TOMSK POLYTECHNIC UNIVERSITY ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Школа Инженерная школа новых производственных технологий
Направление подготовки 19.04.01 Биотехнология
Отделение школы (НОЦ) НОЦ Н.М.Кижнера

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Биосинтез продигиозина бактерией Serratia marcescens

УДК 579.222.3:579.842.21

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ71	Аймбетов Канат Маратович		29.05.2019

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Чубик М.В	к.м.н.		29.05.2019г

КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Криницына З.В	к.т.н.,доцент		17,05,2019

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподователь	Романова С.В	-		03.06.2019

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Руководитель ООП 19.04.01 Биотехнология	Чубик М.В	к.м.н.,доцент		03.06.2019г

Томск – 2019 г.

Планируемые результаты обучения
по ООП 19.04.01 «Биотехнология» (магистр)
профиль «Биотехнология»

Код результата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)
Профессиональные компетенции	
Р1	Профессионально эксплуатировать современные биотехнологические производства, обеспечивая их высокую эффективность и безопасность
Р2	Разрабатывать и внедрять новые биотехнологические процессы и оборудование в рамках проектирования новых и усовершенствования действующих производств
Р3	Проводить теоретические и экспериментальные исследования в различных областях прикладной биотехнологии
Универсальные компетенции	
Р4	Ставить и решать задачи инженерного анализа для создания инновационных биотехнологических процессов и продуктов
Р5	Эффективно организовывать и участвовать в работе коллективов, в том числе международных, демонстрировать ответственность за результаты инженерной деятельности
Р6	Демонстрировать глубокие знания социальных, этических и правовых аспектов инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах устойчивого развития
Р7	Постоянно повышать интеллектуальный и общекультурный уровень и профессиональную квалификацию, способствовать обучению персонала

TOMSK POLYTECHNIC UNIVERSITY ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Инженерная школа новых производственных технологий
Направление подготовки 19.04.01 Биотехнология
Отделение школы (НОЦ) Н.М. Кижнера

УТВЕРЖДАЮ:
Руководитель ООП 19.04.01 «Биотехнология»
Чубик 29.01.19 Чубик М.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
4ДМ71	Аймбетов Канат Маратович

Тема работы:

Биосинтез продигиозина бактерией *Serratia marcescens*	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	№ 1471/с от 25.02.2019 г.

Срок сдачи студентом выполненной работы:	01.06.2019 г.

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе *(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).*	*Объектом данного исследования является Serratia marcescens, красный внутриклеточный пигмент Serratia marcescens продигиозин.*

Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов *(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).*	*1. Обзор литературы по теме исследования;* *2. Объект и методы исследования;* *3. Экспериментальная часть работы;* *4. Результаты проведенного исследования;* *5. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресрсосбережение* *6. Социальная ответственность;* *7. Выводы по исследованию.*
Перечень графического материала *(с точным указанием обязательных чертежей)*	

Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы
(с указанием разделов)

Раздел	Консультант
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Криницына З.В., доцент отделения социально-гуманитарных наук
Социальная ответственность	Романова С.В., старший преподаватель отделения общетехнических дисциплин
Раздел на иностранном языке	Аксёнова Н.В., доцент отделение иностранных языков

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

Обзор литературы

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	

Задание выдал руководитель / консультант (при наличии):

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Чубик М.В.	к.м.н.		29.01.2019г

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ71	Аймбетов Канат Маратович		29.01.2019г

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ71	Аймбетов Канат Маратович

Школа	ИШНПТ	Отделение школы (НОЦ)	НОЦ Н.М.Кижнера
Уровень образования	Магистр	Направление/специальность	19.04.01 Биотехнология

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:	
1. *Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих*	*Стоимость сырья, материалов, комплектующих изделий и покупных полуфабрикатов, спецоборудования, затраты по статьям.*
2. *Нормы и нормативы расходования ресурсов*	*Расчетные величины материалов и сырья научно-технического проекта.*
3. *Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования*	*Упрощенная система налогообложения, транспортно-заготовительные расходы, транспортно-монтажные расходы, премиальный коэффициент, коэффициент доплат и надбавок, районный коэффициент, заработная пата по тарифной ставке.*
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
1. *Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ*	*Доступность исходных продуктов, простота методики, экологичность, скорость и время бисоинтеза продигиозина, эффективность продукта.*
2. *Разработка устава научно-технического проекта*	*Выбор организационной структуры научного проекта, проектная структура проекта.*
3. *Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок*	*- Планирование управления научно-техническим проектом (Иерархическая и организационная структура работ проекта, план проекта)* *- Формирование бюджета научного исследования* *- Оценка рисков проекта*
4. *Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности*	*Удобство эксплуатации, материалоемкость, надежность, энергосбережение.*
Перечень графического материала *(с точным указанием обязательных чертежей):*	
1. *Диаграмма Исикавы* 2. *Иерархическая структура работ проекта* 3. *Проектная структура проекта*	

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	15.02.2019

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Криницына Зоя Васильевна	к.т.н.,доцент		15.02.2019

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ71	Аймбетов Канат Маратович		15.02.2019

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ71	Аймбетов Канат Маратович

Школа	Инженерная школа новых производственных технологий	**Отделение (НОЦ)**	НОЦ им.Н.М.Кижнера
Уровень образования	магистр	**Направление/специальность**	19.04.01Биотехнология

Тема ВКР:

Биосинтез продигиозина бактерией Serratia marcescens	
Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:	
1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	*- рабочая зона: лаборатория биотехнологии научно-образовательный центр Н.М.Кижнера* *- Объект исследования: дикий штамм бактерии Serratia marcescens* *- область применения:медицина, производство*
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности: – специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; – организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.	- Специальные правовые нормы трудового законодательства: - ГОСТ Р 52905-2007. (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности; - ГОСТ 12.4.011 – 89. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация; - ПНД Ф 12.13.1-03. Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях; Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны: - Р 2.2.2006-05. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда.
2. Производственная безопасность: 2.1. Анализ выявленных вредных и опасных факторов 2.2. Обоснование мероприятий по снижению воздействия	-Отклонение показателей микроклимата -Превышение уровня шума -Недостаточная освещенность рабочей зоны - Вредные химические вещества - Работа с бактериями
3. Экологическая безопасность:	- атмосфера: работа исключительно в ламинаре, при включенной вентиляции, с соблюдением необходимой дистанции и при наличии специальной одежды. - гидросфера: правильная утилизация биологических отходов, их обезвреживание - литосфера: сбор и утилизация отходов в соответствии с правилами

4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:	К чрезвычайным ситуациям относится возникновение пожара на рабочем месте в результате розлива легко воспламеняющихся жидкостей, воспламенение оборудования.

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподователь	Романова Светлана Владимировна	-		13.02.19

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ71	Аймбетов Канат Маратович		13.02.19

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа – 86 с., 10 рис., 26 табл., источника, 1 приложение.

Ключевые слова: *Serratia marcescens*, бактерии, продигиозин, пигмент, питательные среды, Кинг А, овсяная, пептон-глицериновая, LB, колонии, фермент, окраска по Граму.

Объектом исследования является *Serratia marcescens*, красный внутриклеточный пигмент *Serratia marcescens* продигиозин.

Цель работы – биосинтез продигиозина бактерией *Serratia marcescens*.

В процессе исследования проводилось выделение чистой культуры *Serratia marcescens*, подтверждение чистоты культуры по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам. Для проведения экспериментов готовили питательные среды, проводили стерилизацию посуды, питательных сред, расходных материалов.

В результате исследования были подобраны наиболее оптимальные среды для наибольшего выхода продигиозина или подобного пигмента при культивировании на них дикого штамма *Serratia marcescens*.

Область применения: медицина, производство биологически-активных веществ.

На основании результатов проведенного исследования планируется охарактеризовать полученный пигмент по химической структуре, а также по антибактериальным и противогрибковым свойствам. Эксперименты планируется проводить совместно с сотрудниками кафедры Микробиологии и вирусологии СибГМУ.

Список сокращений

МАП – 2-метил-3-амилпиррол

ГПС – глицерин-пептонная среда

ГОСТ – государственный стандарт

ЛВЖ - легко воспламеняющиеся жидкости

ГН – государственный норматив

СанПиН – санитарные правила и нормы

ПДК – предельно-допустимая концентрация

СНиП – строительные нормы и правила

ТВЭЛ – тепловыделяющий элемент

СО - социальная ответственность

ЧС - чрезвычайная ситуация

ЭЧ – экономическая часть

Оглавление

Введение 13
1 Обзор литературы 15
1.1 Характеристика *Serratia marcescens* 15
1.2 Бактериальный пигмент продигиозин..... 18
1.2.1 Биосинтез продигиозина..... 20
1.2.2 Питательные среды и условия культивирования оптимальные для биосинтеза продигиозина..... 21
2 Объект и методы исследования 25
3 Экспериментальная часть 26
3.1 Приготовление питательных сред 26
3.2 Получение дикого штамма *Serratia marcescens* и его условия культивирования 27
4 Результаты исследования 29
4.1 Получение дикого штамма *Serratia marcescens*, продуцирующий пигмент продигиозин 29
4.2 Определение оптимальных питательных сред 30
4.3 Характеристика *Serratia marcescens* (подтверждение полученных штаммов) 31
4.4 Получение чистой культуры *Serratia marcescens* 31
5 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение 33
5.1 Предпроектный анализ 33
5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования 33
5.1.2 Диаграмма Исикавы 34
5.1.3 Оценка готовности проекта к коммерциализации 34
5.1.4 Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования 36
5.2 Инициация проекта 36
5.2.1 Цели и результат проекта 37

5.2.2 Организационная структура проекта 37
5.2.3 Ограничения и допущения проекта 38
5.3 Планирование управления научно-техническим проектом 39
5.3.1 Иерархическая структура работ проекта .....
5.3.2 Контрольные события проекта 39
5.3.3 План проекта 40
5.3.4 Бюджет научного исследования 44
5.3.5 Организационная структура проекта 49
5.3.6 Матрица ответственности 50
5.3.7 Реестр рисков проекта 51
5.4 Оценка сравнительной эффективности исследования 51
6 Социальная ответственность 54
6.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности 55
6.1.1 Специальные (характерные для проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства 55
6.1.2 Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны .. 56
6.2 Профессиональная социальная безопасность 57
6.2.1 Анализ вредных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению 59
6.2.1.1 Отклонение показателей микроклимата 59
6.2.1.2 Повышенный уровень шума 60
6.2.1.3 Недостаточная освещенность рабочей зоны 61
6.2.1.4 Вредные химические вещества 62
6.2.1.5 Опасность поражения электрическим током 62
6.2.1.6 Работа с бактериями 63
6.2.2 Анализ опасных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению 63
6.2.2.1 Опасность поражения электрическим током 63
6.3 Экологическая безопасность 64
6.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях 65

6.4.1. Анализ вероятных ЧС, которые может инициировать объект исследования и которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследований 65
Выводы 68
Список использованных источников 69
Приложение А... 76

ВВЕДЕНИЕ

Большинство работ, в области изучения бактериальных пигментов посвящено фототрофам, в то время, как пигменты нефотосинтезирующих микроорганизмов изучены в значительно меньшей степени. Ярко-красный пигмент продигиозин, синтезируемый энтеробактериями *Serratia marcescens,* представляет собой линейный трипиррол (пиррол, 3-метоксипиррол, 2-метил-3-амилпиррол). Как и многие вторичные метаболиты бактерий, продигиозин приобретает практическое значение в промышленности и медицине. В промышленности продигиозин рекомендуется в качестве красителя для полимеров, поскольку он обладает рядом преимуществ по сравнению с применяемыми в настоящее время органическими и неорганическими пигментами. Разработан способ использования продигиозина для маркирования нефтепродуктов [61]. Пигмент хорошо растворим в различных марках топлива и легко обнаруживается по характерному спектру поглощения. Продигиозин и продигиозинподобные пигменты, синтезируемые некоторыми видами микроорганизмов, рассматриваются как новое семейство противоопухолевых лекарственных препаратов [62,63]. Показано, что продигиозин действует, как иммунодепрессант, селективно блокируя пролиферацию Т-клеток киллеров [64,65], избирательно индуцирует апоптоз различных типов злокачественных клеток [66,67], ингибирует образование метастаз, обладает антиинвазивными свойствами [68].

В связи с большой практической значимостью продигиозина возникает необходимость в наработке больших количеств пигмента и снижении его стоимости. Высокая стоимость пигмента тормозит, в частности, использование его в качестве маркера нефтепродуктов. Кроме того, неизученным остается вопрос о мутагенности, генетической токсичности продигиозина. Для изучения этих свойств необходимы высокоочищенные

препараты продигиозина. В представленной работе предполагается разработать эффективную схему получения продигиозина и изучить некоторые биологические эффекты пигмента.

Цель работы: Получить продигиозин при культивировании дикого штамма бактерии *Serratia marcescens*.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи:**

1. Изучить данные литературы о пигменте продигиозине и его свойствах;
2. Получить культуру продуцента на разных питательных средах: Кинг А, пептон-глицериновая, овсяная среда, LB;
3. Определить наиболее оптимальную среду для выращивания *S. marcescens*;
4. Определить показатели затрат научно-исследовательской работы;
5. Проанализировать вредные и опасные факторы при работе по биосинтезу продигиозина.

Объектом исследования являются дикий штамм бактерии *Serratia marcescens*, элективные питательные среды.

Научная новизна – впервые проведено исследование диких штаммов бактерии *Serratia marcescens* при их культивировании на различных питательных средах для получения пигмента продигиозина.

1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика *Serratia marcescens*

S. marcescens представляет собой типовой вид рода *Serratia* входящего в семейство *Enterobacteriaceae*. Бактерии представляют собой грамотрицательные, подвижные палочки с перитрихиальным жгутикованием. Для *S.marcescens* характерно роение на твердых поверхностях, отличающееся от обычной подвижности в жидких питательных средах. ДНК *S. marcescens* содержит 57.5 - 60.0% Г-Ц пар -это самое высокое значение среди энтеробактерий. Лишь для одного штамма *S. marcescens* определен размер генома — $3.57*10^9$ Да [1].

Клеточная оболочка *S. marcescens,* так же как у всех грамотрицательных бактерий, состоит из нескольких слоев. Внутренний слой - цитоплазматическая мембрана - покрыта снаружи тонким слоем пептидогликана, который составляет менее 10% сухого веса клеточной стенки. Пептидогликан не содержит лизина, межпептидные мостики отсутствуют. Наряду с этим опорным каркасом имеются большие количества липопротеинов, липополисахаридов и других липидов, которые как бы наклеены снаружи на муреиновый каркас. Тейхоевые кислоты у грам-отрицательных бактерий до сих пор не были обнаружены. Самый верхний слой представляет собой наружнюю мембрану. Наружная мембрана грам-отрицательных бактерий выполняет не только механические, но и важные физиологические функции. В ее двойной липидный слой, состоящий из липида А, полисахаридов и фосфолипидов, встроены белки, пронизывающие этот слой. Эти трансмембранные белки представляют собой заполненные водой каналы - гидрофильные поры в липидной мембране. В наружной мембране содержится большое количество молекул порина - трансмембранного белка массой 37 кДа.

Тримеры порина формируют каналы, по которым небольшие полярные молекулы быстро диффундируют, проходя сквозь мембрану.

Факультативные анаэробы, хемоорганогетеротрофы, обладающие дыхательным и бродильным типами метаболизма. Хорошо растут при 30-37°С. Катаболизируют D-глюкозу и многие другие углеводы с образованием кислоты, но без образования газа. Не сбраживают лактозу, пептонизируют молоко, обладают денитрифицирующей активностью. Способны расти на среде Симонса с цитратом. Все штаммы вида 5". *marcescens* каталазоположительны, дают отрицательный тест с метиловым красным; реакция Фогес-Проскауэра обычно положительная. Большинство также положительны по лизиндекарбоксилазе, орнитиндекарбоксилазе, отрицательны по орнитиндегидролазе; H_2S не образуют, не гидролизуют мочевину, малонат, как правило, не используют. Углеводы, сбраживаемые всеми или большинством штаммов включают: мальтозу, D-маннитол, D-маннозу, салицин, сахарозу и трегалозу.

Встречаются в почве, в воде, на поверхности растений и других природных источниках, а также в пищеварительном тракте насекомых; в последние годы с возрастающей частотой в различных клинических материалах от больных и здоровых людей [2]. *S. marcescens* вызывает оппортунистические инфекции у госпитализированных больных — септицемии и инфекции мочевых путей. Способность *S. marcescens* колонизировать широкий ряд экологических ниш связан с образованием спектра внеклеточных продуктов включая хитиназы, протеазы, липазы, нуклеазы, бактериоцины и сурфактанты.

Многие штаммы вида образуют розовый, красный или фуксиновый пигмент, однако пигментообразование является вариабельным признаком.

У беспигментного штамма *S. marcescens* была обнаружена активность ферментов гликолиза: глюкокиназы, фосфоглюкоизомеразы, фосфофруктокиназы,фруктозодифосфатальдолазы,глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, а так же первого фермента пентозофосфатного пути - глюкозо- 6-фосфат-дегидрогеназы [3]. Показана связь глюкозо-6-фосфат- дегидрогеназы с пигментацией *S. marcescens*. Авторы высказали предположение, что фермент

может быть использован как генетический маркер для эволюционных и таксономических исследований. Проведено исследование активности ферментов цикла трикарбоновых кислот - изоцитратдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, фумаразы, малатдегидрогеназы. Показано, что *S. marcescens* способна расти на среде, содержащей ацетат в качестве единственного источника углерода. При этом была обнаружена активность изоцитритазы и малатсинтетазы, что дало возможность утверждать, что в клетках *S. marcescens* также действует глиоксилатный цикл дикарбоновых кислот [4].

В анаэробных условиях *S. marcescens* ведет бутандиоловое брожение. Сбраживание Сахаров приводит к образованию молочной, уксусной и муравьиной кислот, а также этилового спирта ацетоина, который затем восстанавливается до 2,3-бутандиола. По сравнению с простым брожением смешанного типа, характерным для *E. coli,* бутандиоловое брожение ведет к суммарному возрастанию восстановительного потенциала за счет образования восстановительных продуктов - бутандиола и этанола. Соответственно, при брожении образуется меньше кислот. Интересно отметить, что *S. marcescens* образует значительные количества ацетоина и при росте в аэробных условиях. При выращивании культуры в условиях интенсивной аэрации на среде с 10% глюкозы накапливалось 12-15 г/л ацетоина на седьмые сутки [5].

S. marcescens, в отличие от большинства энтеробактерий, секретирует в среду высокоактивные гидролазы, расщепляющие сложные полимерные соединения. Это хитиназы, протеазы, эндонуклеазы и липазы. Механизмы секреции этих гидролитических ферментов бактериями могут быть различны. Большинство внеклеточных гидролаз *S. marcescens* представлено ферментами эндотипа.

S. marcescens секретирует внеклеточные биосурфактанты, которые играют важную роль в перемещении микроорганизма по твердой поверхности, ослабляют поверхностное натяжение в периферической части колонии [6].

Биосурфактанты — поверхностно-активные вещества с разнообразной химической структурой, характеризующиеся низкой токсичностью, высокой деградабельностью [7]; применяются в различных индустриях (косметической, фармацевтической, пищевой), а так же в биоремедиации [7].

1.2 Бактериальный пигмент продигиозин

Продигиозин - красный пигмент *S. marcescens* — представляет собой пиррилдипиррилметен. Его структурная формула была установлена в результате частичного и общего синтеза молекулы.

S. marcescens сильно вариабельна по признаку пигментообразования. Беспигментные колонии могут быть получены при рассеве большинства пигментных штаммов, хотя частота спонтанной потери способности к образованию пигмента различна у разных штаммов. Эти штаммы, по-видимому, способны синтезировать лишь монопиррольную часть молекулы продигиозина, тогда как способность синтезировать дипиррольные предшественники потеряна.

Беспигментные штаммы *Serratia marcescens* отличаются от пигментных по некоторым биохимическим свойствам. Известно, что пигментные штаммы чувствительны ко многим антибиотикам. Для беспигментных штаммов характерна множественная лекарственная устойчивость, связанная с носительством плазмид. Продемонстрировано, что непигментированные штаммы *S. marcescens* лучше воспринимают плазмиды, чем пигментированные [8].

Выделены штаммы *S. marcescens,* продуцирующие желтый пигмент. Появление желтой пигментации связано с утратой способности расти на ароматических соединениях, таких как тирозин, фенилаланин. Поэтому считается, что желтый пигмент - муконовая кислота — продуцируется в основном метаболизме. Пигмент синтезируется в позднюю экспоненциальную и раннюю стационарную фазу роста [9].

Первое подробное изучение продигиозина принадлежит Вреде и Хеттче [10]. Для выделения пигмента авторы применили метод щелочного разрушения клеток *S. marcescens*. Экстракцию пигмента проводили спиртом и петролейным эфиром. На основании анализа экстракта была предложена эмпирическая формула продигиозина $C_{2}oH_{25}N_{3}0$, Mr 323,4. Сантер, Фогель [11], Вассерман с соавторами [12] провели большую работу по изучению и выделению предшественников продигиозина. Оказалось, что продигиозин образуется в результате конденсации предшественника $C_{10}H_{10}N_{2}O_{2}$ с 2-метил-3 -амилпирролом.

Рапопорт и Холден [13] окончательно установили формулу продигиозина в виде пиррилдипиррилметена (рис. 1).

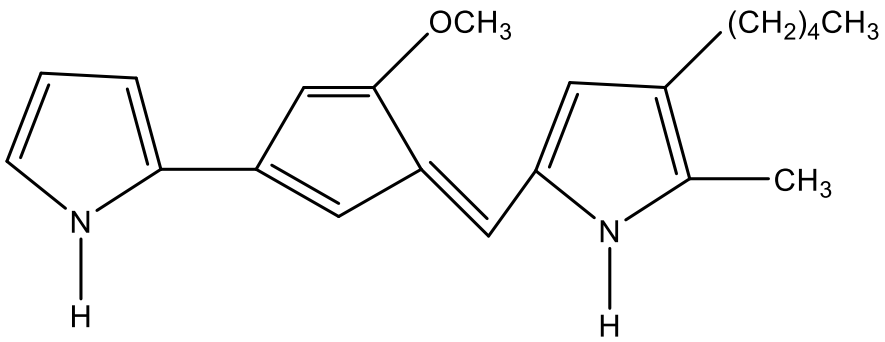

Рис. 1 Структурная формула продигиозина

Продигиозин легко окисляется на воздухе и образует серратин $C_{40}H_{60}N_{4}O_{6}HClO_{4}$. Продигиозин может существовать в двух различных формах в зависимости от концентрации ионов водорода в растворе. В кислой и нейтральной средах этот пигмент имеет красную окраску и проявляет резко выраженный спектральный максимум при 535-540 нм. В щелочной среде пигмент окрашивается в оранжево-желтый цвет и обладает более широкой зоной спектра с максимум при 470 нм.

Пигмент может присутствовать у бактерий в виде нескольких форм, каждая из которых имеет одну и ту же пиррилдипиррилметеновую структуру, но отличается боковыми цепями и агрегацией молекул продигиозина.

Спектральный анализ продигиозина, проведенный в УФ области, показал наличие максимумов при 370 - 135 - 120 - 75 - 66 нм, причем поглощение при 100 - 150 и 300 - 310 нм - характерно для пиррольного кольца, поглощение при 270 - 290 нм для метиленовых и метальных групп, тогда как поглощение при 310 нм характерно для метеновой группы.

1.2.1 Биосинтез продигиозина

Начальные этапы биосинтеза продигиозина у *S. marcescens* были изучены Хаббардом и Римингтоном [14]. С помощью метода радиоактивно меченных атомов было показано, что глицин является специфическим предшественником всех трех азотных атомов в молекуле продигиозина, но при этом углерод карбоксильного атома не используется. Кроме глицина, на начальных стадиях образования продигиозина важную роль играет ацетат. Установлено, что оба углеродных атома ацетата активно участвуют в его биосинтезе [14].

Изучая влияние различных аминокислот на образование продигиозина в растущих культурах *S. marcescens,* Вильямсон с соавторами предположили, что L-пролин может служить непосредственным предшественником продигиозина [15]. Показано, что меченный по углероду пролин активно включается в молекулу пигмента *S. marcescens* и является, следовательно, одним из его предшественников.

Кольцо пролина используется, главным образом, при образовании 2-метил-3-амилпиррольной части продигиозина. Подтверждение этому служат опыты с меченным ^{14}C5-пролином, включение которого в молекулу продигиозина составляет 6.8 %. В образовании продигиозина может использоваться только L, но не D-форма пролина; Ь-орнитин-2-^{14}C также принимает участие в образовании пигмента *S. marcescens.*

Продигиозин содержит две метальные группы, одна из которых (или обе) могут синтезироваться с участием метионина. При образовании пиррольных колец пигмента могут включатся и другие аминокислоты: орнитин, аспарагиновая кислота, аланин [16].

1.2.2 Питательные среды и условия культивирования оптимальные для биосинтеза продигиозина

От 10% и до 60% стоимости продуктов ферментации, метаболизма бактерий приходятся на стоимость компонентов среды. Для снижения затрат в микробиологическом производстве обычно применяют дешевые среды. Однако нужно учитывать, что решающее значение для жизнедеятельности микроорганизмов имеют соотношение компонентов питательной среды. Чрезвычайно важны так же физико-химические факторы: кислотность среды (pH), окислительно-восстановительные условия (Eh), аэрация, температура и другие [17].

При подборе синтетических сред исходят из потребностей микроба в элементах питания, которые в свою очередь зависят от элементарного состава его клеток. Немаловажное значение имеет качество сырья, отношение C:N, содержание примесей. В производстве чаще всего в качестве источника углерода используют сырье растительного происхождения: крахмал, мелассу, декстрозу, растительное масло, метанол, целлюлозу, лактозу, редко этанол. Как источник азота чаще выступает кукурузный экстракт, соевая мука, мочевина, дрожжевой экстракт, гидролизат белка. Считают, что комплексные азотистые вещества выгоднее использовать, чем аммоний и его соли, так как комплекс содержит дополнительные вещества [18].

Хотя энтеробактерии часто выращивают на сложных средах, минимальные пищевые потребности этих микроорганизмов, как правило, весьма просты. *Serratia marcescens,* как и большинство прототрофов может расти на простых питательных средах, содержащих лишь одно вещество в качестве источника углерода и энергии, а также несколько неорганических солей. В литературе для получения пигмента *S.marcescens* предложены разнообразные среды [19,20,21,22,23,24].

На сегодняшний день дешевой и экономически выгодной является пептон-глицериновая среда, содержащая всего 5г пептона и 20г глицерина на 1

л дистиллированной воды. Благодаря простому составу и доступности она нашла широкое применение в биотехнологии. Среда была предложена для выявления предшественников пигмента Катз и Соблески [21]. Среды Кинга А и Б разработаны в качестве селективных и дифференциальных сред для выделения и первичной идентификации псевдомонад. Среда Кинга А стимулировала образование псевдомонадами флуоресцеина и пиоцианина [25]. Впервые применение этой среды для получения продигиозина *S.marcescens* встречается в работах Трутко и Акименко [22].

Индийские ученые [24] в своей работе по подбору питательных сред для повышения роста и пигментации *S.marcescens* сравнивали питательный бульон с дрожжевым экстрактом, пептон-глицериновую среду и среды, содержащие молотые семена арахиса, кунжута и кокоса или только их масла. В ходе исследования они получили данные, что количество синтезируемого продигиозина во много раз больше на среде с молотыми семенами кунжута, чем на пептон-глицериновой (ПГС) и других средах. При добавлении глюкозы или мальтозы в ПГС среду (дополнительный источник углерода) выход пигмента не достигает такого значения, как на зерновых средах. Ученые объясняют это тем, что семена и масла содержат металлы, витамины, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты. Дальнейшие эксперименты были направлены на сравнение сред, в составе которых молотые семена арахиса, кунжута и кокоса, со средами, содержащими их масла (арахисовое, кунжутное) в качестве источника углерода.

Наибольший выход пигмента (в 15 раз выше) получен на средах из семян, максимальное количество дает арахисовая среда. Это связано с тем, что растительные масла известны высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот и малым количеством насыщенных, тогда как в зернах разница в их соотношениях незначительна. Есть предположение, что ненасыщенные жирные кислоты как источник углерода менее доступны для *S.marcescens* [24]. Глюкоза является хорошо усвояемым источником углерода и используется во многих

питательных средах. Однако, биосинтез продигиозина подчиняется механизму катаболитной репрессии. Высокие концентрации глюкозы способствуют накоплению биомассы бактерии, но ингибируют пигментообразование [26,27]. Интересные данные были получены японскими исследователями Чангом и Санада [23] при выращивании *S.marcescens* на модифицированных средах. В качестве источника углерода были использованы различные сахара: глюкоза, галактоза, фруктоза, арабиноза, спирты: метанол, этанол, изопропанол, Н-бутанол. В качестве источника азота - полипептон, соевая мука, мука семян хлопка, дрожжевой экстракт. Лучший рост бактерий и синтез пигмента наблюдается на среде с этанолом и мукой семян хлопка. Кроме того, исследовалось влияние минеральных солей и их концентраций на продуктивность *S.marcescen.* Показано, что уменьшение содержания или полное изъятие фосфатов и NaCl из питательной среды приводит к накоплению биомассы и продигиозина до 2.95 г/л среды. Предполагается, что образование вторичных метаболитов грамотрицательными бактериями является ответом на фосфорное голодание [23].

Синтез пигмента является плотностнозависимым процессом и подчиняется эффекту кворума [28,29]. Межклеточная коммуникация осуществляется химическими факторами -автоиндукторами (N-ацилгомосерин лактон). Для стимуляции пигментообразования рекомендуют внесение в питательные среды *N*-бутанол- L-гомосерин лактона (BHL) или iV-гексанол- L-гомосерин лактона (HHL) в количестве 5 ц.М, при этом выход пигмента увеличивается на 20 % [30] .

Пигментация *S.marcescens* отличается большой нестабильностью, бактерии часто теряют способность к пигментообразованию при длительном хранении в коллекциях. Бантинг разработала синтетическую среду, на которой бактерии с табильно образовывали пигмент (цитрат аммония - 5г, глицирин -5г, NaCl-0.5r, K_2HPO_4-$3H_2O$-10r, FeS04 - 0.05г на литр среды) [31]. В дальнейшем для повышения выхода пигмента культуру *S.marcescens* выращивали на

модифицированной среде Бантинг, которая дополнительно содержала гидролизат казеина и дрожжевой экстракт [32].

Таким образом, большинство рекомендуемых сред содержит дорогостоящий пептон. Использование полусинтетических исинтетических сред снижает биосинтез пигмента. Как видно из обзора в настоящее время широким фронтом ведутся поиски дешевых сред, обеспечивающих высокий выход продигиозина.Неоднократно упоминалось, что продигиозин - вторичный метаболит. Образование его в растущих культурах *S.marcescens* начинается обычно через 10-12 часов после посева, то есть после прохождения экспоненциальной фазы роста. В конце стационарной фазы количество пигмента продолжает возрастать. Максимальные количества продигиозина накапливаются в клетках, в которых наблюдаются процессы диссимиляции. По мере накопления пигмента меняется его фракционный состав. Красная фракция начинает образовываться через 10 часов и преобладает до 144 часа культивирования. Синяя фракция появляется в более старых культурах, также происходит перемещение максимумов поглощения пигмента в длинноволновую область. Предполагается, что синяя фракция образуется из красной, конденсацией двух молекул продигиозина. Молекулярный вес синей фракции в два раза превышает молекулярный вес красных и содержит в 6 раз больше железа, чем остальные фракции [32].

S.marcescens синтезирует продигиозин в довольно широком диапазоне температур - от 12° до 36° С. Максимальное количество пигмента образуется при температуре 27° С. Вильяме с соавторами установили, что при температуре 37°С и выше пигмент не синтезируется. В опытах, где культура *S. marcescens* выращивалась при 38°С в течение 36-72 часов и затем помещалась в условия с температурой 27°С, вновь наблюдали пигментообразование. Это связано с тем, что высокая температура влияет на конечный этап биосинтеза продигиозина, а именно - инактивирует фермент, контролирующий конденсацию дипиррольного фрагмента с метиламилпирролом [32]. Таким образом,

максимальный выход пигмента наблюдается при культивировании бактерии в течение 2-3 суток при температуре 27°С.

Значения pH среды являются важными физико-химическими факторами, влияющие на синтез продигиозина и его фракционный состав. Оптимальные значения pH находятся в интервале - от 6.5 до 8.0. Более щелочные условия способствуют образованию оранжевой фракции, кислые - красной [26,32].

Для образования пигмента необходимы ионы SO4" и микроэлементы: магний, цинк, марганец, рубидий, кальций и особенно железо, образующее хелатные связи с молекулой продигиозина. Кроме того, железо стимулирует ферментные системы, осуществляющие синтез пигмента из свободных аминокислот [33]. Для образования пигмента необходим комплекс витаминов, среди которых наиболее важную роль играет тиамин. В связи с этим часто для культивирования *S.marcescens* используют среду Бантинг с добавлением дрожжевого экстракта [34].

При изучении роли аминокислот в биосинтезе продигиозина показано, что 4 аминокислоты: DL-аспарагиновая, L- глутаминовая, L-пролин и L-аланин наиболее эффективны. Данные аминокислоты, добавленные в среду по отдельности, стимулируют образование продигиозина при концентрации 5-10 мг/мл. Остальные аминокислоты (орнитин, серии) используются для синтеза пигмента лишь в достаточно больших концентрациях.

2 Объекты и методы исследования

Объектом данного исследования является дикий штамм *Serratia marcescens* полученная в воздухе.

В работе этого исследования были использованы следующие реагенты при приготовлении питательных сред и характеристики изолятов: пептон, глицерин, K_2S0_4, $MgCl_2$, глицерин, галактоза, овсяная мука, NaCl, дрожжевой

экстракт, генциановый фиолетовый, фуксин, этиловый спирт (80%), раствор Люголя, дистиллированная вода.

При приготовлении и культивировании бактериальной питательной среды использовали стерилизованную стеклянную посуду, покрытую бумажными обертками, в виде стакана, колбы Эрленмейера, чашек Петри. Также использовали предметные стекла для характеристики изолятов при окраске по Граму.

Оборудование, используемое для выращивания и изоляции, представляет собой нагреватель, автоклав, шкаф с ламинарным потоком воздуха (бокс биобезопасности), шейкер, бинокулярный иммерсионный микроскоп (PrimoStar) термостат-инкубатор с естественной циркуляцией воздуха, аналитические весы и холодильник.

5. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

5.1 Предпроектный анализ

5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Целевыми потребителями результатов исследования являются научно-исследовательские лаборатории, предприятия и производства, занимающиеся исследованием и масштабным производством продигиозина, где результаты данного исследования могут быть базовым или вспомогательным знанием для дальнейших исследований в масштабировании производства продигиозина путем биосинтеза.

На основании вышеизложенной информации можно сделать вывод о перспективности результатов данного проекта, где после дальнейших исследований по пониманию способа масштабирования, можно разработать оптимальную процедуру производства продигиозина с высоким уровнем выхода.

Сегментирование рынка данного проекта проводится по размерам компаний и видам деятельности, связанных с применением микробиоты, как показано на рис 5.1.1.1.

Размер компании	Вид целевой деятельности		
	Научно – исследовательский проект	Оптимальные питательные среды	Пигментный препарат с высоким уровнем очистки
Крупные			
Средние			
Мелкие			

Рисунок 5.1.1.1 - Карта сегментирования рынка для биосинтеза продигиозина

- Научно-исследовательские лаборатории, занимающиеся оптиматизацией биосинтеза продигиозина

- Предприятия, производящие препараты продигиозина

- Производства, занимающиеся исследованием и масштабным производством продигиозина

5.1.2 Диаграмма Исикавы

Диаграмма причины-следствия Исикавы (Cause-and-Effect-Diagram) — графический метод анализа и формирования причинно-следственных связей, инструмент для систематического определения причин проблемы и последующего графического представления (Рисунок 5.1.2.1)

Рисунок 5.1.2.1 – Диаграмма Исикавы

5.1.3 Оценка готовности проекта к коммерциализации

На каждой стадии жизненного цикла научной разработки необходима оценка степени её готовности к коммерциализации, а так же выяснение уровня знаний разработчика для её проведения и завершения. С этой целью была заполнена специальная форма, содержащая показатели о степени проработанности проекта с позиции коммерциализации и компетенции разработчика научного проекта (таблица 5.1.3.1).

Таблица 5.1.3.1 - Оценка степени готовности 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	4	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	4	4
5.	Определены авторы и осуществлена охра-на их прав	3	3
6.	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	3	3
7.	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	3	3
8.	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	2	2
9.	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	3	2
10.	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	5	4
11.	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	4	3
12.	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	3	2
13.	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	2	2
14.	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	3	3
15.	Проработан механизм реализации научного проекта	4	4
	ИТОГО БАЛЛОВ	52	47

Анализ готовности проекта к коммерциализации (или уровень имеющихся знаний у разработчика) проводится по таблице с использованием пятибалльной шкалы, которая показана выше, и определяется по формуле:

$$Б_{сум} = \sum Б_i \ , \quad (1)$$

где $Б_{сум}$ – суммарное количество баллов по каждому направлению; $Б_i$ – балл по i-му показателю.

Значение $Б_{сум}$ для проработки составило 52 балла, для уровня знаний разработчика — 47, следовательно, перспективность разработки выше среднего. Слабыми местами проекта являются бизнес-план и вопросы финансирования коммерциализации. Решением этой проблемы может стать повышение экономических компетенций разработчиков или включение в проектную группу экономиста.

5.1.4 Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования

Коммерциализацию исследования планируется осуществлять с использованием метода продажи патентной лицензии. Производство конечного продукта на коммерческой основе требует масштабирования процесса получения препарата, что сопряжено со значительными финансовыми затратами, а так же требует наличия собственных производственных линий. Следовательно, наиболее простым способом коммерциализации проекта является продажа лицензии.

5.2. Инициация проекта

На стадии инициации проекта определяются начальные финансовые ресурсы, а так же круг внешних и внутренних заинтересованных сторон проекта, их взаимодействие и влияние на общий результат научного исследования.

5.2.1 Цели и результат проекта

Информация о заинтересованных сторонах проекта и их ожидания к результатам проекта представлены в таблице 5.2.1.1.

Таблица 5.2.1.1 - Заинтересованные стороны проекта

Заинтересованные стороны проекта	**Ожидания заинтересованных сторон**
Научно-исследовательские лаборатории	Новые питательные среды для повышения оптиматизации биосинтеза продигиозина
Производители препаратов продигиозина	Открытие новых состав питательных сред

В таблице 5.2.1.2 представлены цели и запланированные результаты для данного проекта по биосинтезу продигиозина бактерией *Serratia marcescens*.

Таблица 5.2.1.2 - Цели и результат проекта

Цели проекта:	Ознакомиться с технологией биосинтеза продигиозина бактерией *S. marcescens.*
Ожидаемые результаты проекта:	Определить наиболее оптимальный состав среды для выращивания *S. marcescens.*
Критерии приемки результата проекта:	Качественная оценка характеристика полученного штаммов *S. marcescens.*
Требования к результату проекта:	Исследовать оптимальные условия для культивирования бактерии *S. marcescens.*
	Определить характеристику штаммов *S. marcescens.*
	Запатентовать результаты исследования

5.2.2 Организационная структура проекта

Определим рабочую группу проекта, а также роль каждого участника в данном проекте, функции, выполняемые каждым из участников и их трудозатраты в проекте (таблица 5.2.2.1).

Таблица 5.2.2.1 — Состав рабочей группы, выполняющей проектное исследование

№ п/п	ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудо-затраты, час.
1	Чубик М.В, НИ ТПУ ИШНПТ, доцент	Руководитель	Осуществление детального планирования проекта, курирование выполняемых работ	88
2	Аймбетов К.М, НИ ТПУ, студент	Исполнитель-магистрант	Выполнение работ по проекту	1020
3	Криницына З.В., НИ ТПУ Отделение социально-гуманитарных наук, Доцент	Эксперт проекта	Курирование выполнения раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» в магистерской диссертации	2
4	Романова Светлана Владимировна, НИ ТПУ, старший преподаватель	Эксперт проекта	Курирование выполнения раздела «Социальная ответственность» в магистерской диссертации	2
5	Аксенова Наталия Валерьевна	Эксперт проекта	Курирование выполнения раздела на иностранном языке	2

5.2.3 Ограничения и допущения проекта

К ограничениям проекта относят факторы, служащие ограничением степени свободы участников команды проекта, а так же временные границы и параметры проекта или конечного продукта, которые не подлежат реализации в рамках данного проекта.

Таблица 5.2.3.1- Ограничения проекта

Фактор	Ограничения/ допущения
1. Сроки проекта:	
1.1. Дата утверждения плана управления проектом	1.10.17
1.2. Дата завершения проекта	30.05.19
2. Прочие ограничения и допущения	ограничения по времени использования научного оборудования

5.3 Планирование управления научно-техническим проектом

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 5.3.1.1 представлена иерархическая структура работ по данному проекту.

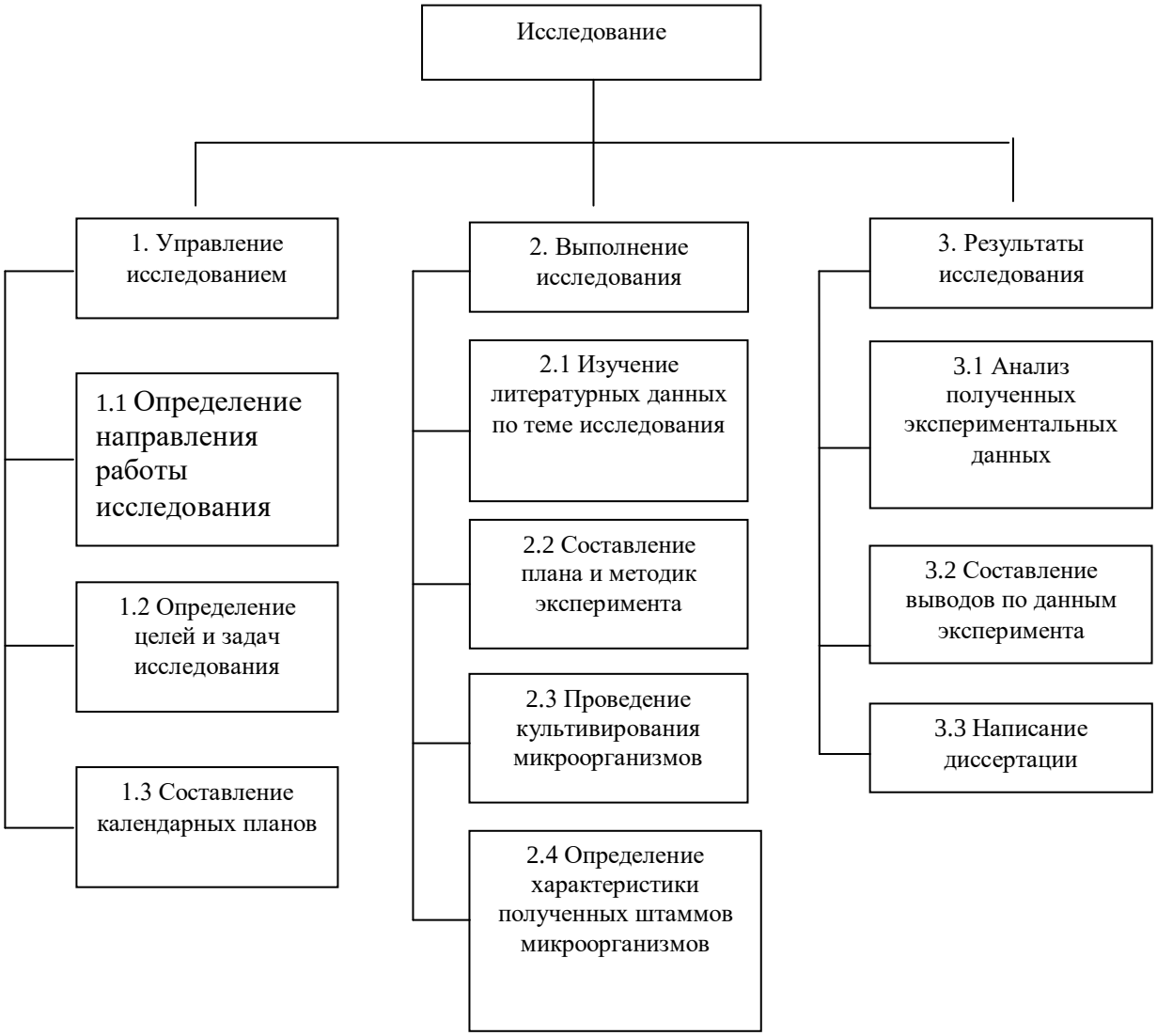

Рисунок 5.3.1.1 - Иерархическая структура работ по проекту

5.3.2. Контрольные события проекта

В данном разделе представлена информация о ключевых событиях, включая их даты и результаты, которые должны быть получены по состоянию на эти даты, как показано в Таблице 5.3.2.1

Таблица 5.3.2.1 – Контрольные события проекта.

п/п	Контрольное событие	Дата	Результат (подтверждающий документ)
1.	Защита научно-исследовательской работы студента	24.12.2018	Получение отметки в зачетной книжке
2.	Защита преддипломной практики	31.05.2019	Получение отметки в зачетной книжке
3.	Предзащита ВКР	6.06.2019	-
4.	Защита ВКР	14.06.2019	Получение диплома

5.3.3. План проекта

Процесс планирования данного научного проекта включает определение видов работы, исполнителей и требуемое время для достижения запланированного результата проекта. При планировании проекта необходимо построить календарный график и диаграмму Ганта в качестве способа визуализации календарного плана. Линейный график представляется в виде таблицы (табл. 5.3.3.1).

Таблица 5.3.3.1 - Календарный план проекта

Код работы (из ИСР)	Название	Длительность, дни	Дата начала работ	Дата окончания работ	Состав участников (ФИО)
1.1	Определение направления работы исследования	5	3.09.18	8.09.18	Чубик М.В., Аймбетов К.М
1.2	Определение целей и задач исследования	5	8.09.18	13.09.18	Чубик М.В., Аймбетов К.М
1.3	Составление календарных планов	1	13.09.18	14.09.18	Чубик М.В., Аймбетов К.М
2.1	Изучение литературных данных по теме исследования	7	15.09.18	22.09.18	Аймбетов К.М
2.2	Составление плана и методик эксперимента	14	22.09.18	6.10.18	Чубик М.В., Аймбетов К.М
2.3	Проведение культивирования микроорганизмов	90	6.10.18	4.01.19	Аймбетов К.М

2.4	Определение характеристики полученных штаммов микроорганизмов	50	4.01.19	23.02.19	Аймбетов К.М
3.1	Анализ полученных экспериментальных данных	30	23.02.19	25.03.19	Чубик М.В., Аймбетов К.М
3.2	Составление выводов по данным эксперимента	10	25.03.19	4.04.19	Чубик М.В., Аймбетов К.М
3.3	Написание диссертации	57	4.04.19	31.05.19	Аймбетов К.М
Итого:		269	3.09.19	31.05.19	

В таблице 5.3.3.2 строится календарный план-график проведения НИОКР по теме на основе информации, представленной в таблице 5.3.3.1. График строится для максимального по длительности исполнения работ в рамках научно-исследовательского проекта с разбивкой по месяцам и декадам (10 дней) за период времени дипломирования. При этом работы на графике следует выделить разной заливкой в зависимости от исполнителей, ответственных за ту или иную работу. С помощью графика можно проследить выполнение работ, отклонение от сроков и определить исполнителей.

Таблица 5.3.3.2 - Календарный план-график проведения проекта по теме «Определение и изучение микробиоты кишечника патицентов с болезнью Паркинсона»

Вид работ	испольнители	$T_к$, дни	Продолжительность выполнения работ								
			сен	окт	ноя	дек	янв	фев	мар	апр	май
Определение направления работы исследования	Руководитель, магистрант	5									
Определение целей и задач исследования	Руководитель, магистрант	5									
Составление календарных планов	Руководитель, магистрант	1									
Изучение литературных данных по теме	Магистрант	7									

исследования			
Составление плана и методик эксперимента	Руководитель, магистрант	14	
Проведение культивирования микроорганизмов	Магистрант	90	
Определение характеристики полученных штаммов микроорганизмов	Магистрант	50	
Анализ полученных экспериментальных данных	Магистрант, Руководитель	30	
Составление выводов по данным эксперимента	Магистрант, Руководитель	10	
Написание диссертации	Магистрант	57	

- руководитель - магистрант

Ниже представлен сетевой график (рис. 4), который является графическим отображением комплекса работ по теме с установленными между ними взаимосвязями. Его составление основано на методе критического пути, который представляет собой полный путь, имеющий наибольшую продолжительность. Метод критического пути дает возможность варьировать сроками выполнения работ, не лежащими на критическом пути. В таблице 5.3.3.3 представлены параметры сетевого графика.

Таблица 5.3.3.3 – Параметры сетевого графика.

Название работы	**№ раб.**	$T_{кал}$	$t_{рн}$	$t_{ро}$	$t_{пн}$	$t_{по}$	$R_{п}$	$R_{с}$
Определение направления работы исследования	1	5	0	5	0	5	0	0
Определение целей и задач исследования	2	5	5	10	5	10	0	0
Составление календарных планов	3	1	10	11	10	11	0	0
Изучение литературных данных по теме исследования	4	7	11	18	11	18	0	0
Составление плана и методик	5	14	18	32	18	32	0	0

эксперимента								
Проведение культивирования микроорганизмов	6	90	32	122	32	122	0	0
Определение характеристики полученных штаммов микроорганизмов	7	50	122	172	122	172	0	0
Анализ полученных экспериментальных данных	8	30	172	202	172	202	0	0
Составление выводов по данным эксперимента	9	10	202	212	202	212	0	0
Написание диссертации	10	57	212	269	212	269	0	0
		269						
Резерв времени полного пути $R(L_п)$ 0								
Критический путь $T_{кр}$ 269								

Прямой проход по сети

1. Раннее начало каждой работы:

$$t_{рн}(j) = \max[t_{рн}(i) + T(i)] \quad (2)$$

где $t_{рн}(j)$ – раннее начало последующей работы;

$t_{рн}(i)$ – раннее начало предшествующей работы;

$T(i)$ – продолжительность выполнения i-ой работы в календарных.

2. Раннее окончание каждой работы:

$$t_{ро}(i) = t_{рн}(i) + T(i)] \quad (3)$$

Обратный проход по сети

1. Позднее начало каждой работы можно определить, двигаясь по графику справа налево.

$$t_{пн}(i) = \min t_{пн}(j) - T(i) \quad (4)$$

где $t_{пн}(i)$ – позднее начало i-ой работы;

min $t_{пн}(j)$ –- минимальная величина позднего начала j-ой работы;

$T(i)$ – продолжительность выполнения i-ой работы в календарных днях.

2. Позднее окончание работы рассчитывается с учетом точки «схождения» нескольких работ по следующей формуле:

$$t_{по}(i) = \min t_{пн}(j) \quad (5)$$

где $t_{по}(i)$ – позднее окончание i-ой работы;

min $t_{пн}(j)$ – минимальная величина позднего начала работ, приходящихся на точку «схождения» i-ой работе.

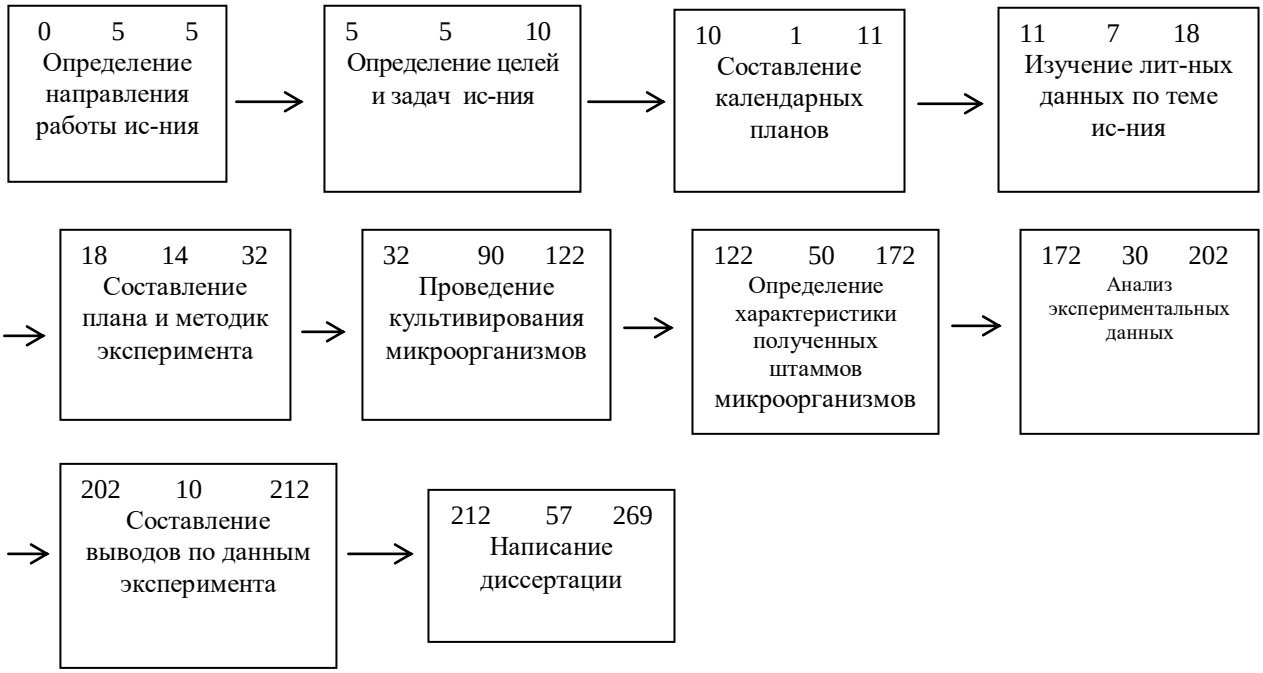

Рисунок 5.3.3 Сетевой план-график выполнения НИР

5.3.4 Бюджет научного исследования

При планировании бюджета научного исследования необходимо обеспечить полное и достоверное отражение всех видов необходимых для его выполнения планируемых расходов (таблица 5.3.4.1).

Таблица 5.3.4.1 – Группировка затрат по статьям в руб.

Сырье, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты	Специальное оборудование для научных работ	Основная заработная плата	Дополнительная заработная плата	Отчисления на социальные нужды	Накладные расходы	Итого плановая себестоимость
44982	66909,44	475296,3	68715,89	44002,14	146132,6	846038,4

Сырьё, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты

В таблице 5.3.4.2 перечислены материалы, необходимые для данного исследования, которые используются при культивировании микроорганизмов для получения накопительной культуры и последующего выделения ДНК.

Таблица 5.3.4.2 — Материальные затраты на получение накопительных культур и выделения их геномной ДНК.

Наименование	Ед-ца измерения	Количество	Цена за ед-цу, руб.	Затраты на материалы, руб
D-глюкоза	кг	0,2 кг	5334	1066,8
Галактоза	г	100 г	11,87	1187
Глицерин	мл	200 мл	49,62	9924
Овсяная мука	г	100 г	0,134	13,4
K_2SO_4	г	100 г	15,15	1515
$MgCl_2$	г	20 г	122,14	2442,8
NaCl	г	50 г	96,38	4819
дрожжевой экстракт	г	200 г	25,49	5098
Пептон	г	200 г	41,79	8358
Триптон	г	200 г	42,08	8416
Всего за материалы				42840
Транспортно-заготовительные расходы (3-5%)				2142
Итого по статье $C_м$				44982

Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ

Затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, устройств и механизмов), необходимого для проведения работ по теме представлено таблице 5.3.4.3.

Таблица 5.3.4.3 — Расчёт бюджета затрат на приобретение спецоборудования для научных работ.

Наименование оборудования	Кол-во единиц оборудования, шт.	Цена единицы оборудования, руб.	Срок службы оборудования, год	АО за период проведе-ния НИР, руб.	Общая стоимость, руб.
Термостат-инкубатор	1	93340	10	7642,6	7642,6
Ламинарный шкаф	1	310000	10	25382,54	25382,54
Аналитические весы Ohaus Adventurer	1	68000	10	5567,78	5567,78
Автоклав Tuttnauer	1	234833	10	19227,93	19227,93

Шейкер PST – 60HL	1	36000	10	2947,65	2947,65
Холодильник Beko	1	75000	10	6140,94	6140,94
Итого					66909,44

Расчёт амортизационных отчислений осуществляется по формуле:

$$E_{ам} = \frac{\sum K_{обi} \cdot H_{обi} \cdot T_{обi}}{365 \cdot 100} \quad (6)$$

где $K_{обi}$ — стоимость ед. прибора или оборудования, руб.;

$H_{амi}$ — норма амортизации прибора или оборудования, %;

$T_{обi}$ — время использования оборудования, дни.

Основная заработная плата

В этом разделе перечислена основная заработная плата (включая премии и доплаты) для работников, которые непосредственно участвуют в проекте исследования по данной теме, а также дополнительная заработная плата. Величина расходов в этой части определяется с учетом трудоемкости выполняемых работ и действующей системы оплаты труда.

Таблица 5.3.4.4 - Расчет основной заработной платы

№ п/п	Наименование этапов	Исполнители по категориям	Трудо-емкость, чел.-дн.	Заработная плата, приходящаяся на один чел.-дн., руб.	Всего заработная плата по тарифу (окладам), руб.
1.	Определение направления работы исследования	Руководитель, магистрант	5	2719,94 1939,5	13599,7 9697,5
2.	Определение целей и задач исследования	Руководитель, магистрант	5	2719,94 1939,5	13599,7 9697,5
3.	Составление календарных планов	Руководитель, магистрант	1	2719,94 1939,5	2719,94 1939,5
4.	Изучение литературных данных по теме исследования	Магистрант	7	1939,5	13577.9
5.	Составление плана и методик эксперимента	Руководитель, магистрант	14	2719,94 1939,5	38079,16 27155,8

6.	культивирования микроорганизмов	Магистрант	90	1939,5	174555
7	Определение характеристики полученных штаммов микроорганизмов	Магистрант	50	1939,5	96975
8	Анализ экспериментальных данных и составление выводов по данным эксперимента	Магистрант	45	1939,5	87277,5
Итого					475296,3

Основная заработная плата ($З_{осн}$) руководителя от ТПУ рассчитывается по следующей формуле:

$$З_{осн} = З_{дн} \cdot T_{раб}, \quad (7)$$

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

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

$З_{дн}$ – среднедневная заработная плата работника, руб.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$З_{дн} = \frac{З_м \cdot М}{F_д}, \quad (8)$$

где $З_м$ – месячный должностной оклад работника, руб.;

М – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

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

$F_д$ – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн.

Таблица 5.3.4.5 — Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Инженер
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней		
- выходные дни	44	48
- праздничные дни	14	14
Потери рабочего времени		
- отпуск	56	28
- невыходы по болезни	0	0

Действительный годовой фонд рабочего времени	251	275

Месячный должностной оклад работника:

$$З_м = З_б \cdot (k_{пр} + k_д) \cdot k_р , \quad (9)$$

где $З_б$ – базовый оклад, руб.;

$k_{пр}$ – премиальный коэффициент , равный 0,3;

$k_д$ – 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);

$k_р$ – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Таблица 5.3.4.6 - Расчёт основной заработной платы

Исполнители	$З_б$, руб.	$k_{пр}$	$k_д$	$k_р$	$З_м$, руб	$З_{дн}$, руб.	$Т_р$, раб. дн.	$З_{осн}$, руб.
Руководитель	33664	0,3	0,2	1,3	65644,8	2719,94	53,3	144972,8
Инженер	26300	0,3	0,2	1,3	51285	1939,5	220,5	427659,7

Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала

Расчет дополнительной заработной платы ведется по следующей формуле:

$$З_{доп} = k_{доп} \cdot З_{осн} , \quad (10)$$

где $k_{доп}$ – коэффициент дополнительной заработной платы (примем 0,12).

Таблица 5.3.4.7 - Заработная плата исполнителей НТИ

Заработная плата	**Руководитель**	**Инженер**
Основная зарплата	144972,8	427659,7
Дополнительная зарплата	17396,73	51319,16
Итого по статье $С_{доп}$	68715,89	

Отчисления на социальные нужды

В этом разделе показан расчёт величины отчислений во внебюджетные

фонды, который определяется следующей формулой:

$$З_{внеб} = k_{внеб} \cdot (З_{осн} + З_{доп}), \quad (11)$$

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

Основываясь на пункте 1 ст.58 Федерального закона от 24.07.2009 №212-ФЗ, для учреждений, осуществляющих образовательную и научную деятельность, коэффициент отчислений на оплату во внебюджетные фонды составляет 0,271. Таким образом, величина $З_{внеб}$ рассчитана по расчёту : 0,271 * (144972,8 + 17396,73) и составила 44002,14 руб.

Накладные расходы

К накладным расходам относятся затраты на управление и хозяйственное обслуживание, а так же расходы по содержанию, эксплуатации и ремонту оборудования, производственного инструмента и инвентаря, зданий, сооружений и др.

Величина накладных расходов определяется по следующей формуле :

$$С_{накл} = k_{накл} * (З_{осн} + З_{доп}), \quad (12)$$

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

Коэффициент накладных расходов принимается равным 0,9. Таким образом, величина $С_{накл}$ рассчитана по расчёту : 0,9 * (144972,8 + 17396,73) и составила 146132,6руб.

5.3.5 Организационная структура проекта

В практике используется несколько базовых вариантов организационных структур: функциональная, проектная, матричная. Поскольку степень неопределённости условий реализации текущего проекта и его сложность являются высокими и в связи с новизной предлагаемой технологии данное исследование имеет проектную организационную структуру.

Рисунок 5.3.5.1 — Проектная структура проекта

5.3.6 Матрица ответственности

Для распределения ответственности между участниками проекта формируется матрица ответственности

Таблица 5.3.6.1 — Матрица ответственности

Этапы проекта	Руководитель	Магистрант	Консультант «Финансовый менеджмент»	Консультант «Социальная ответственность»	Консультант «Английский язык «
Определение направления, целей и задач работы исследования	И,У	И			
Составление календарных планов	У	И,О			
Изучение литературных данных по теме исследования	У,С	И			
Составление плана и методик эксперимента	У,С	И			
Проведение культивирования микроорганизмов	У	И			
Определение характеристики полученных штаммов микроорганизмов	У	И			
Анализ полученных экспериментальных данных	У	И			
Написание диссертации	У	И,О	У	У	У

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 утверждении 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 Реестр рисков проекта

Идентифицированные риски проекта включают в себя возможные неопределённые события, которые могут возникнуть в проекте и привести к нежелательным последствиям.

Таблица 5.3.7.1 — Реестр возможных рисков проекта

Риск	Потенциальное воздействие	Вероят-ность Наступ-ления (1-5)	Влияние риска (1-5)	Уровень риска	Способы смягчения риска
Отсутствие роста бактерии	Неспособность получить пигмент	3	5	высокий	Оптимизация способа и условия культивирования
Загрязнение при культивировании микоорганизмов	Снижение уровня выхода продукта	3	5	средний	Строгий контроль загрязнения в процессе культивирования
Отсутствие финансовой поддержки следующего этапа работ	Невозможность выполнение отдельных работ	3	4	средний	Тщательное планирование бюджета исследования

5.4 Оценка сравнительной эффективности исследования

Определение эффективности данного проекта основано на расчёте интегрального показателя эффективности научного исследования. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин:

финансовой эффективности и ресурсоэффективности.

Получение интегрального показателя финансовой эффективности научного исследования основано на сравнении бюджета затрат нескольких вариантов исполнения научного исследования. Для определении этого показатели, наибольший интегральный показатель реализации технической задачи принимается за базу расчёта (как знаменатель), с которым соотносится финансовые значения по всем вариантам исполнения.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется по следующей формуле :

$$I_{\phi}^{p} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}}, \qquad (13)$$

где I_{ϕ}^{p} - интегральный финансовый показатель разработки; Φ_{pi} – стоимость i-го варианта исполнения; Φ_{max} – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т.ч. аналоги).

Величина интегрального финансового показателя рассчитана следующим образом:

$$I_{\Phi}^{p} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}} = \frac{846038{,}4}{10000000} = 0{,}084 \quad ; \quad I_{\Phi}^{a1} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}} = \frac{3000000}{10000000} = 0{,}3$$

$$I_{\Phi}^{a2} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}} = \frac{10000000}{10000000} = 1$$

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

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования определяется по следующей формуле:

$$I_{m}^{a} = \sum_{i=1}^{n} a_i b_i^{a} \quad , \quad I_{m}^{p} = \sum_{i=1}^{n} a_i b_i^{p} \qquad (14)$$

где I_m – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов; a_i –

весовой коэффициент i-го параметра; b_i^a , b_i^p – бальная оценка i-го параметра для аналога и разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания; n – число параметров сравнения.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности представлен в таблице 5.4.1.

Таблица 5.4.1 - Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Критерии \ ПО	Весовой коэффициент параметра	Текущий проект	Аналог 1	Аналог 2
1. Экологичность	0,1	5	3	3
2. Отсутствие отходов	0,2	5	3	5
3. Безопасность для персонала	0,1	5	5	4
4. Эффективность	0,1	4	3	4
5. Простота технологии получения	0,2	5	4	2
6. Доступность	0,1	4	5	4
7. Комплексное действие	0,2	4	5	3
ИТОГО	1	33	28	27

I_m^p=5×0,1+5×0,2+5×0,1+4×0,1+5×0,2+4×0,1+4×0,2=4,6
I_1^a=3×0,1+3×0,2+5×0,1+3×0,1+4×0,2+5×0,1+5×0,2=4,0
I_2^a=3×0,1+5×0,2+4×0,1+4×0,1+2×0,2+4×0,1+3×0,2=3,5

Интегральный показатель эффективности разработки ($I_{финр}^p$) и аналога ($I_{финр}^a$) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{финр}^p = \frac{I_m^p}{I_ф^p} \quad (15) \quad , \quad I_{финр}^a = \frac{I_m^a}{I_ф^a} \quad (16)$$

$$I_{финр}^p = \frac{4,6}{0,084} = 54,76 \quad , \quad I_{финр}^{a1} = \frac{4,0}{0,3} = 13,3 \quad , \quad I_{финр}^{a2} = \frac{3,5}{1} = 3,5$$

Сравнение интегрального показателя эффективности текущего проекта и аналогов позволит определить сравнительную эффективность проекта. Расчёт сравнительной эффективности проекта проведён по формуле :

$$Э_{ср} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финр}^a}, \quad (17)$$

где $Э_{ср}$ – сравнительная эффективность проекта; $I_{mэ}^p$ – интегральный показатель

разработки; $I^{a}_{mэ}$ – интегральный технико-экономический показатель аналога. Ниже представлены расчеты для сравнительной эффективности проекта.

$$Э_{ср} = \frac{54,76}{13,3} = 4,11 \qquad Э_{ср} = \frac{54,76}{3,5} = 15,64$$

,

Таблица 5.4.2 - Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Разработка	Аналог 1	Аналог 2
1	Интегральный финансовый показатель разработки	0,073	0,3	1
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	4.6	4,0	3,5
3	Интегральный показатель эффективности	54,76	13,3	3,5
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения		4,11	15,64

Сравнение значений интегральных показателей эффективности разработки показало, что работы, выполняемые в данном проекте являются наиболее эффективными с позиции финансовой и ресурсной эффективности по сравнению с другими существующими аналогами.

Вывод: в результате проведения исследования по разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» определили показатели затрат научно-исследовательской работы. Бюджет затрат НТИ равный 846038,4 рублей. Основная часть которого приходится на приобретение оборудования и на зарплаты сотрудников.

6. Социальная ответственность

Введение

В данной работе были исследованы оптимальные составы питательной среды. А также проводились получения штаммов бактерии *S.marcescens* и определения их характеристик, чтобы в дальнейшем использовать их для производственных целей таких как маркировка нефтепродуктов, краситель для полимеров. Процесс культивирования микроорганизмов и определения их

характеристики проводились в лаборатории биотехнологии научно-образовательном центре Н.М.Кижнера.

Энтеробактерии часто выращивают на сложных средах, минимальные пищевые потребности этих микроорганизмов, как правило, весьма просты. *S.marcescens,* как и большинство прототрофов может расти на простых питательных средах, содержащих лишь одно вещество в качестве источника углерода и энергии, а также несколько неорганических солей. В литературе для получения пигмента *S.marcescens* предложены разнообразные среды.

6.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности

6.1.1 Специальные (характерные для проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства

Работа в лаборатории заключается в культивировании микроорганизмов, которые требуют персонально работать с потенциально вредными микроорганизмами,растворителями.

Виды компенсаций, предусмотренные российским законодательством работникам, занятым на работах с вредными и (или) опасными условиями труда [48,57,58]:

1.Сокращенная продолжительность рабочего времени, устанавливаемая для работников, занятых на работах с вредными и (или) опасными условиями труда.

2.Ежегодные дополнительные отпуска, которые устанавливаются работникам, занятым на работах с вредными и (или) опасными условиями труда.

3.Оплата труда работников в повышенном размере, занятых на тяжелых работах, работах с вредными и (или) опасными и иными особыми условиями труда.

4. Молоко или другие равноценные пищевые продукты, выдаваемые работникам, занятым на работах с вредными и (или) опасными условиями труда бесплатно по установленным нормам.

5. Лечебно-профилактическое питание для работников, занятых на работах с вредными и (или) опасными условиями труда бесплатно по установленным нормам.

6. Досрочное назначение трудовой пенсии для работников, занятых на работах с вредными и (или) опасными условиями труда, на работах в особых условиях труда.

6.1.2 Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны

Эргономическое проектирование рабочих пространств и рабочих мест производится для конкретных рабочих задач и видов деятельности с учетом антропометрических, биомеханических, психофизиологических и психических возможностей и особенностей работающих людей [59].

Рабочее место для данной работы является лабораторией микробиологии. Работа в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения правило безопасности.

Оно должно создать наилучшие условия для:

– размещения работающего человека с учетом рабочих движений и перемещений в соответствии с требованиями технологического процесса;

– выполнение основных и вспомогательных операций в удобном рабочем положении, соответствующем специфике трудового процесса, и с применением наиболее эффективных приемов труда;

– расположение средств управления в пределах оптимальных границ пространства перемещений человека;

– сохранения оптимального обзора источников визуальной информации при смене рабочей позы и рабочего положения;

– свободного доступа к местам профилактических осмотров, ремонта и наладки, удобства их выполнения;

– рационального размещения оборудования, безопасности рабочих.

Правильное расположение и компоновка рабочего места, обеспечение удобной позы и свободы трудовых движений, использование оборудования, отвечающего требованиям эргономики и инженерной психологии, обеспечивают наиболее эффективный трудовой процесс, уменьшают и предотвращают опасность возникновения профессиональных заболеваний.

Неправильное положение тела на рабочем месте приводит к быстрому возникновению статической усталости, снижению качества и скорости выполняемой работы, а также снижению реакции на опасности.

В результате анализа условий труда при работе в химической лаборатории можно сделать вывод, что выполнение научно-исследовательской работы требует четкого соблюдения правил техники безопасности.

6.2 Профессиональная социальная безопасность

Обеспечение безопасности жизни и здоровья работников в процессе трудовой деятельности является одним из национальных приоритетов в целях сохранения человеческого капитала.

Производственная безопасность определяется как комплекс мероприятий по обеспечению безопасности в случае возникновения опасных факторов и включает в себя электробезопасность, безопасную эксплуатацию оборудования, безопасное протекание технологических процессов. Согласно ГОСТ 12.0.003–2015 приведена классификация вредных и опасных факторов, выявленные в ходе выполнения работ по методикам [38]. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 6.2.1 – вредные и опасные факторы

Факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Этапы работ			Нормативные документы
	Разработка	Изготовление	Эксплуатация	
1.Отклонение	+	+		- СанПиН 2.2.4.548–96.

показателей микроклимата				Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений [39]; - ГОСТ 12.1.003-2014 ССБТ. Шум. Общие требования безопасности [40]; - СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещённому освещению жилых и общественных зданий [41]; - ГН 2.2.5.686-98 Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны [42] - ГОСТ Р 55710-2013 Освещение рабочих мест внутри зданий. Нормы и методы измерений [50].
2. Превышение уровня шума		+		
3.Недостаточная освещенность рабочей зоны	+	+		
4. Вредные химические вещества		+		
5. Опасность поражения электрическим током		+		- ГОСТ Р 12.1.019-2009. ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты [56]; - ГОСТ 12.1.008-76. «ССБТ. Биологическая безопасность. Общие требования» . -10 марта. -1976 г. -№ 578[60].
6. Работа с бактериями		+		

6.2.1 Анализ вредных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению

6.2.1.1 Отклонение показателей микроклимата

Метеорологические условия производственной среды зависят от состояния воздушной среды и характеризуются:

- температурой;

- влажностью и скоростью движения воздуха;

- тепловым излучением нагретых поверхностей оборудования и обрабатываемых материалов и изделий.

Совокупность этих факторов, характерных для данного производственного участка, называется производственным микроклиматом.

Эти параметры воздушной среды определяют теплообмен организма, и оказывают существенное влияние на функциональное состояние различных систем организма, самочувствие, работоспособность и здоровье. Кроме того, нарушение теплообмена (охлаждение или перегрев) усугубляет действие на человека вредных веществ, вибрации и других факторов. Поэтому возникает необходимость нормирования микроклимата и разработки гигиенических требований к мероприятиям, направленным на профилактику перегрева и переохлаждения организма, и сохранение высокого уровня работоспособности и здоровья человека .

Метеорологические условия для рабочей зоны производственных помещений регламентируются санитарными правилами и нормами. В зависимости от характера производственных помещений, времени года, и категории выполняемой работы этот документ устанавливает оптимальные и допустимые микроклиматические условия.

В таблице 2 представлены оптимальные величины показателей микроклимата на рабочих местах [39].

Таблица 6.2.1.1.1 – Допустимые нормы показателей микроклимата

Период года	Температура воздуха, °С	Температура поверхностей, °С	Относительная влажность воздуха, %	Скорость движения воздуха, м/с
	Оптимальные показатели			
Холодный	21-23	20-24	60-40	0,1
Тёплый	22-24	21-25	60-40	0,1
	Допустимые показатели (ниже оптимальных)			
Холодный	19	18	15	0,1
Тёплый	20	19	15	0,1
	Допустимые показатели (выше оптимальных)			
Холодный	24	25	75	0,2
Тёплый	28	29	75	0,3

Оптимальные или допустимые нормы микроклимата в рабочей зоне в теплое время года могут быть обеспечены при помощи вентиляции или кондиционированием, а в холодное время года дополнительными отопительными элементами (калориферы, нагреватели).

6.2.1.2 Повышенный уровень шума

Измерение шума проводят с целью оценки его на рабочих местах или рабочих зонах для сопоставления с требованиями санитарных норм, а также для оценки шумовых характеристик оборудования, с целью разработки мероприятий по борьбе с шумом. Для оценки шума применяют частотный спектр измеренного уровня звукового давления, который выражается в децибелах в активных полосах частот, сравниваемый в дальнейшем с предельным спектром.

В лаборатории используется система вентиляции, ламинарный шкаф, шейкер, которые являются источником шума. Уровни шума не должны превышать значений установленных в [40] и проводится не реже двух раз в год.

По ГОСТ 12.1.003-2014 нормируются параметры шума и составляют 80 дБ [40].

По уровню шума, локальной и общей вибрации инфра и ультра звука данная лаборатория с вышеперечисленным оборудованием относится к

допустимому классу, ПДУ <25 дБ, что соответствует требования безопасного нахождения в лаборатории установленного в этом стандарте. Измерение уровня звукового давления осуществляется шумомером [47].

6.2.1.3 Недостаточная освещенность рабочей зоны

Недостаточная освещенность рабочего места ускоряет наступление усталости, снижает внимательность, значительно снижает производительность труда, в некоторых случаях может привести к головным болям или даже травмам. Необходимый уровень освещенности регламентируется согласно СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278-03 [41].

Таблица 6.2.1.3.1 — Освещенность рабочих помещений.

Наименование помещения, зрительной работы и вида деятельности	Минимальное значение освещенности, лк	Максимальное значение коэффициента пульсации, %
Помещения, в которых эксплуатируются ПК и оборудование с видеодисплеями	300	20
Постоянная ручная работа на производственных установках	300	20
Помещения для точных измерений, лаборатории	500	10

Средняя освещенность на рабочих местах с постоянным пребыванием людей должна составлять не менее 200 лк. Равномерность освещенности должна быть не менее 0,40 для зоны непосредственного окружения и 0,1 – для зоны периферии, освещенность поверхностей при указанной равномерности – не менее 50 лк на стенах и 30 лк на потолке.

Реальная освещённость помещений, измеренная при помощи люксметра, в лабораториях НОЦ Н.М.Кижнера составила 573 лк.

Для обеспечения соответствующих вышеприведенным нормам значений освещенности в лабораториях НОЦ Н.М.Кижнера проводится регулярная чистка светильников и оконных стекол (не реже двух раз в год), а так же своевременная замена вышедших из строя ламп.

6.2.1.4 Вредные химические вещества

Вредные вещества классифицируются в зависимости от типа и степени их влияния на здоровье (токсичность, канцерогенность) или от степени физической опасности, которую они несут (горючесть, воспламеняемость, экологическая опасность и др.). В результате постоянного контакта с токсическими химическими веществами риск приобретения работниками профессиональных заболеваний (токсические поражения органов дыхания, анемия, поражения нервной системы и пр.) очень велик. Нормирование химических веществ осуществляется при помощи предельно допустимых концентраций (ПДК) в воздухе рабочей зоны согласно ГН 2.2.5.686-98 [42] .

Вредные химические вещества должны храниться в лаборатории только в количествах, необходимых в течение дня. Основная масса химических веществ должна храниться в специально предназначенных комнатах или зданиях. Для защиты персонала при работе с вредными химическими веществами в лабораториях НОЦ Н.М.Кижнера предусмотрено использование как индивидуальных (перчатки, халаты, защитные очки, респираторы), так и коллективных (вытяжные шкафы) средств защиты. Кроме того, в лаборатории все работы с вредными химическими веществами должны выполняться в вытяжном шкафу.

6.2.1.5 Опасность поражения электрическим током

При проведении данного исследования были использованы некоторые электрические оборудования, такие как центрифуги, термостаты, автоклав, аналитические весы, спектрофотометр и гомогенизатор. Эти оборудования могут вызвать риск поражения электрическим током для операторов из-за увеличения напряженности электрического поля во время их работы.

Электробезопасность в лабораториях обеспечивается применением рекомендуемых стандартов, которые предусмотрены в ГОСТ IEC 61140-2012, ГОСТ 12.2.007.0-75 и ГОСТ Р 12.1.019-2009, где эти стандарты включают в себя конструкция электроприборов, средства защиты, а также проведение организационные и технические меры. Для выполнения требования электробезопасности, в лабораториях ЦНИЛ применяются зануление, защитное заземление, изоляцию токоведущих частей, защитное отключение, выравнивание потенциалов, защитные устройства и другие электрозащитные оборудования в соответствии с ГОСТ IEC 61140-2012 [54-56].

6.2.1.6 Работа с бактериями

Работа в данном исследования включает культивирования дикого штамма бактерий *Serratia marcescens*, поэтому она требует от исследователей работать непосредственно с потенциальными инфекционными бактериями. Для предотвращения прямого контакта культур бактерии с кожными покровами работников необходимо применять индивидуальные средства защиты, предусмотренные в ГОСТ 12.4.011 – 89, такие как халат, плотно охватывающими запястья, с длинными рукавами и закрытой передней частью, а также перчатки. Кроме того, для защиты волос от возможности контакта с источником микроорганизмов необходимо применять медицинские шапочки, а также можно использовать защитные маски при проведении экспериментов вне и внутри бокса микробиологической безопасности и периодической их менять каждые два часа [57,60].

6.2.2 Анализ опасных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению

6.2.2.1 Опасность поражения электрическим током

Насыщенность современных лабораторий электрооборудованием чрезвычайно велика. По степени электробезопасности помещения лаборатории относятся к категории помещении без повышенной опасности. Для этого типа

помещений устанавливается величина напряжений, не требующая специальных мер защиты – 220 В.

В ходе исследования применялось электрическое оборудование, такое как аналитические весы, центрифуги, шейкеры и термостаты. Электробезопасность в лаборатории обеспечивается принятием мер, предусмотренных ГОСТ IEC 61140-2012, ГОСТ 12.2.007.0-75 и ГОСТ Р 12.1.019-2009. К таким мерам относится конструкция электроприборов, средства защиты, проведение организационных и технических мероприятий. Для обеспечения электробезопасности в лабораториях НОЦ Н.М.Кижнера применяются защитное заземление, изоляция токоведущих частей, защитное отключение, выравнивание потенциалов, оградительные устройства и прочие электрозащитные средства согласно ГОСТ IEC 61140-2012 [43-45].

6.3 Экологическая безопасность

Основной опасностью при работе с бактериями является возможность контаминации окружающей среды. При этом существует опасность заражения почв, вод и воздуха, во избежание таких нежелательных эффектов следует соблюдать рекомендации, приведенные в таблице 4.

Таблица 6.3.1 – Влияние объекта и процесса исследования на окружающую среду

	Влияние объекта и процесса исследования	**Рекомендации по предотвращению воздействия**
Атмосфера	Бактериальные клетки могут разноситься по воздуху, либо попадать в организм через дыхательные пути при очень близком контакте или непосредственном вдыхании.	Работа исключительно в ламинаре, при включенной вентиляции, с соблюдением необходимой дистанции и при наличии

		специальной одежды.
Гидросфера	Попадание обезвреживающих агентов, а также непосредственно бактериальной культуры в канализацию.	Правильная утилизация биологических отходов, их обезвреживание путем стерилизации автоклавирования перед выбросом в систему канализации.
Литосфера	Бактериальное заражение почв при неправильной утилизации отходов.	Сбор и утилизация твердых лабораторных отходов в виде бытового мусора в соответствии с СанПиН 2.1.7.728-99.2.1.7.

6.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

6.4.1 Анализ вероятных ЧС, которые может инициировать объект исследования и которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследований

Чрезвычайной ситуацией в микробиологической лаборатории может стать контаминация воздуха патогенными микроорганизмами. Предупреждающие мероприятия приведены в ГОСТ Р 52905-2007 и включают в себя соблюдение стерильности, использование защитной одежды, герметичность помещений, в которых осуществляется работа с микроорганизмами [49].

При утечке микроорганизмов принимаются меры в соответствии с п.2.12 СП 1.3.3118-13. В лаборатории должен быть создан запас дезинфицирующих и лекарственных средств, активных в отношении микроорганизмов, с которыми

проводятся исследования [50]. При ликвидации аварии сначала проводят дезинфекцию помещения, затем обеззараживание при помощи разрешенных устройств по обеззараживанию и очистке воздуха, в том числе бактерицидных ламп. Все ликвидационные мероприятия проводятся при включенной вытяжной вентиляции. Сотрудники обязательно используют защитную одежду, которая по окончанию мероприятий по ликвидации аварии дезинфицируется [51].

Список использованных источников

1. Энтеробактерии. Руководство для врачей / под ред. акад. В.И. Покровского. - М.:Медицина, 1985. - 319с.

2. Определитель бактерий Берджи в 2-х томах / перевод с англ. под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снипа, Дж. Стейли, С. Уильямса // М.: Мир 1997, - Т.1, - 432с.

3. Grimont, P.A.D. Biotyping of Serratia marcescens and Its Use in Epidemiological Studies. *J. Clinical Microb.*, - 1978. - V.8. -N.l. - P.73-83.

4. Grimont, P.A.D. The genus Serratia *I* P.A.D. Grimont, F. Grimont //Annu. Rev. Microbiol. - 1978. - V.32. -P.221-248.

5. Казанская, Т.Б. Микробиология // Т.Б. Казанская, Р.П. Анохина. - 1974. - Т.43. - С.546-547.

6. Horng, Y.T. The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of iV-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens I* Y.T. Horng, S.C. Deng, M. Daykin, P.C. Soo, J.R. Wei, K.T. Luh, S.W. Ho, S. Swift, H.C. Lai, P. Williams *II* Moï. Microbiol.-2002.-V.45.-P.1655-1671.

7. Banat, I.M. Potential applications of microbial surfactants *I* I.M. Banat, R.S. Makkar, S.S. Cameotra *II* Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2000. -V.53.-P. 495-508.

8. Lannigan, R. Increased frequency of acceptance of plasmid deoxyribonucleic acid by a nonpigmented strain of *Serratia marcescens I*R. Lannigan, L.E. Bryan *II* Microbios Lett. - 1980. - V.13. - P.123 -127.

9. Trias, J. Induction of Yellow Pigmentation in Serratia marcescens *I* J. Trias, M. Vinas, J. Guinea, J. G. Loren *II* Apl.Enviroment.Microb, - 1988. - V.54. N.12. - P.3138-3141.

10. Wrede, F. Uber das prodigiosin, der rotten farbstoff dess Bacillus prodigiosus *I* F. Wrede, O. Hettche *II* J. Chem. Ber. - 1929. - V. 62. _P. 438-443.

11. Santer U. Prodigiosin synthesis in *Serratia marcescens:* isolation of a

pyrrolecontaining precursor *I* U. Santer, Y. Vogel *II* BBA. -1956. - V. 19. N.3. - P.578-579.

12. Wasserman, H.H. Studies related to the biosinthesis of prodigiosin in Serratia marcescens *I* H.H. Wasserman, Y.E. Mckeon, U.V. Santer *II* Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1960. - V.3. N.2. - P. 146-149.

13. Rapoport, H. The synthesis of Prodigiosin *I* H. Rapoport, K.Y. Holden *II* Proc. National. Acad. Sci. USA. - 1962. - V.84. N.20. -P.635-642.

14. Hubbard, R. The biosynthesis of Prodigiosin, the tripyrrylmethene pigment from *Bacillus prodigiosus (Serratia marcescens) I* R. Hubbard, C. Rimington *II* Biochem. - 1950. - V.46. N.2. - P. 220-225.

15. Williamson, N.R. The biosynthesis and regulation of bacterial prodigiosines *I* N.R. Williamson, P.C. Fineran, F.J. Leeper, G.P.C. Salmond *II* Nat. Rev. Microbiol. - 2006. - V.4. - P.887-899.

16. Феофилова, Е.П. Пигменты микроорганизмов / Е.П. Феофилова. - М.: Наука, 1974. - 218 с.

17. Егоров, Н.С. Практикум по микробиологии / Н.С. Егоров.-Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1976.-С.153-154.

18. Воробьева, Л.И. Промышленная микробиология // Л.И.Воробьева.-Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1989.-С.115-118.

19. Williams, R.P. Studies on pigmentation of *Serratia marcescens I* R.P.Williams,C.L.Gott, J.A.Green//J.Bacteriol. - 1961. -V.81. N. 3. -P.376-379.

20. Williams, R.P. Influence of temperature of incubation and type of growth medium on pigmentation in *Serratia marcescens I* R.P. Williams, C.L. Gott, S.M. Qadri *II* J.Bacteriol. - 1971. - V. 106. N. 2. - P. 438-443.

21. Katz, D.S. Detection of pigment precursors in white clinical strains of *Serratia marcescens* /D.S Katz, RJ. Sobleski *II* J. Cein. Microbiol. -1979. - V.9. N.2. - P. 301-303.

22. Трутко, СМ. Роль процесса биосинтеза продигиозина в регуляции окислительного обмена продуцента / СМ. Трутко, В.К. Акименко //

Микробиология. - 1989. - Т.58, №3. - С. 723-729.

23. Chang, S. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol *I* S Chang, M Sanada, O Johdo, S Ohta, Y Nagamatsu, A Yoshimoto *II* Biotech Lett. - 2000. - V.22. - P. 1761-1765

24. Giri, A. V. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil *I* A. V. Giri, N. Anandkumar, G. Muthukumaran, G. Pennathur *II* BMC Microbiol. -2004.-V.4.N1.-P.1-11.

25. King, E.O. Pseudomonas P Agar/King A Medium *I* O.E. King, M.K. Ward, D.E. Raney *II* J. Lab. And Clin Med. - 1954. - V.44. - P. 301-307.

26. Sole, M. The effect of pH on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens* *I* M. Sole, N. Plus, A. Francia et al. *II* Letters in Applied Microbiology. - 1994. - V.19. - P. 341-344.

27. Oiler, A.R. Media effects of sugars on pigmentation and antibiotic susceptibility in Serratia marcescens *I* A.R Oiler *II* J. Gen. Appl. Microbiol.-2006.- V. 52. N. 2. - P. 113-117.

28. Fuqua, C. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators *I* C. Fuqua, S.C. Winans, E.P. Greenberg *II* Annu. Rev. Microbiol. - 1996. - v.50. - P.727-751.

29. Thomson, N.R. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in Serratia is under quorum sensing control *I* N.R. Thomson, M. A. Crow, S J. McGowan, A. Cox, G.P.C. Salmond *II* Molecular Microbiology. - 2000. - V.36. N.3. - P.539-556.

30. Nassif, N. Bacteria quorum sensing in silica matrices *I* N.Nassif, C.Roux., T.Coradin et al// Materials Chemistry. - 2004. - V.14. -P.2264-2268.

31. Bunting, M.J. A description of some color variants produced by *Serratia marcescens* strain 274 *I* M.J. Bunting// J.Bacteriol.-1940. -V.40. N.2 - P.57-62.

32. Williams, R.P. Studies on pigmentation of *Serratia marcescens I*

R.P.Williams,C.L.Gott, J.A.Green//J.Bacteriol. - 1961. -V.81. N. 3. -P.376-379.

33. Reisner, G.S. Prodigiosin and the metabolism of free amino compounds in *Serratia marcescens* as a function of iron, marganese and aging *I* G.S.Reisner// J. Microbiol. - 1969. - V.15.-P.405- 408.

34. Williams, R.P. Influence of temperature of incubation and type of growth medium on pigmentation in *Serratia marcescens I* R.P. Williams, C.L. Gott, S.M. Qadri *II* J.Bacteriol. - 1971. - V. 106. N. 2. - P. 438-443.

35. Юсупова, Д.В. Питательная среда для выращивания *Serratia marcescens 24* — продуцента нуклеазы / Д.В. Юсупова, Р.Б. Соколова, З.А. Виестуре // Авторское свидетельство №992568, опубликовано 30.01.83. - Бюллетень №4.

36. Wei, J.H. Enhanced production of prodigiosin - like pigment from *Serratia marcescens* SM delta R by medium improvement and oil — supplementation strategies *I* J.H Wei, W.C. Chen *II* J. BiosciBioeng. - 2005. - V. 6.- P.616-622.

37. А.И.Нетрусов, М.А.Егорова, Л.М.Захарчук и др. Практикум по микробиологии // —М.: Издательский центр «Академия», 2005. – с.115-117.

38. ГОСТ 12.0.003-2015 «Опасные и вредные производственные факторы. Классификация.»

39. СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений

40. ГОСТ 12.1.003-2014 ССБТ. Шум. Общие требования безопасности.

41. СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещённому. освещению жилых и общественных зданий.

42. ГН 2.2.5.686-98. Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны. — М.: Минздрав России, 1998

43. ГОСТ IEC 61140-2012 Защита от поражения электрическим током. Общие положения безопасности установок и оборудования. — Межгосударственный стандарт, 01.07.2014

44. ГОСТ 12.2.007.0-75 ССБТ Изделия электротехнические. Общие требования безопасности. — Межгосударственный стандарт, 01.07.1978

45. ГОСТ Р 12.1.019-2009 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты. — Национальный стандарт Российской Федерации, 01.01.2011

46. СанПиН 2.1.7.728-99.2.1.7. Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы. Санитарная охрана почвы. Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений. Санитарные правила и нормы.

47. ГОСТ 17187-81. Шумомеры. Общие технические требования и методы испытаний.

48. ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.— Дата введения 01.07.2009.

49. Главный государственный санитарный врач Российской Федерации, Постановление от 28 ноября 2013 года № 64 Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». — Москва, 2014

50. ГОСТ Р 55710-2013 Освещение рабочих мест внутри зданий. Нормы и методы измерений.

51. ГОСТ 12.4.011-89 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Средства защиты работающих. Общие требования и классификация.

52. ГОСТ 12.3.002-75 ССБТ. Процессы производственные. Общие требования безопасности. — Межгосударственный стандарт, дата введения 01.07.1976

53. СП 2.2.2.1327-03 Гигиенические требования к организации технологических процессов, производственному оборудованию и рабочему инструменту. — М.: Минздрав России, 2003

54. ГОСТ IEC 61140-2012. «Защита от поражения электрическим током. Общие положения безопасности установок и оборудования». — Межгосударственный стандарт, 01.07.2014

55. ГОСТ 12.2.007.0-75. «ССБТ. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности». — Межгосударственный стандарт, 01.07.1978

56. ГОСТ Р 12.1.019-2009. «ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты». — Национальный стандарт Российской Федерации, 01.01.2011

57. ГОСТ 12.4.011 – 89. «ССБТ. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация» [Электронный ресурс].– Режим доступа: http://vsegost.com/Catalog/11/11167.shtml

58. ПНД Ф 12.13.1-03. Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения).

59. Р 2.2.2006-05. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда.

60. ГОСТ 12.1.008-76. «ССБТ. Биологическая безопасность. Общие требования» . -10 марта. -1976 г. -№ 578.

61. А.З.Гарейшина, Е.В. Петухова, Д.В. Юсупова, Н.А. Лебедев, Т.Н. Чертилина, А.З. Пономарева // Патент на изобретение RU № 2218381, C10L1/00, C10M159/02, C10N30:20, Приоритет от 22.07.02. - 2003. Бюл. №34.

62. Montaner, B. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in hematopoietic cancer cell lines *I* B. Montaner, S. Navarro, M. Pique, M. Viaseca, M. Martinell, E. Giralt *II* J. Pharmacol. -2000. - V.131.-P.585-593.

63. Llagostera, E. High cytotoxic sensitivity of the human small cell lung doxorubicin resistant carcinoma (GLC4/ADR) cell line to prodigiozin through apoptosis activation *I* E. Liagostera, V. Soto-Cerrato, R. Joshi, B. Montaner, R. Gimenez Bonafe, R. Perez-Tomas *II* Anticancer Drugs. - 2005. - V. 16. N.4. - P. 393-399.

64. Han, S.B. T-cell specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* / S.B. Han H.M. Kim, Y.H. Kim, C.W. Lee, E.S. Jang and K.H. Son *et al. II* Int J. Immunopharmacol. - 1998. - V. 20.-P.1-13.

65. Azuma, T. Induction of apoptosis of activated murine splenic T-cells by cycloprodigiosin hydrochloride, a novel immunosuppressant [Text] *I* T. Azuma, N. Watanabe, H. Jagisawa, M. Iwamura, J. Kobayashi *II* Immunopharmacology. - 2000. - V.46. N.l. - P. 29-37.

66. Diaz-Ruiz, C. Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1 *I* C Diaz-Ruiz, B. Montaner, R. Perez-Tomas *II* Histol. Histopathol. - 2001, - V. 16. -P.415^121.

67. Campas, C. Prodigiosin induces apoptosisof B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia *I* C. Campas, M. Dalmau, B. Montaner, M. Barragan, B. Bellosillo, D. Colomer, G. Pons, R. Perez-Tomas, J. Gil, *II* Leukemia. - 2003. - V.17. - P.746-750.

68. Perez-Tomas, R. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties *I* R. Perez-Tomas, B. Montaner, E. Llagostera, V. Soto-Cerrato *II* Biochem. Pharm. - 2003. - V.66. N.8. - P. 1447-1452.