

6.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

Чрезвычайная ситуация (ЧС) – это неожиданная, внезапно возникшая обстановка на определенной территории или объекте в результате аварии, катастрофы, опасного природного явления или стихийного бедствия, которые могут привести к человеческим жертвам, ущербу здоровью людей или окружающей среде, материальным потерям и нарушению условий жизни людей.

Техногенные ЧС связаны с техническими объектами. К ним относят: взрывы, пожары, аварии на химически опасных объектах, выбросы радиоактивных веществ, на радиационно–опасных объектах, обрушение зданий, аварии на системах жизнеобеспечения и др.

Своевременное и грамотное использование средств защиты является эффективной защитой человека в ЧС. К средствам защиты относят средства индивидуальной защиты (СИЗ) и коллективные средства защиты (КСЗ).

По назначению СИЗ классифицируют для защиты органов дыхания и кожи, а по принципу действия на фильтрующие и изолирующие.

Для защиты от поражающих факторов ЧС, используются КСЗ. К поражающим факторам относят высокие температуры, вредные газы при пожаре, взрывоопасные, радиоактивные, сильнодействующие ядовитые и отравляющие вещества; ударная волна.

В результате каких – либо неисправностей оборудования может возникнуть аварийная ситуация. Создание лаборатории, размещенной в

высотном здании, с большим штатом работающих, придает значение вопросам вынужденной эвакуации из них людей при пожаре и в ситуациях иного рода.

Одной из основных причин гибели людей при пожаре является ни огонь и температура, а токсичные продукты горения. Поэтому противоподымная защита зданий, направленная на не задымлённость эвакуационных путей, отдельных помещений и удаление продуктов горения в определенном направлении, является первостепенной задачей противопожарной профилактики. В надлежащих местах должны быть вывешены планы эвакуации людей из здания.

Стихийные бедствия возникают внезапно и характеризуются возможностью гибели людей, возможностью разрушения населенных пунктов и объектов народного хозяйства. В климатической зоне г.Томска возможны ураганы, сильные грозы, паводки и ливни. Т.к. химический корпус находится в отдаленной зоне от разлива реки, то паводок ему не грозит.

В результате порывов ветра могут быть обрывы линий электропитания, из-за чего возможны перебои в электроснабжении; перегрузки, которые могут стать причиной пожара. Для предотвращения подобных ситуаций необходима организация системы аварийного электропитания, по возможности проведение линии электроснабжения под землей.

6.4 Правовые вопросы обеспечения безопасности

Разработка ВКР занимает немало времени, но в тоже время она совмещена с учебным процессом студента, в связи с чем по трудовому законодательству Российской Федерации было принято допущение, что выполнение ВКР считается за работу по совместительству, т.е. не более 4 часов в день или 20 часов в неделю при пятидневном графике работы.

Работа в лаборатории не относится к вредной, поэтому не предусматривается никаких компенсаций, применение спецпитания и особого лечебно-профилактического обслуживания. Также работники не

привлекаются ни к работе в ночное время, ни к сменному графику работы. Все работники без исключения подлежат обязательному медицинскому страхованию, пенсионному обеспечению.

С точки зрения охраны окружающей среды, выполнение работы на тему “Исследование жизненной активности пробиотических микроорганизмов методом флуориметрии ”, не оказывает никакого влияния на окружающую среду и нет необходимости в его контроле со стороны служб производственного контроля санитарных правил и норм, и служб общественного экологического контроля.

Для решения вопросов о чрезвычайных ситуациях, создана комиссия, которая занимается финансовыми, продовольственными, медицинскими и информационными проблемами, связанными с возникновением чрезвычайной ситуации.

Заключение

Исследованы оптические свойства ряда кислотно-основных индикаторов (бромкрезоловый зеленый, метил-тимоловый синий, бромкрезоловый красный) флуориметрическим и фотометрическим методами. Установлено, что бромкрезоловый зеленый и метилтимоловый синий при взаимодействии с лактобактериями дают сигнал аналогичный сигналу чистых растворов индикаторов, однако, при взаимодействии индикатора бромкрезолового красного с лактобактериям наблюдается появление нового сигнала в области 590 нм. Определено, что сигнал в области 590 нм соответствует поведению индикатора в щелочной среде.

Определена рабочая концентрация индикатора, при которой возможно проводить исследование жизненной активности лактобактерий – $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Показано, что при последовательном добавлении суспензии лактобактерий к раствору индикатора наблюдается рост сигнала пропорционально добавке микроорганизмов.

Проведено исследование влияния колибактерий на оптические свойства индикатора бромкрезолового красного методом фотометрии. Было показано, что добавление суспензии колибактерий к раствору индикатора приводит к появлению двух сигналов: при 430 и 590 нм. Установлено, что сигнал при 430 нм появляется в случае присутствия в растворе продуктов, имеющих кислую среду, а сигнал при 590 нм появляется в случае присутствия продуктов, имеющих щелочную среду.

Проведено исследование влияния колибактерий на изменение оптических свойств индикатора бромкрезолового красного в зависимости от времени культивирования микроорганизмов. Установлено, что с течением времени культивирования при добавлении суспензии колибактерий к раствору индикатора происходит изменение интенсивности пропускания в областях 430 и 590 нм, что свидетельствует об активной выработке бактериями продуктов метаболизма и их высокой жизненной активности. Показано, что изменение интенсивности пропускания носит динамический

характер с периодическим уменьшением сигнала сначала при длине волны 430 нм, а затем при 590 нм. Данный факт объясняется выработкой в процессе метаболизма различных продуктов для поддержания оптимального значения pH культуральной среды.

Для доказательства жизненной активности бактерий был применен способ сканирования по регистрации флуоресценции при длине волны возбуждения 360 нм, что соответствует возбуждению флуоресценции внутриклеточного метаболита NADH, являющегося маркером жизненной активности бактериальных клеток. Установлено, что интенсивность флуоресцентного сигнала в области, соответствующей флуоресценции внутриклеточного метаболита NADH, увеличивается по истечению времени анализа, что связано с высокой жизненной активностью колибактерий.

Проведено исследование добавления глюкозы в культуральную среду в качестве питательного субстрата. Определено, что добавление в суспензию колибактерий глюкозы активизирует жизнедеятельность микроорганизмов, что подтверждается увеличением интенсивности флуоресценции внутриклеточного кофермента NADH в течение выбранного времени анализа – 5 суток, по сравнению с суспензией без добавления глюкозы.

В результате выполненной работы показана возможность применения флуориметрического и фотометрического методов анализа для определения жизненной активности пробиотических микроорганизмов, таких как лакто- и колибактерий, по изменению оптических свойств кислотно-основного индикатора бромкрезолового красного. Данный подход позволит сократить время анализа жизненной активности культивируемых микроорганизмов, а также определить значение pH культуральной жидкости в процессе культивирования, что позволит сделать вывод о продуктах, выделяемых в процессе метаболизма, а также, в случае необходимости, скорректировать технологические параметры культивирования.

Список публикаций:

1. **Тимофеева Е.В.**, Булычева Е.В. Исследование люминесцентных свойств лактобактерий и их взаимодействия с индикатором бромкрезоловым красным // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 115-летию со дня рождения профессора Л.П. Кулёва, Томск, 25-29 мая 2015 — Т. 1. — с. 248-249
2. Булычева Е.В., Воронова О.А., **Тимофеева Е.В.** Флуориметрическое определение бактериологических показателей качества природных вод // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 115-летию со дня рождения профессора Л.П. Кулёва, Томск, 25-29 мая 2015 — Т. 1. — с. 193-195.
3. **Тимофеева Е.В.**, Булычева Е.В. Люминесцентный анализ бактериологических показателей качества природной воды // Творчество юных - шаг в успешное будущее: материалы VII Всероссийской научной студенческой конференции с элементами научной школы имени профессора М.К. Коровина, г. Томск, 10-14 ноября 2014 г — с. 116-118.
4. Елизавета Владимировна Булычева, Е.И. Короткова, **Е.В. Тимофеева.** Исследование влияния антибиотиков на микрофлору желудочно-кишечного тракта методом флуориметрии // Химико-фармацевтический журнал, Том 50, № 4 (2016).

Список литературы:

1. Martin L.Cross. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens // FEMS Immunology and Medical Microbiology. – 2002. – V 34. – P. 245 – 253.
2. S. P. Borriello¹, W. P Hammes, W. Holzapfel, P. Marteau, J. Schrezenmeir, M. Vaara, and V. Valtonen. Safety of Probiotics That Contain Lactobacilli or Bifidobacteria // Oxford Journal Medicine & Health. – 2013. – V 36. – P. 775-780.
3. Fernandez M.F., Boris S., Barbes C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract // Journal of Applied Microbiology. – 2003. – V 94. – P. 449 – 455.
4. Соловьева И.В., Точилина А.Г., Новикова Н.А., Белова И.В., Иванова Т.П., Соколова К.Я. Изучение биологических свойств новых штаммов рода *Lactobacillus* // Общая биология. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. - № 2 (2). – С. 462-468.
5. Глушанова Н.А. “Бюллетень сибирской медицины” 2003г.
6. Воробьев А.В., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М. Микробиология: Учебник, 2-е изд., переработанное и дополненное. – М.: Медицина, 2003. – 330 с.
7. João P. S. Cabral. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water // International Journal of Environmental Research and Public Health. - 2010. – № 7. - P. 3657 – 3703.
8. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студ.высш.учеб.заведений / Под ред. А.И.Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с
9. Сакович Г.С., Безматерных М.А. Физиология и количественный учет микроорганизмов: Уч.пособие / Под.ред. И.С.Селезневой. – ГОУ ВПО УГТУ – УПИ, 2005. – 40 с.
10. Методическое пособие по частной микробиологии для студентов стоматологического факультета. Ставрополь – Изд: СГМА, С.38

Составители: И.О. зав. каф. проф. И.А. Базиков, доцент А.Х. Казиев, доцент Е.В. Лысогора и др.

11. Бромкрезоловый зеленый [Электронный ресурс].- Режим доступа: <http://www.bioxim.com.ua/chemical/indicator/bromidecresol-green.html>
12. Бромкрезоловый зеленый [Электронный ресурс].- Режим доступа: <http://www.vita-reaktiv.ru/catalogue/bromkrezolovyjzelenyj>
13. Korbl J., Pribil R., "Coll. Czech. Chem. Comm.", 1958, v. 23, № 5, p. 873-80. Т.Е. Чернышева
14. Н.С. Фрумина, Е.С. Кручуова, С.Н.Муштакова “Аналитическая химия кальция” Москва 1974г. с.560
15. Ю.Н. Маслов, И.В. Фельдблюм, О.Г. Пегушина, Л.А Прохорова, А.Р. Ахмадзянова, Э.Х.Алиева. Показатель чувствительности бактериальных культур к анилиновым красителям как эпидемиологический маркер // Медицинский алфавит №6/2015, том №1 Эпидемиология и гигиена.
16. Степанов Б.И. Люминесценция сложных молекул. Часть 1. — Изд. академии наук БССР, Минск, 1956. — 328 с.
17. Паркер С. Фотолюминесценция растворов, перевод с англ. к.х.н. Н.Л. Комиссаровой, к.х.н. Б.М.Ужинов / под ред. д.ф-м.н. Р.Ф.Васильева. - изд. «Мир», Москва 1972. — 512 с.
18. Люминесцентный анализ / под ред. М.А.Константиновой-Шлезингер. — государственное издательство физико-математической литературы, Москва, 1961. — 400 с.
19. Мандельберг Е.М. В мире холодного света. — М.: Наука, 1968. — 107 с.
20. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. — М.: Мир, 1986. — 488 с.
21. Степанов Б.И., Грибовский В.П.. Введение в теорию люминесценции. — Изд. академии наук БССР, Минск, 1963. — 444 с.
22. Ельяшевич М.А.. Атомная и молекулярная спектроскопия, изд. 2-е. — М.: Эдиториал УРСС, 2001. — 896 с.

23. Лёвшин Л.В., Салецкий А.М. Люминесценция и ее измерения: молекулярная люминесценция. — М.: Изд-во МГУ, 1989. — 272 с.
24. Долгов В.В., Ованесов Е.Н., Щетникович К.А. Фотометрия в лабораторной практике. - М.: Российская медицинская академия последиplomного образования, 2004. – 142 с.
25. Анисимова Н.А. Идентификация органических соединений: учебное пособие (для студентов, обучающихся по специальности «химия»). – Горно-Алтайск: РИО ГАГУ, 2009. – 95с.
26. Прингсхейм П., Фогель М. Люминесценция жидких и твердых тел и ее практическое применение. – М.: ГИИЛ. 1948. – 265 с.
27. Справочник по физико-химическим методам исследования объектов окружающей среды Г.И. Аранович, Ю.Н. Коршунов, Ю.С. Ляликов. – Л.: Судостроение, 1979. – 648 с.
28. Учебно-методические материалы по подготовке к лабораторным и семинарским занятиям по курсу биотехнологии. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Щербаков А.А., Молофеева Н.И. – Ульяновск 2005 г.
29. Weast R. C. (ed). Handbook of chemistry and physics, 57th ed., p. D-133 - D-137; D-147 – D-152, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1976. Таблицы буферов, рН-стандартных буферов при различных температурах, кислотно-основных индикаторов и констант диссоциации кислот и оснований.
30. Методы общей бактериологии: Пер. с англ./Под ред. Ф. Герхардта и др. — М.: Мир, 1983. — 536 с
31. М.Рыбалкина «Нанотехнологии для всех», изд. Nanotechnology News Network., - 2005. – 444 с.
32. Османов В.К. Лекции по биотехнологии // Нижегородская государственная медицинская академия

Приложение А

1.1 Probiotic bacteria

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4В	Тимофеева Елена Викторовна		

Консультант кафедры ФАХ :

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Короткова Е.И.	д.х.н.		

Консультант – лингвист кафедры ИЯПР :

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель	Сыскина А.А.			

1.1 Probiotic bacteria

Probiotic lactic acid bacteria can signal the immune system through innate cell surface pattern recognition receptors or via direct lymphoid cell activation. Practical applications of probiotics include their use in anti-tumour and anti-allergy immunotherapy, but there is also increasing evidence that some probiotics can stimulate a protective immune response sufficiently to enhance resistance to microbial pathogens. This review outlines the experimental and clinical evidence for enhanced anti-microbial immune protection by probiotic lactic acid bacteria, focussing on those studies where a correlative or suggestive link has been shown between immune modulation and enhanced protection [1].

For nearly a century, Professor Elie Metchnikoff's belief that the 'friendly' microbes present in fermented foods could contribute to human health and well-being has been upheld by microbiologists. However, it is only in the last two decades that the role of these gut-colonising 'friendly' bacteria in facilitating the proper functioning of physiological systems has been fully appreciated. This is no more apparent than in the case of the immune system, where it has been demonstrated that an impoverished or absent gastrointestinal (GI) tract microflora can lead to a deficient oral tolerance induction mechanism, which is sufficient to promote systemic-level atopic hypersensitivity as a consequence. Further, both experimentally and clinically, it has been shown that re-colonisation of the GI tract with appropriate strains of orally delivered microbes can restore tolerance induction and can regain the subsequent development of a balanced immune phenotype [1].

These observations indicate two important principles. First, that while the gut microflora is undoubtedly important in supporting a functional yet balanced immune system, the processes that lead to this balance can be emulated by transiently colonising the GI tract with appropriate strains of microbes — most commonly Gram-positive lactic acid bacteria (lactobacilli or bifidobacteria) — that

are delivered orally as probiotics. And secondly, that the functioning of the immune system, at the systemic as well as local (GI tract) level, can be influenced by signals provided by these de novo colonisers. This latter point has been the subject of intense research interest over the last few years, and supports the notion that bacteria which reside in the GI tract are far from inert commensals, but actively communicate with the immune system. Recent studies have indicated that surveillance cells of the GI tract immune system routinely sample the intestinal microflora; that components of the Gram-positive bacterial cell wall can transduce nuclear factor- κ B- and STAT-mediated signals through leucocyte pattern-recognition receptors; and that the host responds to such stimuli by the release of pro-CMI/pro-inflammatory cytokines (such as tumour necrosis factor (TNF) $\pm$, interleukin (IL)-12 and interferon (IFN) γ) or the production of anti-inflammatory/regulatory cytokines (such as transforming growth factor- β and IL-10), dependent on the strain of bacterium. An important consideration in this regard may be the ability of some strains of lactobacilli to intermittently translocate across the intestinal mucosa without causing infection, whereupon they can interact with leucocytes subsequently entering circulation (via lymphatic drainage and thoracic duct channelling) and can thus influence systemic immune events. Conversely, there is also evidence that some strains of lactobacilli can directly stimulate the immune system at the gut mucosal surface via localised GI tract lymphoid cell foci; can increase lymphocyte populations and cell surface receptor expression in the GALT environment; and can facilitate increased immunoglobulin output into the intestinal lumen [1].

While the intricacies of immune signals generated in the GI tract by de novo bacterial colonization remain to be fully elucidated, the irrefutable fact remains that orally delivered (probiotic) lactobacilli and bifidobacteria have the capacity to modulate systemic-level immune phenotype expression. This has been utilised in health care research, where (for example) pro-CMI-promoting strains (such as *Lactobacillus casei* Shirota) have been shown to induce IL-12 and IFN expression, to activate NK cell tumouricidal activity, and to limit tumour growth in

certain forms of non-metastatic carcinoma. In contrast, those strains capable of increasing the expression of regulatory cytokines (such as IL-10) have shown promise as both prophylactic and therapeutic agents for the prevention of immune hypersensitivity/atopy and for the alleviation of inflammatory bowel disease and colitis. And further, probiotic strains that are capable of increasing antibody production in the GI tract have been postulated as potential adjunct therapies to boost immune responsiveness to oral vaccination [1].

A further employment for the use of immunomodulatory probiotics in health care is in the control of microbial pathogens. While evidence has existed for several years that orally delivered probiotics can combat infectious diseases. Several potential mechanisms have been proposed to support this phenomenon, including: that localised lactic acid production by probiotics in the GI tract can limit pathogen growth; that anti-pathogen substances secreted by the probiotics are directly microbicidal; or that immunomodulatory signals generated by probiotics can stimulate host immunity sufficiently to afford a degree of enhanced protection against pathogens. While none of these theories is mutually exclusive, a thorough discussion of all of these possibilities is beyond the scope of this review. Instead, the supportive and suggestive evidence of a role for probiotic-mediated immunomodulation will be focused in the control of microbial pathogens. Further, the review will specifically consider the use of Gram-positive lactic acid bacteria (principally lactobacilli, but also some species of bifidobacteria) as probiotics; however, it is important for the reader to appreciate that other taxa have been utilized as probiotics in this field, including Gram-negative entero-bacteria and yeasts [1].

In terms of disease protection, a few studies have investigated the protective effects of immune-modulating probiotic bifidobacteria against rotavirus-induced diarrhoea in neonatal animals. Yasui et al. demonstrated that feeding rotavirus-vaccinated mouse dams with *Bifidobacterium breve* (strain YIT4064) could increase virus-specific IgA levels in maternal milk, and this conferred an increased degree of passive protection to nursing pups against rotavirus diarrhoea.

A more recent study has shown that direct oral administration of two strains of bifidobacteria (*Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium infantis*) to rotavirus-infected mouse pups could increase virus-specific IgA levels in serum and the GI tract, and this treatment both delayed the onset of diarrhoea and reduced the period of severe diarrhoeal disease in probiotic-treated animals compared to controls. Protective effects against diarrhoeal disease have also been demonstrated in a large animal neonatal model by feeding immune-modulating bifidobacteria. A study of environmentally acquired diarrhoea (due mainly to non-specific rotavirus and *E. coli* infection) was undertaken in weaning piglets by Shu et al. They showed that pre-feeding piglets with *B. lactis* (strain HN019), prior to weaning in conditions that would pre-dispose the piglets to environmental pathogen exposure, could effectively reduce the cumulative morbidity index in these animals and, as a consequence, the probiotic-fed animals maintained a greater rate of food intake and exhibited a higher feed conversion efficiency compared to non probiotic-fed control animals. Interestingly, the piglet study by Shu et al. provided further evidence that pertinent cellular and humoral immune parameters could be increased by probiotic feeding, since both serum and GI tract pathogen-specific antibody titres, as well as blood-derived neutrophil phagocytic capacity and T cell proliferative responsiveness to Concanavalin A mitogen, were significantly elevated in *B. lactis*-fed animals [1].

Probiotic feeding represents a safe and non-pharmaceutical means of combating microbial pathogens. While definitive proof that modulation of the immune system is the major contributor to this effect (above or in addition to other modes of anti-microbial protection afforded by probiotics), a growing body of evidence links increased anti-microbial protection with the enhancement of pertinent immunoresponses by probiotics. Interestingly, a large body of both animal model and clinical studies has focussedfocused on the enhancement of GI tract antibody responses as the primary immune correlate of probiotic-mediated enhanced protection. Certainly, it is well-established that certain strains of lactobacilli and bifidobacteria can effectively increase mucosal antibody

production, yet for many microbial pathogens the contributing role of enhanced cellular immune responses has been unjustly neglected. Similarly, experimental and clinical studies of enteric viral infections have focused on the enhancement of humoral immunity as the major read-out of immune status, yet relatively few studies have reported underlying cellular responses that are pertinent to the control of viral pathogens. In the case of enteric pathogens (such as *Listeria*) where protective immunity is thought to be solidly dependent on cell-mediated mechanisms, there is good evidence that probiotic feeding can indeed enhance pertinent *in vivo* cellular responses, yet even here the underlying patterns of cytokine production that drive these responses have not been reported. Given that certain strains of probiotic lactobacilli (such as *L. casei* Shirota) have been shown to be potent inducers of pro-CMI cytokines (IL-12, TNF α and IFN γ), and can activate strong cellular effector mechanisms (such as NK activity), there is the obvious possibility to investigate the potential role of these probiotics for activating cellular immune effector responses that are pertinent to the control of intracellular pathogens [1].

Although the studies reviewed here have reported the potential for probiotic-mediated immune-modulation to confer enhanced protection to immunocompetent animals and humans, there is also some evidence of probiotic efficacy in immuno-compromised or -deficient hosts. Studies have shown protective effects of probiotic feeding against *Cryptosporidium parvum* and *Candida albicans* in mice immunocompromised by leukaemia virus or corticosteroids (respectively), although concurrent measures of immune responsiveness in these studies did not indicate strongly that immune modulation by the probiotics *per se* was a contributing factor to increased protection. However, in other studies of *C. albicans* infection, Wagner et al. investigated protective effects of probiotic feeding in NK cell-deficient gnotobiotic mice, whose GI tracts had been colonised with *C. albicans* or *C. albicans* plus probiotic lactobacilli; they showed that the probiotic-fed/*C. albicans*-infected mice mounted stronger localised inflammatory responses, produced heightened pathogen-specific splenic

lymphoproliferative and GI tract IgA antibody responses, and exhibited reduced GI tract tissue pathogen burdens and systemic pathogen dissemination compared to their non-probiotic-fed counterparts. Clearly, there is potential to investigate the use of immunomodulatory probiotics as protective agents against opportunistic pathogens in further studies of immunocompromisation [1].

Recent research in probiotics has begun to think beyond enhanced protection at the GI level, and has instead moved to investigation of enhancement of protective responses at distal mucosal sites. In particular, it is now apparent that probiotic feeding can influence immunoresponses in the respiratory tract tissues, and this effect has been shown sufficient to afford increased protection against bacterial and viral respiratory tract pathogens. However, this research has been far from exhaustive, and further more detailed studies of both the mechanisms of immune activation at distal mucosal sites, and reports of protection against a wider range of mucosal pathogens can be expected. In the latter regard, a recent report has indicated that direct administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* to the nasal tract of mice can increase pulmonary cellular immune activity and provide enhanced protection against an intra-nasal challenge of *Streptococcus pneumoniae*. There is the possibility also that immunomodulating probiotics, delivered orally or locally, could provide enhanced protection against mucosal pathogens of the urogenital tract, and a recent experimental study has shown that direct intra-vesicular administration of *L. casei* (Shirota) can induce potent cytokine- and CMI-activation in the bladder mucosa of mice. Clearly, research in this field is far from exhaustive, and as contemporary research increases into mechanisms of infection by — and protection against — microbial pathogens, further more detailed research can be expected to see into the potential employment of immunomodulating probiotics in this area [1].

Lactobacilli and *bifidobacteria* are extremely rare causes of infection in humans, as are probiotics based on these organisms. This lack of pathogenicity extends across all age groups and to immunocompromised individuals. Strains used for new probiotics should be chosen from the commensal flora of humans and

should not carry intrinsic resistance to antibiotics that would prevent treatment of a rare probiotic infection. Vigilance regarding the detection of possible rare cases of infection due to probiotics should be maintained, and isolates should be sent to reference centers for molecular characterization and confirmation [2].

There are many sources of exposure to lactobacilli and bifidobacteria. These sources include probiotics, fermented foodstuffs (e.g., yogurt, cheese, sauerkraut and other fermented vegetables, and olives), as well as the host's own microflora. In many traditional foods, such bacteria play an important role in preventing spoilage and the growth of pathogenic microorganisms. Some probiotic products that contain lactobacilli or bifidobacteria have long histories of safe use—in some cases, for many decades. In healthy humans, lactobacilli are normally present in the oral cavity (10^3 - 10^4 cfu/g), the ileum (10^3 - 10^7 cfu/g), and the colon (10^4 - 10^8 cfu/g), and they are the dominant microorganism in the vagina [2].

Cases of infection due to lactobacilli and bifidobacteria are extremely rare and are estimated to represent 0.05%-0.4% of cases of infective endocarditis and bacteremia. Of interest, increasing consumption of probiotic lactobacilli and bifidobacteria has not led to an increase in such opportunistic infections in consumers [2].

Most of the rare cases of infection with lactobacilli occur in patients with underlying conditions that are predominantly of a severe nature; most of these patients die within a year of developing infection. Lactobacillemia is a frequent marker of serious or fatal underlying disease [2].

Overgrowth of commensal lactobacilli can be a feature of patients with short bowel syndrome and is frequently associated with D-lactic acidosis. Antibiotic therapy and dietary carbohydrates appear to be the most important predisposing factors, although ingested D-lactate-producing bacteria, coupled to antibiotic use, has been implicated once. Consumption of strains that produce L-lactate exclusively is not likely to present a problem for such patients and may be useful in their treatment [2].

Lactobacilli and bifidobacteria are ubiquitous in the diet and in the healthy large intestine soon after birth. A classical risk assessment approach, similar to that used for pathogens, is not possible or warranted. In the case of the risk assessment approach for pathogens, pathogenicity is demonstrated and is normally a consequence of several properties, including colonization factors and virulence factors, acting in concert. Frequently, such factors as adhesion are considered to be virulence factors when pathogens are studied. For example, there is a distinct mucosal-associated flora in the gastrointestinal tract. [2].

There is no evidence that ingested probiotic lactobacilli or bifidobacteria pose any risk of infection greater than that associated with commensal strains. However, the risk is unequivocally in the “negligible” range. There have been 180 cases of lactobacillemia reported during the past 30 years. However, there have been only 69 cases of infective endocarditis attributed to lactobacilli reported during the same period [2].

Two cases have been reported in which the lactobacillus that was isolated was indistinguishable from the probiotic strains recently consumed by the patient [2].

In the development of new probiotics, species ideally should be selected from fecal flora commensals of healthy human volunteers who have not ingested products for ~1 month or from among probiotic lactic acid bacteria that have a long history of safe use in food products. Not all of these strains are known to be of human origin, and, therefore, this is not a prerequisite for safety. Although data from studies of humans provide information on the safety of probiotics used in existing products, such studies should not be solely relied for the safety screening of new probiotic products [2].

If a product is entirely novel (e.g., the microorganisms that it contains are not present in traditional diets), then more data may be required. Thus, a useful starting point could be a 90-day conventional rat-feeding study. However, there is a view that animal models are of limited value in such microbial risk assessment.

There is no firm consensus for such models, even between the authors of the present study. Despite this lack of firm consensus, the 90-day rat-feeding model has the advantage of being consistent with published recommendations for safety evaluation. Such feeding studies should be designed to pay special attention to the structure and function of the organs of the digestive system, and hematologic analysis should be extended to test for any translocating organisms [2].

Some of the safety evaluation models proposed in the literature appear to be of little or no value. Recently, changes have been proposed in the protocols for LD50 (median lethal dose) tests, and several authorities have become more critical of the need for such tests. Assays for which the end point is based solely on the death of laboratory animals are questionable from scientific and ethical points of view [2].

Where animal models may serve the most useful function in the evaluation of the safety of new probiotics is in immunocompromised hosts. Immunodeficient gnotobiotic mice have been used to assess the safety of probiotic bacteria as well as the potential to protect against *Candida* infection. In experiments assessing safety, some *Lactobacillus* probiotics were associated with death among dogs <4 weeks of age. Testing the use of new probiotics among immunocompromised neonatal mice may be a sensible precaution [2].

Many markers of the activity of gut bacteria have been studied. Some such markers recently have been advocated for the screening of probiotics. These markers include formation of biogenic amines, azoreductase, nitroreductase, β -glucuronidase activity, induction of thrombins, dissolution of thrombi by various hydrolases, aggregation of thrombocytes, adhesion to fibrinogen or fibronectin, mucin degradation, and hemolysis. Transferable antibiotic resistance was a further consideration. Some such measurements in vitro may have potential value but are not necessarily good predictors of activity in vivo. The relevance of many of these markers requires further study, and, in particular, desired outcomes should be proposed. Furthermore, the activities considered to be markers are present among components of the normal gastrointestinal flora. Evaluation is further complicated

by the fact that net changes in various enzymatic activities in different parts of the gastrointestinal tract are not solely dependent on the ability of ingested bacteria (in foods or as probiotics) to undertake these reactions [2].

The safety of probiotics should be confirmed in studies of humans. Although many research tools based on animal models or in vitro techniques are available, data from studies of humans are preferred whenever possible. In addition to self-reporting of symptoms and noninvasive measurements, such as measurements of body weight or blood pressure, the parameters of hematologic analysis and of serum/plasma chemical analysis detailed by Wolf et al. can provide useful information on the functioning of the immune and hematopoietic systems and, also, on the integrity of several internal organs, such as the kidneys and the liver. Clinically normal ranges for these parameters are known, and changes may indicate probiotic-induced effects [2].

Many strains of lactobacilli are naturally resistant to vancomycin. It is accepted that antibiotic nonsusceptibility/resistance is not, in itself, a hazard unless it renders the probiotic untreatable in rare cases of infection or unless it can be transferred to potential pathogens for which resistance could have therapeutic consequences. The vancomycin resistance genes of *Lactobacillus* species appear to be chromosomally located and are not easily transferable to other genera. Vancomycin would not be used for the treatment of a case of lactobacillemia. When used as probiotics, selected strains should be susceptible to ~2 major antibiotics. It currently is difficult to interpret studies of gene transfer in vivo, and the methods involved need to be further developed. The focus should be on transfer to *Enterococcus* species and *Staphylococcus aureus*, for which there are potential clinical consequences, rather than on homologous gene transfer [2].

The ability of lactic acid bacteria to inhibit the growth of various Gram-positive or Gram-negative bacteria is well known. This inhibition may be due to the production of organic acids such as lactic and acetic acid, hydrogen peroxide, bacteriocins, bacteriocin-like substances and possibly biosurfactants which are

active against certain pathogens and may be produced by different species of *Lactobacillus*. On the other hand, several studies have suggested that adhesive probiotic bacteria could prevent the attachment of pathogens and stimulate their removal from the infected intestinal tract [3].

These antagonistic properties could be very useful in probiotic products. Apart from this, successful probiotic bacteria should be able to survive gastric conditions and colonize the intestine, at least temporarily, by adhering to the intestinal epithelium. Such probiotic microorganisms appear to be promising candidates for the treatment of intestinal disorders produced by abnormal gut microflora and altered gut mucosal barrier functions. The most studied probiotics are the lactic acid bacteria, particularly *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* [3].

Lactobacilli were tested for inhibition of representative gastrointestinal tract pathogens using two methods: the mixed culture and the agar spot test described in Jacobsen et al. In the former, *lactobacilli* and the enteropathogens were incubated separately in LAPTg broth under aerobiosis until O.D.₆₀₀=0.6. Aliquots of each *Lactobacillus* culture were mixed with equal volumes of each of the enteropathogen cultures and incubation was resumed. Samples from the mixed cultures were plated at 4-h intervals for 24 h on the appropriated media. The plates were incubated at 37°C for 48 h and colony-forming units (CFU) counted. The experiment was performed twice. The method described by Jacobsen et al. was used for the agar spot test. Briefly, aliquots of 2 µl of test cultures were seeded onto LAPTg agar plates and incubated for 24 h. Thereafter, 100 µl of the overnight cultures of the indicator bacteria were mixed with 7 ml of soft agar (7 g l⁻¹) using the aforementioned medium for each strain. The plates were then incubated at 37°C for 48 h in aerobiosis, anaerobiosis or in a 5% CO₂ atmosphere, depending on the tested strain, and inhibition zones were observed. When clear zones reached more than 1 mm, these were scored as positive. Each test was performed twice. This method was used for *Listeria*, *Campylobacter*, and *Clostridium* [3].

All the samples were tested using the well diffusion assay, the plates being prepared by adding 100 µl from an overnight culture of *E. coli* O 111 to 10 ml of

LAPTg containing 12% (w/v) agar. After solidification, wells (5-mm diameter) were made with a sterile cork-borer and filled with 15 μ l of each sample [3].

Interference experiments were performed with *E. coli* O111 and *Lact. gasseri*, as they showed a significant capacity to adhere to Caco-2 cells. Briefly, for the exclusion tests, *Lact. gasseri* (10^8 CFU ml⁻¹) were added to Caco-2 monolayers and incubated together for 45 min; radiolabelled *E. coli* (10^8 CFU ml⁻¹) was subsequently added, and incubation was continued for a further 45 min. For competition tests, *Lactobacillus* and the radiolabelled pathogen were added to wells and incubated for 90 min. [3].