

Школа Инженерная школа природных ресурсов  
 Направление подготовки 18.03.01 «Химическая технология»  
 Отделение школы (НОЦ) Отделение химической инженерии

### БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Тема работы
<b>Получение каллусной культуры <i>Alfredia cernua</i> методом <i>in vitro</i></b>

УДК 582.991.31:57.082.26

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2Д6Б	Андрюкова Дарья Геннадиевна		

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Чернова Анна Павловна	к.х.н., доцент		

### КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН	Якимова Татьяна Борисовна	к.э.н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ассистент ООД	Сечин Андрей Александрович	к.т.н.		

### ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Михеева Елена Валентиновна	к.х.н., доцент		

## ПЛАНИРУЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОБУЧЕНИЯ ПО ООП

Код результата	Результат обучения
<i><b>Профессиональные компетенции</b></i>	
Р1	Применять базовые и специальные, математические, естественнонаучные, социально-экономические и профессиональные знания в профессиональной деятельности
Р2	Применять знания в области современных химических технологий для решения производственных задач
Р3	Ставить и решать задачи производственного анализа, связанные с созданием и переработкой материалов с использованием моделирования объектов и процессов химической технологии
Р4	Разрабатывать новые технологические процессы, проектировать и использовать новое оборудование химической технологии, проектировать объекты химической технологии в контексте предприятия, общества и окружающей среды
Р5	Проводить теоретические и экспериментальные исследования в области современных химических технологий
Р6	Внедрять, эксплуатировать и обслуживать современное высокотехнологичное оборудование, обеспечивать его высокую эффективность, выводить на рынок новые материалы, соблюдать правила охраны здоровья и безопасности труда на химико-технологическом производстве, выполнять требования по защите окружающей среды
<i><b>Универсальные компетенции</b></i>	
Р7	Демонстрировать знания социальных, этических и культурных аспектов профессиональной деятельности

P8	Самостоятельно учиться и непрерывно повышать квалификацию в течение всего периода профессиональной деятельности
P9	Активно владеть иностранным языком на уровне, позволяющем разрабатывать документацию, презентовать результаты профессиональной деятельности
P10	Эффективно работать индивидуально и в коллективе, демонстрировать лидерство в инженерной деятельности и инженерном предпринимательстве, ответственность за результаты работы и готовность следовать корпоративной культуре организации

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

Школа Инженерная школа природных ресурсов  
 Направление подготовки (специальность) 18.03.01 «Химическая технология»  
 Уровень образования Бакалавриат  
 Отделение школы (НОЦ) Отделение химической инженерии  
 Период выполнения (осенний / весенний семестр 2019 /2020 учебного года)

Форма представления работы:

бакалаврская работа

(бакалаврская работа, дипломный проект/работа, магистерская диссертация)

**КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН  
выполнения выпускной квалификационной работы**

Срок сдачи студентом выполненной работы:	02.06.2020
--	------------

Дата контроля	Название раздела (модуля) / вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
19.02.2019	Обзор литературы	20
07.05.2019	Выполнение экспериментов	30
14.05.2019	Разработка раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»	10
17.05.2019	Обработка полученных данных	30
22.05.2019	Разработка раздела «Социальная ответственность»	10

**СОСТАВИЛ:**

**Руководитель ВКР**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Чернова Анна Павловна	к.х.н., доцент		

**СОГЛАСОВАНО:**

**Руководитель ООП**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Михеева Елена Валентиновна	к.х.н., доцент		

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

Школа Инженерная школа природных ресурсов  
 Направление подготовки (специальность) 18.03.01 «Химическая технология»  
 Отделение школы (НОЦ) Отделение химической инженерии

УТВЕРЖДАЮ:  
 Руководитель ООП

\_\_\_\_\_  
 (Подпись)      (Дата)      (Ф.И.О.)

**ЗАДАНИЕ**  
**на выполнение выпускной квалификационной работы**

В форме:

бакалаврской работы

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

Студенту:

Группа	ФИО
2Д6Б	Андрюковой Дарье Геннадиевне

Тема работы:

Получение каллусной культуры <i>Alfredia cernua</i> методом <i>in vitro</i>	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	02.03.2020, №62-47/С

Срок сдачи студентом выполненной работы:	02.06.2020
--	------------

**ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:**

<p><b>Исходные данные к работе</b></p> <p><i>(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.).</i></p>	<p>Объект исследования – семена растения <i>Alfredia cernua</i>.</p> <p>Получить каллусную культуру <i>Alfredia cernua</i></p> <p>Выбрать оптимальные условия для получения каллусной культуры <i>Alfredia cernua</i>.</p> <p>Получить каллусную культуру технологией <i>in vitro</i> на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга.</p>
---	---

<p><b>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</b></p> <p><i>(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).</i></p>	<p>Литературный обзор по тематике научно-исследовательской работы.</p> <p>Проведение комплекса экспериментов для достижения цели исследования.</p> <p>Анализ и обсуждение результатов проведенной работы.</p> <p>Анализ экономической эффективности и ресурсоэффективности проекта.</p> <p>Анализ рисков и опасностей проведения исследования и составления перечня нормативов для их регулирования.</p> <p>Формулировка выводов и заключений по работе.</p>
<p><b>Перечень графического материала</b></p>	<p>Таблицы, рисунки</p>

<p><b>Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы</b></p>	
<p><b>Раздел</b></p>	<p><b>Консультант</b></p>
<p>Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение</p>	<p>Якимова Татьяна Борисовна</p>
<p>Социальная ответственность</p>	<p>Сечин Андрей Александрович</p>
<p><b>Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:</b></p>	

<p><b>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</b></p>	<p>16.09.2019</p>
--	-------------------

**Задание выдал руководитель:**

<p>Должность</p>	<p>ФИО</p>	<p>Ученая степень, звание</p>	<p>Подпись</p>	<p>Дата</p>
<p>Доцент ОХИ</p>	<p>Чернова Анна Павловна</p>	<p>к.х.н., доцент</p>		

**Задание принял к исполнению студент:**

<p>Группа</p>	<p>ФИО</p>	<p>Подпись</p>	<p>Дата</p>
<p>2Д6Б</p>	<p>Андрюкова Дарья Геннадиевна</p>		

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА  
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И  
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

<b>Группа</b>	<b>ФИО</b>
2Д6Б	Андрюковой Дарье Геннадиевне

<b>Школа</b>	<b>ИШПР</b>	<b>Отделение</b>	<b>ОХИ</b>
<b>Уровень образования</b>	Бакалавриат	<b>Направление/специальность</b>	Химическая технология

<b>Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:</b>	
1. <i>Стоимость ресурсов исследования: материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих</i>	Стоимость выполняемых работ, материальных ресурсов, согласно применяемой техники и технологии, в соответствии с рыночными ценами. Оклады в соответствии с окладами сотрудников «НИ ТПУ»
2. <i>Нормы и нормативы расходования ресурсов</i>	- районный коэффициент- 1,3; - накладные расходы – 16%; - норма амортизации 20%.
3. <i>Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования</i>	Отчисления во внебюджетные фонды – 30,2 %

**Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:**

1. <i>Оценка коммерческого потенциала, перспективности и альтернатив проведения исследования с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения</i>	Проведение предпроектного анализа. Определение целевого рынка. Выполнение SWOT-анализа.
2. <i>Планирование и формирование бюджета проекта</i>	Разработка плана и бюджета проекта исследования
3. <i>Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования</i>	Расчет сравнительной эффективности проекта

**Перечень графического материала:**

1. Оценка конкурентоспособности технических решений
2. Матрица SWOT
3. Диаграмма Ганта
4. Бюджет проекта

<b>Дата выдачи задания для раздела по линейному графику</b>	10.04.2020
---	------------

**Задание выдал консультант:**

<b>Должность</b>	<b>ФИО</b>	<b>Ученая степень, звание</b>	<b>Подпись</b>	<b>Дата</b>
Доцент ОСГН	Якимова Т.Б.	К.Э.Н.		

**Задание принял к исполнению студент:**

<b>Группа</b>	<b>ФИО</b>	<b>Подпись</b>	<b>Дата</b>
2Д6Б	Андрюкова Дарья Геннадиевна		

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА  
«СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»**

Студенту:

<b>Группа</b>	<b>ФИО</b>
2Д6Б	Андрюковой Дарье Геннадиевне

<b>Школа</b>	<b>ИШПР</b>	<b>Отделение</b>	<b>ОХИ</b>
<b>Уровень образования</b>	Бакалавриат	<b>Направление/специальность</b>	Химическая технология

Тема ВКР:

<b>Получение каллусной культуры <i>Alfredia cernua</i> методом <i>in vitro</i></b>	
<b>Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:</b>	
1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	Объектом исследования является лекарственное растение <i>Alfredia cernua</i> . Рабочая зона – научно-исследовательская лаборатория ОХИ НИ ТПУ. Область применения результатов исследования – фармацевтическое производство.
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
<b>1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:</b> - специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; - организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.	- "Трудовой кодекс Российской Федерации" от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 01.04.2019) - ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности - СН 2.2.4/2.1.8.562 – 96 нормирует шум на рабочих местах. - Нормы СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278
<b>2. Производственная безопасность:</b> 2.1 Анализ выявленных вредных и опасных факторов 2.2 Обоснование мероприятий по снижению воздействия	2.1 Выявление вредных факторов: токсичные вещества, используемые в работе; отклонение показателей микроклимата; превышение допустимого уровня вибрации; опасность от электрооборудования. 2.2 Мероприятия по снижению воздействия: использование вытяжного шкафа и средств индивидуальной защиты; использование общего и местного освещения; ознакомление, соблюдение инструкции по электробезопасности и пожаробезопасности.

<p><b>3. Экологическая безопасность:</b></p> <p>-анализ воздействия объекта на атмосферу (выбросы);  -анализ воздействия объекта на гидросферу;  -анализ воздействия объекта на литосферу (отходы);  -разработать решения по обеспечению экологической безопасности со ссылками на НТД по охране окружающей среды.</p>	<p>Вредное воздействие преимущественно распространяется:</p> <p>- Для гидросферы представляют опасность жидкие органические, неорганические и биологические отходы,  - Основной угрозой для литосферы являются твердые отходы, содержащие биологический материал и опасные вещества.</p>
<p><b>4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:</b></p> <p>-перечень возможных ЧС при разработке и эксплуатации проектируемого решения;  -выбор наиболее типичной ЧС;  -разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий.</p> <p><b>4.</b></p>	<p>Потенциальными ЧС являются пожар, взрыв, а также загрязнение химическими веществами.</p> <p>Наиболее типичная ЧС – пожар, возникающий вследствие неисправности электрооборудования.</p>

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	15.04.2020
--	------------

**Задание выдал консультант:**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ассистент ООД	Сечин А.А.	к.т.н.		

**Задание принял к исполнению студент:**

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2Д6Б	Андрюкова Дарья Геннадиевна		

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа включает 90 страниц, 8 рисунков, 33 таблицы, 1 приложение, 59 источника литературы.

Работа представлена введением, 5 разделами и выводами, приведен список использованных источников.

Ключевые слова: каллусная культура, *Alfredia cernua*, технология *in vitro*, стерильное растение, стерилизация семян.

Объект исследования: семена лекарственного растения *Alfredia cernua*.  
Цель работы - получение каллусной культуры растения *Alfredia cernua* методом *in vitro*.

В ходе исследовательской работы проводилось определение оптимальных условий для получения сидлинга и каллусной культуры *Alfredia cernua* методом *in vitro*.

В результате исследования получено стерильное растение и каллусная культура растения *Alfredia cernua*. Определен наиболее эффективный метод стерилизации семян для получения сидлинга, подобран оптимальный гормональный состав питательной среды Мурасиге-скуга для получения каллусной культуры растения, выявлены условия термостатирования (температура, освещение) для эффективного прорастания семян и культивирования каллусной культуры *Alfredia cernua*.

Область применения: результаты возможно использовать в дальнейших исследованиях в обозначенной области, в том числе для разработки биотехнологических продуктов, а также лекарственных препаратов. Бакалаврская работа выполнена в Отделении химической инженерии НИ ТПУ.

Руководитель: к.х.н., доцент А.П. Чернова.

Выполнила: студент группы 2Д6Б Д.Г. Андрюкова.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	14
1 Обзор литературы.....	16
<u>1.1 Фармакогностическая характеристика растения .....</u>	<u>16</u>
1.1.1 Ботаническая классификация и описание растения .....	16
1.1.2 Ареал и места обитания .....	17
1.1.3 Химический состав растения. Характеристика биологически активных веществ, содержащихся в растении .....	18
1.1.4 Фармакологические свойства лекарственного растительного сырья растения <i>Alfredia cernua</i> .....	20
1.1.5 Применение препаратов растения в медицине .....	21
1.2 Культивирование изолированных клеток и тканей растений <i>in vitro</i> ....	22
1.2.1 Культура клеток, органов и тканей растений .....	22
1.2.2 Получение культуры клеток с использованием <i>in vitro</i> .....	23
1.3 Питательные среды. Влияние состава питательной среды на эффективность культивирования <i>in vitro</i> .....	24
1.3.1 Состав питательной среды.....	24
1.3.2 Неорганические компоненты.....	25
1.3.3 Органические компоненты и регуляторы роста .....	26
1.4 Методы, условия культивирования семян и каллусной культуры .....	28
1.4.1 Стратификация семян .....	28
1.4.2 Стерилизация эксплантов .....	29
<u>1.4.3 Влияние физических факторов на рост растительной ткани <i>in vitro</i></u>	<u>30</u>
2 Экспериментальная часть .....	31
2.1 Объект исследования .....	31

2.2	Методика стерилизации оборудования и правила работы при использовании технологии <i>in vitro</i> .....	32
2.3	Приготовление питательной среды и растворов .....	33
2.3.1	Приготовление питательной среды Мурасиге - Скуга .....	33
2.3.2	Приготовление раствора гормонов .....	36
2.3.3	Приготовление стерилизующих агентов .....	37
2.4	Методика стратификации семян <i>Alfredia cernua</i> .....	37
2.5	Методика посадки семян <i>Alfredia cernua</i> на питательную среду .....	38
4	Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение ...	39
4.1	Анализ конкурентных технических решений .....	39
4.2	SWOT-анализ .....	41
4.3	Планирование научно-исследовательских работ .....	45
4.3.1	Структура работ в рамках научного исследования .....	45
4.3.2	Определение трудоемкости выполнения работ .....	46
4.3.3	Разработка графика проведения научного исследования .....	47
4.4	Бюджет научно-технического исследования .....	47
4.4.1	Расчет материальных затрат НТИ .....	47
4.4.2	Расчет затрат на оборудование .....	49
4.4.3	Расчет основной заработной платы .....	50
4.4.4	Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления) .....	52
4.4.5	Накладные расходы .....	53
4.4.6	Формирование бюджета затрат НТИ .....	53
4.5	Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования .....	54
5	Социальная ответственность .....	57

__5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности .....	57
__5.2 Производственная безопасность.....	59
__5.3 Экологическая безопасность.....	64
__5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях .....	65
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	67
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	68
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	89

## ВВЕДЕНИЕ

Создание лекарственных средств растительного происхождения и лекарственных растительных препаратов остается одной из актуальных задач фармацевтической науки и практики [1]. В настоящее время в медицине применяется значительное количество лекарственных препаратов на основе растений. Их доля среди лекарственных средств составляет около 30%, и в дальнейшем она будет только возрастать [2]. Однако их использование обусловлено сезонностью, ареалом произрастания и ограниченным количеством. Переход к интенсивным методам использования растительных ресурсов взамен изъятия их из природных условий выдвигает проблемы введения растений в культуру, создания промышленных плантаций, искусственных фитоценозов разного назначения [3]. Получение культуры клеток и тканей таких растений с использованием технологии *in vitro* могут стать хорошей альтернативой природных источников лекарственного сырья, чем и обусловлена актуальность данного исследования.

Таким образом, **целью работы** является получение каллусной культуры растения *Alfredia Cernua*.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить эффективную методику стерилизации (состав стерилизующего раствора, продолжительность стерилизации), который предотвращает контаминацию при культивировании семян *Alfredia cernua*;
2. Получить стерильное растение *Alfredia cernua*;
3. Получить каллусную культуру растения *Alfredia cernua*;
4. Исследовать влияние концентрации гормонов питательной среды Мурасиге-Скуга на интенсивность роста каллусной культуры;
5. Выявить оптимальные условия термостатирования (освещение, температуру) при культивировании каллусной культуры *Alfredia cernua* методом *in vitro*.

Объектом исследования было выбрано растение *Alfredia cernua*. Данное растение отличается высоким содержанием полезных биологически активных веществ. Согласно исследованиям по изучению фармакологической активности, альфредия поникшая обладает антидепрессантным, ноотропным, анксиолитическим действием [4].

#### *Научная значимость и новизна результатов*

Подобраны оптимальные условия стерилизации эксплантов растения *Alfredia cernua* при культивировании с использованием технологии *in vitro*. Получена каллусная культура данного растения на основе модифицированной питательной среды Мурасиге и Скуга.

#### *Научно практическая ценность работы*

В состав растения *Alfredia cernua* входят такие ценные группы биологически активных веществ, как лигнаны, флавоноиды, органические кислоты, кумарины, дубильные вещества, тритерпеновые соединения, стерины, каротиноиды, аминокислоты, семь из которых являются незаменимыми (лизин, треонин, валин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, гистидин) [4]. Результаты полученных экспериментальных исследований могут лечь в основу разработки нового лекарственного препарата для профилактики и лечения заболеваний мозга и нервной системы.

## 1 Обзор литературы

### 1.1 Фармакогностическая характеристика растения

#### 1.1.1 Ботаническая классификация и описание растения

Альфредия поникшая (*Alfredia cernua*) – растение из рода многолетних травянистых растений Альфредия (*Alfredia*) семейства Астровые (*Asteraceae*) или Сложноцветные (*Compositae*). К роду относят еще 7 видов растения, среди которых наиболее известными являются Альфредия Колючечешуйчатая (*Alfredia acantholepis*) и Альфредия снежная (*Alfredia nivea*) [5].

Альфредия поникшая – обладает укороченным корневищем с многочисленными придаточными корнями. Стебель у альфредии мощный, толстый и прямой, полый, бороздчатый, покрытый густым, мягким, шелковистым, курчавым опушением [6]. Некоторые растения достигают 3 метров в высоту, но чаще альфредия вырастает до 1-2 метров.



Рисунок 1 – Фотография растения *Alfredia cernua*

Нижние листья растения яйцевидные, овальные или эллиптические, длинночерешковые, до 50 см длиной, сверху зеленые, голые, снизу – беловойлочные. Средние листья Альфредии лировидные, более мелкие с коротким крылатым черешком, верхние листья – сидячие, стеблеобъемлющие. Края листьев зубчатые, с шипиками и колючками [6].

Многочисленные поникающие корзинки (рисунок 1) достигают 5 см в диаметре, у них многорядная обертка с многочисленными листочками. Венчик у Альфредии голый и желтый, хохолок – многорядный. Формула цветка -  $C(rappus)L(5)T(5)-P(2)$ . Плод – сухая, серо-бурая семянка.

### 1.1.2 Арел и места обитания

*Alfredia cernua* – реликтовое растение. Оно распространено в таежном и субальпийском поясе, растет на опушках и полянах мелколиственных и хвойных лесов, среди прибрежных и пойменных зарослей кустарников, по берегам рек и ручьев, на высокотравных лугах Сибири и в Средней Азии (рисунок 2) [6].

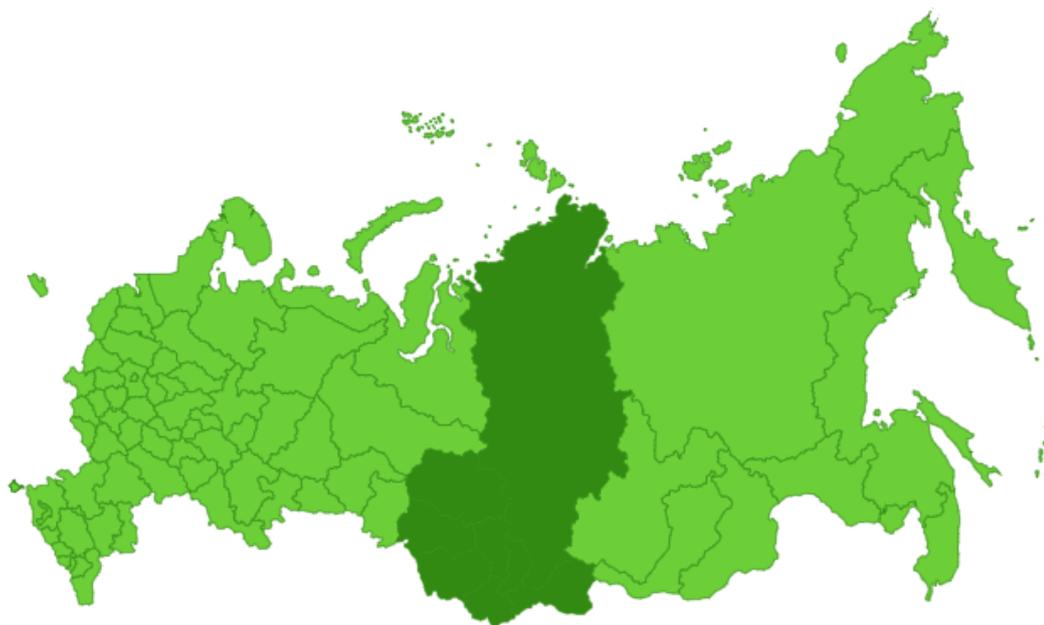


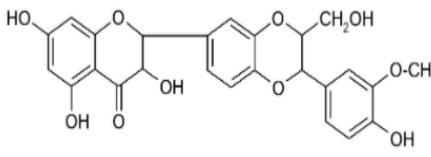
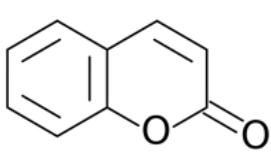
Рисунок 2 – Регионы распространения растения *Alfredia cernua* на карте России

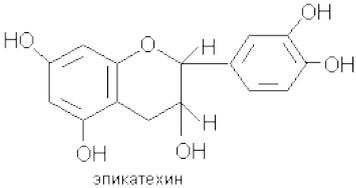
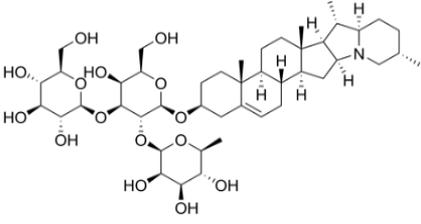
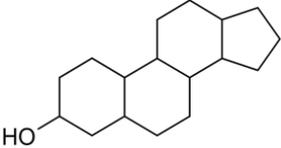
### 1.1.3 Химический состав растения. Характеристика биологически активных веществ, содержащихся в растении

Химический состав надземной части альфредии поникшей представлен простыми фенолами, флавоноидами, кумаринами, органическими кислотами, лигнанами, стеринами, каротиноидами, полисахаридами, органическими кислотами, макро- и микроэлементами.

Ценные группы БАВ, которые содержатся в надземной части *Alfredia cernua*, представлены в таблице 1 [7].

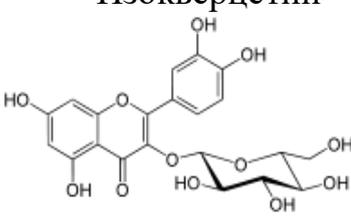
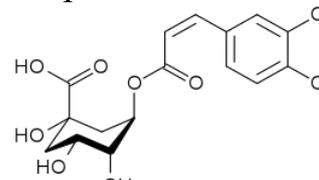
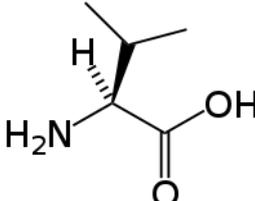
Таблица 1 – Характеристика биологически активных веществ [7-9]

Группа БАВ	Структурная формула	Фармакологические свойства
Лигнаны	 <p style="text-align: center;">Силибин</p>	Гипотензивное действие, применяют при гипертонии и функциональных расстройствах нервной системы, при сердечно-сосудистых заболеваниях; обладают противовоспалительными
Кумарины		Входит в состав успокоительных сборов, проявляет успокаивающее, противосудорожное и антикоагулянтное действие, Фотосенсибилизирующее (антилейкодермическое) действие.

<p>Дубильные вещества</p>	 <p>эпикатехин</p>	<p>Денатурируют белки клеток с образованием защитной альбуминовой пленки, оказывая на микроорганизмы бактерицидное или бактериостатическое действие.</p>
<p>Тритерпеновые соединения</p>	 <p>Сапонины</p>	<p>Усиливают секрецию бронхиальных желез. Регулируют водно-солевой и минеральный обмен. Усиливают деятельность гормонов, ферментов за счет эмульгирующего действия</p>
<p>Стерины</p>		<p>Снижают уровень холестерина в крови, оказывают антиоксидантное воздействие и предупреждают развитие ишемического инсульта, а также инфаркта миокарда.</p>
<p>Каротиноиды</p>	<p>Каротины являются тетратерпенами — изопреноидными углеводородами общей формулы <math>C_{40}H_{56}</math></p> 	<p>Витамин А, β-каротин являются антиоксидантами, средствами профилактики и лечения раковых заболеваний, в частности, препятствуя повторному появлению опухоли после операций. Защищают мембраны клеток мозга от разрушительного действия свободных радикалов</p>

Исследование показывает, что *Alfredia cernua* также обладает ценным составом флавоноидов, органических кислот и аминокислот. Согласно последним исследования количество аминокислот составило 15, причем семь из них являются незаменимыми в фармацевтической практике (таблица 2) [10,11].

Таблица 2 - Характеристика флавоноидов, органических кислот и аминокислот, входящих в состав *Alfredia cernua* [10-12]

Группа БАВ	Название	Структурная формула	Фармакологические свойства
Флавоноиды	кверцетин	<p>Изокверцетин</p> 	Относятся к группе антиоксидантов, веществ, блокирующих свободные радикалы, обладают противовоспалительными свойствами.
	изокверцетин		
	рутин		
Органические кислоты	коричная	<p>Хлорогеновая кислота</p> 	Обладают противовоспалительной, противовирусной, антимикробной активностью.
	ванилиновая		
	хлорогеновая		
Аминокислоты	Лизин	<p>Лейцин</p> 	Выступают в качестве нейромедиаторных веществ или их предшественников, выполняют роль эндогенного источника NO, снижают катаболизм белка, усиливают его синтез.
	треонин		
	валин		
	лейцин		
	фенилаланин		
	гистидин		

#### 1.1.4 Фармакологические свойства лекарственного растительного сырья растения *Alfredia cernua*

Научно установлено, что экстракты растения проявляют ноотропную и анксиолитическую активность, то есть способны оказывать стимулирующее воздействие на высшие функции мозга и увеличивать его устойчивость к чрезмерным нагрузкам, а также могут подавлять чувство тревоги, страха, беспокойства, эмоционального напряжения [13].

Согласно исследованиям по изучению фармакологической активности альфредии поникшей, растение обладает антидепрессантным, ноотропным,

анксиолитическим действием [4]. Специалисты из НИИ Фармакологии СО РАМН г. Томска испытывали экстракт *Alfredia cernua* на мышах [14]. Исследования показали, что экстракт растения препятствует гипертрофии надпочечников и препятствует язвообразованию в желудке, а также проявляет стресс-протекторное и антигипоксическое действие. Ученые считают, что стресс-протекторное свойство проявляется благодаря адаптогенному эффекту экстракта. Экстракт растения приводит поведение животных в норму после перенесенного стресса. Благодаря лечебным свойствам растение *Alfredia cernua* является перспективным источником ценных БАВ, применяемых для разработки лекарственных препаратов [14].

### **1.1.5 Применение препаратов растения в медицине**

*Alfredia cernua* нашла широкое применение в народной медицине [15]. Настой корней растения применяют в качестве тонизирующего средства. Отварами и настоями *Alfredia cernua* лечат различные заболевания центральной нервной системы, нервные и психологические расстройства, неврастению, панические атаки, частые головокружения, желудочную невралгию (гастралгия). Считается, что трава *Alfredia cernua* помогает от обмороков и энурезов, суставных болей и эпилепсии. Отвар растения – эффективное средство, которое стимулирует когнитивные функции мозга и улучшает память. Как наружное средство *Alfredia cernua* применяют при различных кожных высыпаниях [16].

*Alfredia cernua* не относится к группе фармакопейных растений и официально не используется в фармацевтической промышленности. Однако, ученые активно изучают фармакологические свойства растения и приходят к выводу, что изготовленные на ее основе экстракты способны оказывать стресс-протекторное, антиоксидантное, диуретическое, антигипоксическое, болеутоляющее, противосудорожное и тонизирующее действие [17].

У *Alfredia cernua* не выявлено особых противопоказаний, кроме индивидуальной непереносимости, однако применять растение лучше после

предварительной консультации с лечащим врачом. Также не рекомендуется прием настоев травы детям, беременным и кормящим женщинам.

## **1.2 Культивирование изолированных клеток и тканей растений *in vitro***

Прогрессивная биотехнология лекарственных растений базируется на применении результатов, полученных экспериментальным воздействием на уровне отдельных клеток. *In vitro* (с лат. — «в стекле») — это технология выполнения экспериментальных опытов, при которой все эксперименты проводятся «в пробирке» — вне живого организма [18]. Ведение клеток в культуру *in vitro* — это создание уникальной биологической системы. Уникальность данной системы заключается в том, что в ней структурные частицы целостного организма — клетки, которые выполняют конкретные функции, в итоге становятся отдельными организмами, способными к самостоятельному росту и развитию.

Каллусообразование — это результат дедифференциации и активного деления и роста дедифференцированных неорганизованно растущих клеток, возникающее в природе при ранениях.

### **1.2.1 Культура клеток, органов и тканей растений**

Для получения культуры клеток, органов, тканей используют части асептически выращиваемых растений [18].

Методы получения каллусной культуры фрагментов растений основаны на важном свойстве растительной клетки — тотипотентности. Тотипотентность — это способность растительной клетки реализовать генетическую информацию [19]. Это свойство обеспечивает дифференцировку клетки и ее развитие до целого организма. Обычно свойство тотипотентности проявляется на поврежденной поверхности растения. Образование каллуса является результатом неорганизованной пролиферации клеток. В экспериментальных условиях *in vitro* [20] при выращивании фрагментов тканей, органов или

клеток на искусственных питательных средах возможна реализация супрессированной *in vivo* тотипотентности. Это происходит при добавлении в питательную среду регуляторов роста и развития в культуре фитогормонов.

В основном каллусная ткань *in vitro* имеет белый или желтоватый, и реже светло-зеленый цвета. Коричневый окрас обычно появляется при старении каллусных клеток [21]. Это объясняется окисление фенолов до хинонов, которые накапливаются в клетке. Чтобы предотвратить это в состав питательных сред добавляют антиоксиданты. В зависимости от происхождения и условий выращивания каллусная ткань бывает различной консистенции – рыхлой, средней плотности, плотной [22], она аморфна и не обладает точной анатомической структурой.

### **1.2.2 Получение культуры клеток с использованием *in vitro***

Известно, что культура клеток высших растений является уникальной, экспериментально созданной популяцией соматических дедифференцированных клеток. Использование методов выращивания культуры *in vitro* позволяет регулировать многие физические и химические факторы внешней среды [23]: продолжительность и интенсивность светового дня, температуру, влажность, количество питательных веществ. Именно это определило широкое применение культуры растительных тканей *in vitro* в качестве модельной системы для теоретических и прикладных исследований в области физиологии и биотехнологии растений.

Как правило, искусственная питательная среда *in vitro* для получения каллуса представляет собой комбинацию неорганических соединений (минералы) и органических соединений, в том числе углеводы, витамины, рост регулирующие вещества и агар. Для приготовления среды используют очищенную деионизированную воду [24]. Инокуляция культуры *in vitro* проводится в два этапа:

- 1) выбор и приготовление экспланта из стерильного растения;

2) перенос экспланта в культуральные пробирки, колбы методом инокуляции на поверхность среды.

Важную роль в получении каллусной культуры имеет правильный выбор источника растительного материала, донорских органов эксплантов, их стерилизация, а также и период сезона, в котором эксплант собран для инокуляции.

С целью предотвращения старения, утраты способности к делению и гибели клеточных культур, первичный каллус, который возникает на эксплантах, через 4-6 недель следует произвести пассировку, т.е. перенос каллуса на свежую питательную среду [25]. При соблюдении регулярного пассирования способность клеток к делению может сохраняться до десятков лет.

### **1.3 Питательные среды. Влияние состава питательной среды на эффективность культивирования *in vitro***

#### **1.3.1 Состав питательной среды**

Изолированные клетки и ткани культивируют на многокомпонентных питательных средах [26]. Рост и развитие эксплантов *in vitro* зависят от генетических особенностей культуры, правильно подобранных факторов окружающей среды и состава питательной среды.

Питательная среда для культивирования обычно состоит из воды, макро- и микроэлементов, гормонов, витаминов, сахара (растения *in vitro* часто не обладают достаточной фотосинтетической способностью), а также других простых и сложных органических веществ.

Компоненты среды для выращивания каллусных и суспензионных культур можно разделить на шесть групп, что обычно отражает порядок приготовления концентрированных растворов [26]:

- 1) основные неорганические питательные вещества (макроэлементы);
- 2) микроэлементы;
- 3) источники железа;

- 4) органические добавки (витамины);
- 5) источники углерода;
- 6) регуляторы роста растений.

Важное значение имеет рН среды [27]. От величины рН зависит устойчивость и усвояемость ряда компонентов питательной среды. Наиболее чувствительные к рН ИУК, витамины (тиамин, пантотеновая кислота). При низких величинах рН не происходит желатинизации агара. Кроме того, от рН среды зависит доступность для культуры ткани различных соединений железа. Большинство культур изолированных тканей растет на средах с рН 5,5-5,8. Величину рН готовой среды доводят до требуемого значения с помощью 0,5-1 Н раствора КОН или NaOH (если показатель отклоняется в кислую сторону) и 0,5—1Н HCl (если показатель отклоняется в щелочную сторону).

### 1.3.2 Неорганические компоненты

Растение, растущее в естественных условиях, а также растительная ткань, растущая *in vitro*, требует необходимую комбинацию макро- и микроэлементов. Наиболее популярна питательная среда Мурасиге-Скуга (МС), в состав которой входят макро- и микросоли [28].

Макроэлементы [28] —вносятся в миллимолярных (мМ) количествах. Азот (N) обычно поставляется в форме аммония ( $\text{NH}_4^+$ ) и нитрат ( $\text{NO}_3^-$ ) ионов, хотя иногда используются более сложные органические источники, такие как мочевина, аминокислоты, глютамин или казеин гидролизат. В дополнение к азоту добавляются калий, магний, кальций, фосфор и серу в качестве различных компонентов. Например,  $\text{MgSO}_4$  обеспечивает магний и серу;  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  или  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  обеспечивают фосфор;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - кальций.

Микроэлементы нужны в гораздо меньших (микромольных [мкМ]) концентрациях, чем макроэлементы. Достаточное количество многих микроэлементов могут быть обеспечены случайным образом за счет неорганических примесей, содержащихся в используемых веществах.

### 1.3.3 Органические компоненты и регуляторы роста

Органические вещества необходимы в качестве питательных компонентов, так как большинство каллусных тканей лишены хлорофилла и не способны к автотрофному питанию [30]. Углеводы являются очень важной частью любой питательной среды, и его добавление необходимо для роста и развития культуры *in vitro*.

Большинство растительных культур не способны эффективно фотосинтезировать по ряду причин: недостаточно организованное развитие клеток и тканей, отсутствие хлорофилла, ограниченный газообмен в сосудах, искусственное освещение. Углеводы (обычно это сахароза или глюкоза, так как сахароза синтезируется и транспортируется растением естественным путем) входят в состав любой питательной смеси в концентрации 2-3%.

Для стимуляции биохимических процессов в клетке используют витамины группы В[30]: тиамин-НС1 (В1), рибофлавин (В2), Са-пантогенат (В5), пиридоксин-НС1 (В6), аскорбиновая кислота (С), никотиновая кислота (РР), мезоинозит. Для процессов роста и морфогенеза в культуре тканей необходимы регуляторы роста и развития - фитогормоны. Эти вещества индуцируют деление и растяжение клеток, влияют на дифференциацию и дедифференциацию клеток и тканей.

В биотехнологических исследованиях чаще используют фитогормоны, стимулирующие рост и развитие [31]: ауксины, цитокинины, гиббереллины. В таблице 3 дана краткая характеристика наиболее часто используемых стимуляторов роста.

Таблица 3 - Витамины и фитогормоны, входящие в состав питательной среды МС при культивировании *in vitro* [31-34]

Название вещества		Диапазон концентраций, мг/л	Функция в морфогенезе
Витамины	Никотиновая кислота (РР)	0,1-5	Входит в состав дыхательного кофермента.
	Пиридоксин-НСl (В6)	0,1-1	Является важным коферментом во многих метаболических реакциях.
	Тиамин-НСl (В1)	0,1-5	Участвует в углеводном обмене и биосинтезе некоторых аминокислот.
	Рибофлавин (В2)	0,1-1	Важнейший катализатор процессов клеточного дыхания, участвует в углеводном, белковом и жировом обменах.
	Аскорбиновая кислота (С)	0,1-1	Принимает участие в важнейших энергетических процессах растительной клетки - фотосинтезе и дыхании; является антиоксидантом.
	Мезоинозит	0,1-1	Участвует в метаболизме углеводов и в гормональной регуляции роста.
Фитогормоны	1-Нафтилуксусная кислота	0,01-10	Относится к группе ауксинов. Играет роль во многих процессах развития, включая удлинение клеток и рост ткани, апикальное доминирование, формирование корней и соматический эмбриогенез. Вызывает каллусообразование при более высокой концентрации.

	Индолил-3-уксусная кислота	0,01-10	Стимулирует рост плодов и побегов растений. Усиливает рост придаточных корней.
	6-Бензиламинопурин	1-5	Относится к группе цитокининов. Способствуют делению клеток и стимулируют инициацию и рост побегов.
	2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота	0,1-10	В малых количествах стимулирует рост побегов и плодов.

При изменении соотношения между этими фитогормонами или при добавлении других фитогормонов могут быть вызваны разные типы морфогенеза.

#### **1.4 Методы, условия культивирования семян и каллусной культуры**

##### **1.4.1 Стратификация семян**

В природе семена состояние сна проводят зимой в земле. За это время твердая внешняя часть становится мягче и трескается за счет влияния влаги и мороза. Таким образом семена проходят через натуральный процесс «стратификации» или преобработки. Этот холодный влажный период провоцирует рост эмбриона внутри семян и приводит к последующему разрыву разрушившейся воздействием погоды оболочки, так как эмбрион ищет доступ к свету и питанию.

Стратификация — процесс имитации влияния природных зимних условий на семена растений, чтобы семенам было легче всходить, а также меры по ускорению прорастания семян и повышению их всхожести, применяемые перед посадкой. Часто включают искусственное длительное

выдерживание семян при определённой пониженной температуре. Семена многих растений должны пройти через состояние сна эмбриона, иначе они не дадут побегов. Время сна различно для разных растений и условий, в большинстве случаев достаточно двух месяцев [35].

Цель стратификации - повышение всхожести за счёт предварительного (например, до посадки) выведения семян из состояния покоя, вернее, его прохождения в искусственных условиях в более короткие сроки. У некоторых растений семена после созревания находятся в состоянии глубокого покоя, и после посева всходит только их часть.

#### **1.4.2 Стерилизация эксплантов**

На первых стадиях метода *in vitro* важным этапом является стерилизация [36] выбранных эксплантов без потери их способности к дальнейшему развитию, что наблюдается при использовании традиционных химических стерилизующих агентов.

Растения обладают высокой восприимчивостью к микроорганизмам, подавляющим их рост, и не способны сопротивляться инфекциям. А поскольку питательная среда, на которой выращиваются экспланты, является идеальной средой для роста микроорганизмов, необходимо не только исключить возможность контаминации из внешней среды, но и обеспечить эффективную стерилизацию растительного материала, так как на его поверхности и внутри тканей почти всегда присутствует посторонняя микрофлора [37]. Для этих целей применяют широкий спектр химических препаратов, однако стерилизующие агенты очень видоспецифичны и их выбор зависит от множества факторов: размер экспланта, наличие кожуры, плотность покровных тканей и др.

Необходимо подобрать такие способы и режимы обработки экспланта, которые бы обеспечили его полную стерилизацию, не повредив при этом клеток и тканей растения.

### **1.4.3 Влияние физических факторов на рост растительной ткани *in vitro***

На рост и развитие растительных тканей *in vitro* большое влияние оказывают физические факторы – свет, температура, аэрация, влажность [38].

Большинство каллусных тканей могут расти в условиях сильного освещения или в темноте, так как они не способны фотосинтезировать. Вместе с тем свет может выступать как фактор, обеспечивающий морфогенез и активирующий процесс вторичного синтеза. В качестве источника света используют люминесцентные лампы. Для большинства растений оптимум освещенности составляет примерно 1000 люкс [38]. Кроме интенсивности освещенности на культуру ткани и её физиологические особенности влияет качество света.

Для большинства каллусных культур оптимальна температура 26°C. В отличие от роста культур клеток и тканей индукция их морфогенеза требует более низких температур (18-20°C). Оптимальная влажность в помещении, где растут культуры, должны составлять 60-70% [39].

## 2 Экспериментальная часть

В данной главе представлена информация об объектах исследования, подготовке оборудования и необходимых реактивов, методах и методиках проведения экспериментов. Исследования связаны с работой с химическими реактивами, поэтому требуют строгого соблюдения техники безопасности и правил работы в лаборатории. Исследование проводилось с использованием следующего оборудования:

1. Суховоздушный шкаф;
2. Ламинарный шкаф;
3. Цифровой автоклав;
4. Шкаф термостатируемый WiseCube;
5. Бинокулярный микроскоп;
6. Аналитические лабораторные весы (класс точности 0,0001 г)
7. рН-метр лабораторный;
8. Дистиллятор;
9. Дозаторы 1-10  $\mu$ л и 10-100  $\mu$ л;

### 2.1 Объект исследования

Поверхностное культивирование *Alfredia cernua in vitro* проводилось на основе семян этого растения. Семена были получены из коробочки взрослого растения. Семена мелкие, серого, коричневого и черного цветов, имеют почти три грани и узкоплечатые ребра, сохраняют всхожесть в течение 1-1,5 лет. Семена *Alfredia* можно посадить в открытый грунт осенью в октябре на слегка затененных участках. Всходы появятся весной следующего года. При весеннем посеве в открытый грунт семена альфредии прорастают через год.

## **2.2 Методика стерилизации оборудования и правила работы при использовании технологии *in vitro***

В ходе проведения исследования стерилизации подвергались:

- Комната, в которой производили изоляцию и пересадку культур;
- Ламинарный шкаф;
- Все необходимые инструменты и материалы (пинцеты, скальпель, посуда, фильтровальная бумага).

Стерилизация операционной комнаты производилась тщательным удалением загрязнений и пыли со всех поверхностей с помощью мыльного раствора и УФ-облучения. Тщательно вымытые стеклянные баночки для культивирования, закрытые плотной фольгой, пинцеты, скальпель, а также фильтровальную бумагу стерилизовали в суховоздушном шкафу в течение двух часов при температуре равной 180 °С. После была включена УФ-лампа на 20 минут. Все операции по посадке семян, эксплантов и пассированию каллусной культуры проводились в ламинарном боксе с использованием приточной вентиляции.

Приступать к работе сразу после стерилизации нельзя, следует дать 15-20 мин для удаления окисла азота, образующего под влиянием ультрафиолета. Непосредственно перед работой обязательно тщательно мыть руки под струей теплой воды. Затем руки и рабочую поверхность стола протереть 70 % раствором этилового спирта. После этого надо обжечь инструменты над пламенем спиртовки и дать им остыть перед использованием.

В процессе работы необходимо воздерживаться от лишних движений, периодически проводить дезинфекцию рук 70 % раствором этилового спирта, использовать инструменты только для одноразовой операции. При извлечении растительного материала избегать движения руками над открытыми культуральными сосудами. Перед открыванием и закрыванием культурального сосуда с питательной средой нужно слегка обжечь его горлышко, поворачивая сосуд над пламенем спиртовки. При посадке нужно держать сосуды под углом к поверхности стола, т.е. в наклонном положении.

Нельзя пользоваться эксплантами, которые случайно уронили на поверхность стола. После посадки обжечь на пламени пробку (крышку) сосуда. Выполнять посадку желательнее как можно быстрее, сводя к минимуму время, при котором культуральные сосуды остаются открытыми. После окончания работы следует запечатать культуральные сосуды специальной пипкой лентой - парафильмом.

### 2.3 Приготовление питательной среды и растворов

В качестве питательной среды для культивирования растения *Alfredia cernua* была выбрана универсальная среда Мурасиге - Скуга. Растворы для приготовления питательной среды, а также растворы гормонов хранили в холодильнике при температуре 2 - 6 °С в течение месяца. На сосудах с маточными растворами обязательно указывали название среды и растворов, концентрацию растворов, дату приготовления. Использование мутных растворов и растворов с осадками - недопустимо.

#### 2.3.1 Приготовление питательной среды Мурасиге - Скуга

Поверхностное культивирование проводилось на питательной среде Мурасиге–Скуга. Питательная среда Мурасиге - Скуга является наиболее оптимальным вариантом для поверхностного культивирования растения *Alfredia cernua* [28]. Состав витаминов, микро- и макроэлементов данной среды отображен в таблице 4.

Таблица 4 – Состав среды Мурасиге-Скуга на 1000 см<sup>3</sup> [28]:

Компонент среды	Концентрация компонентов (мг/л)
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	332
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.85

Продолжение таблицы 4

Na <sub>2</sub> ЭДТА	37.25
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	24.1
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6
KI	0.83
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.25
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
Пиридоксин гидрохлорид	1
Тиамин гидрохлорид	1
Никотиновая кислота	2
Сахароза	15000
Глюкоза	15000
Агар-агар	9000

Среда готовилась объемом на 500 см<sup>3</sup>, следовательно, массы всех макро- и микроэлементов были пересчитаны на меньший объем среды. Приготовление питательной среды проводили в несколько этапов:

1. Были сделаны навески всех необходимых компонентов. Навески взвешивались на аналитических весах с точностью до 0,0001 г. Точные навески переносились в химические стаканы для приготовления растворов.
2. Были приготовлены растворы макро- и микроэлементов, а также витаминов. В первый мерный стакан на 50 см<sup>3</sup> были внесены навески макросолей таких, как нитрат калия, нитрат аммония, магний серноокислый 7-ми водный, калий фосфорнокислый 1-замещенный, далее объем доводили до метки дистиллированной водой. Во второй мерный стакан были внесены навески микросолей таких, как борная кислота, марганец серноокислый 5-ти водный, цинк серноокислый 7-ми водный, калий йод,

далее объем довели до 5 см<sup>3</sup> дистиллированной водой. В третьем стакане в 1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды были растворены навески микросолей таких, как хлорид кобальта 6-водный, медь сернокислая 5-водная, натрий молибденовокислый 2-водный. В четвертом и пятом стакане в 20 см<sup>3</sup> дистиллированной воды при нагревании на водяной бане были растворены навески железа сернокислого 7-ми водного и натрия ЭДТА. В шестом стакане в 5 см<sup>3</sup> дистиллированной воды была растворена навеска хлорида кальция 2-водного. В седьмом и восьмом стакане были приготовлены растворы глюкозы и сахарозы путем растворения соответствующих навесок в 20 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Далее готовились растворы витаминов. Ампуле никотиновой кислоты (C=10 мг/см<sup>3</sup>) объемом 1 см<sup>3</sup> растворили в 40 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, далее отобрали 1 см<sup>3</sup> для общего раствора питательной среды. Ампулу тиамин гидрохлорида (C=50 мг/см<sup>3</sup>) объемом 1 см<sup>3</sup> растворили в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, далее отобрали 1 см<sup>3</sup> для общего раствора питательной среды. Ампулу пиридоксина гидрохлорида (C=50 мг/см<sup>3</sup>) объемом 1 см<sup>3</sup> растворили в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, далее отобрали 1 см<sup>3</sup> для общего раствора питательной среды.

3. Все вышеперечисленные растворы были объединены в один раствор в мерной колбе на 500 см<sup>3</sup> и разбавлены дистиллированной водой, не доводя до метки. Приготовленный раствор питательной среды должен иметь значение рН в интервале от 5.7 до 5.8. Для измерения значения рН было отобрано 10 см<sup>3</sup> питательной среды. Измерение проводилось на электронном рН-метре. Для установления оптимального значения рН общий раствор разбавлялся небольшим количеством раствора соляной кислоты (C=0.1 М) или гидроксида натрия (C=0.1 М), в зависимости от необходимости понизить или повысить значение рН соответственно. Таким образом, удалось достичь значение рН= 5.8.
4. Раствор питательной среды доводился до объема 500 см<sup>3</sup>. Далее общий раствор среды был разделен на две равные по объему части (250 см<sup>3</sup>) и

перелит в конические колбы. В конических колбах, содержащих равное количество питательной среды, при нагревании на водяные бани была растворена навеска агар-агара.

5. Была проведена стерилизация питательной среды методом автоклавирования. Конические колбы, содержащие питательную среду и растворенный агар, были запечатаны специальными ватными пробками и прикрыты закрепленным резинкой листом. Далее колбы помещались в автоклав. Автоклавирование производится в течение 40 минут при температуре 121 °С и давлении выше атмосферного.
6. Простерилизованную питательную среду разлили по стерильным баночкам, приготовленным для культивирования. Данная операция проводилась в ламинарном боксе с приточной вентиляцией, который был предварительно обработан этиловым спиртом 70%. Подготовленная среда оставлялась в ламинарном боксе для застывания.

Застывшая питательная среда, полученная по вышеописанной методике, использовалась в дальнейшем для поверхностного культивирования *Alfredia serotina*.

### **2.3.2 Приготовление раствора гормонов**

Приготовили раствор гормона ауксина – нафтилуксусной кислоты (НУК) с концентрацией 1 мг/мл. Для этого в колбе на 100 см<sup>3</sup> растворили 100 мг НУК в 1-2 см<sup>3</sup> этилового спирта и довели до метки дистиллированной водой.

Для получения раствора цитокининов (6-Бензиламинопурина) концентрацией 1 мг/мл навеску 6-БАП массой 100 мг предварительно растворили в 5 см<sup>3</sup> 0,5 Н раствора HCl в колбе на 100 см<sup>3</sup> и довели дистиллированной водой до метки. При этом процесс растворения сопровождали подогреванием на водяной бане.

### 2.3.3 Приготовление стерилизующих агентов

Стерилизация семян *Alfredia cernua* проводилась обработкой стерилизующим агентом. Затем семена тщательно промывали дистиллированной водой. В качестве стерилизующих агентов использовали 3 разных раствора для сравнения их эффективности и выбора оптимального:

1. 30% раствор дистиллированной воды, содержащий ПАВ. В качестве ПАВ использовали доместос. Для приготовления раствора в колбу на 100 см<sup>3</sup> добавили 30 см<sup>3</sup> доместоса и довели до метки дистиллированной водой.
2. Стерилизующий раствор готовили путем смешивания 30 см<sup>3</sup> 80% этанола с 6 см<sup>3</sup> воды и 4 см<sup>3</sup> 37% перекиси водорода.
3. 0,1% раствор сулемы (PbCl<sub>2</sub>) готовили путем растворения навески массой 0,1000 г PbCl<sub>2</sub> в 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

### 2.4 Методика стратификации семян *Alfredia cernua*

Стратификацию семян проводили путем создания для семян природных процессов пробуждения искусственно.

Первоначально определили жизнеспособность семян, поместив их в сосуд с водой. Семена, которые потонули, были пригодны для дальнейшего исследования. Для проведения стратификации поместили семена во влажные условия и содержали их при слабоположительных температурах 0-4 °С с доступом воздуха. Для этого использовали способ смешивания семян с влажным песком.

Песок должен быть крупнозернистым, отсеянным от мелких иловатых частиц и тщательно промытым. На 1 часть семян взяли 5 частей песка, тщательно перемешали и увлажнили водопроводной водой до тех пор, пока вода не начала выступать из смеси. Сосуд с песком и семенами поместили в холодильник. Таким образом, семена выдерживали в течение месяца. Каждые 5-6 дней проверяли наличие влаги и при необходимости увлажняли.

## 2.5 Методика посадки семян *Alfredia cernua* на питательную среду

Все стерильное оборудование и материалы были перенесены в предварительно обработанный ламинарный бокс с включённой приточной вентиляцией. Баночки со стерильной средой внесли в ламинарный бокс, предварительно сняв с них бумагу и оставив только плотно прилегающую крышку из фольги.

На руки были надеты медицинские перчатки, которые тщательно обработали спиртовой салфеткой и натянули на края рукавов лабораторного халата. На лицо была надета медицинская маска, которая уменьшала риск попадания различных микроорганизмов на стерильную питательную среду в процессе посадки семян. В каждую баночку помещали по три семечка.

Посадки семян *Alfredia cernua* на стерильную питательную среду Мурасиге-Скуга выполняли следующим образом:

1. Обожгли крышки из фольги, пронося горло баночки над пламенем спиртовой горелки в течение нескольких секунд.

2. Пинцетом также обожженном в пламени спиртовой горелки и обработанным 70%-ным раствором спирта аккуратно приоткрыли крышку, оставив небольшое отверстие для внесения семян на питательную среду.

3. После данной манипуляции пинцет снова обожгли над пламенем спиртовой горелки и обработали 70%-ным раствором этилового спирта. Вновь обработанным пинцетом семена извлекли из раствора стерильной воды и внесли на поверхность стерильной питательной среды через оставленное небольшое отверстие в крышке баночки.

4. Снова обработали пинцет, как это было сказано выше, и плотно закрыли им отверстие в крышке баночки. Крышку из фольги вновь обожгли, пронося горло баночки над пламенем спиртовой горелки в течение нескольких секунд. После крышку закрыли листом бумаги и плотно прижали канцелярской резинкой к горлышку баночки.

5. Закрытые баночки после посадки убрали в термостат с постоянной температурой.

#### **4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение**

В ходе работы была разработана методика получения каллусной культуры растения *Alfredia cernua*. Получение культуры клеток и тканей ценных лекарственных растений с использованием технологии *in vitro* имеет такие преимущества, как круглогодичное получение сырья не зависимо от природных условий региона; оптимизация и стандартизация условий выращивания; автоматизация процессов выращивания; экспрессность и низкая стоимость анализа. Создание лекарственных средств растительного происхождения и лекарственных растительных препаратов остается одной из актуальных задач фармацевтической науки и практики.

Таким образом, объектом исследования было выбрано растение *Alfredia cernua*, которое в своем составе имеет полезные компоненты, обладающие ценным терапевтическим эффектом.

Оценка коммерческой ценности разработки является необходимым условием при поиске источников финансирования для проведения научного исследования и коммерциализации его результатов. Данный раздел дипломной работы посвящен обоснованию целесообразности исследования оптимальных условий получения каллусной культуры *Alfredia cernua*.

##### **4.1 Анализ конкурентных технических решений**

Детальный анализ конкурирующих разработок, существующих на рынке, необходимо проводить систематически, поскольку рынки пребывают в постоянном движении [43]. В настоящее время в клинической практике используются достаточно эффективные препараты с ноотропным и антидепрессантным действием, однако большинство из них обладают рядом недостатков. В качестве конкурирующих объектов рассмотрим следующие лекарственные препараты, прошедшие доклинические и клинические испытания и разрешенные Минздравом для медицинского применения и промышленного выпуска: «Ноопепт» (Бк1) и «Доксепин» (Бк2). Кф, Кк1, Кк2

– конкурентоспособность соответствующих продуктов.

Таблица 12 – Оценочная карта для сравнения конкурентных технических разработок

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		Бф	Бк1	Бк2	Кф	Кк1	Кк2
1	2	3	4	5	6	7	8
Технические критерии ресурсоэффективности							
1. Технологическая сложность выделения	0.1	4	5	5	0.4	0.5	0.5
2. Побочные эффекты	0.2	5	1	1	1	0.2	0.2
3. Уменьшение левого эффекта	0.1	5	4	4	0.5	0.4	0.4
4. Токсичность в организме	0.1	4	4	5	0.4	0.4	0.5
Экономические критерии оценки эффективности							
1. Стоимость сырья	0.2	4	3	3	0.8	0.6	0.6
2. Стоимость курса лечения	0.1	4	4	5	0.3	0.4	0.5
3. Стоимость препарата	0.2	5	4	4	1	0.8	0.8
<b>Итого</b>	<b>1</b>	<b>35</b>	<b>29</b>	<b>27</b>	<b>4.4</b>	<b>3.3</b>	<b>3.5</b>

Критерии для сравнения и оценки ресурсоэффективности и ресурсосбережения, приведенные в таблице 12, подбираются, исходя из выбранных объектов сравнения с учетом их технических и экономических особенностей разработки, создания и эксплуатации.

Позиция разработки и конкурентов оценивается по каждому показателю экспертным путем по пятибалльной шкале, где 1 – наиболее слабая позиция, а 5 – наиболее сильная. Веса показателей, определяемые экспертным путем, в сумме должны составлять 1. Анализ конкурентных технических решений определяется по формуле 1 [44].

$$K = \sum B_i \times b_i \quad (3)$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента;

$B_i$  – вес показателя (в долях единицы);

$B_i$  – балл  $i$ -го показателя.

В результате научная разработка по сравнению с зарубежным поставщиком является конкурентноспособной.

#### 4.2 SWOT-анализ

SWOT– это комплексный анализ научно-исследовательского проекта. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта.

Результаты первого этапа SWOT-анализа представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Первый этап SWOT-анализа

	<b>Сильные стороны научно-исследовательского проекта:</b> С1. Экологичность производственной технологии С2. Минимальное количество противопоказаний и побочных эффектов С3. Квалифицированный персонал С4. Не используются синтетические составляющие в составе ЛВ С5. Комплексный лечебный эффект	<b>Слабые стороны научно-исследовательского проекта:</b> Сл1. Стоимость и отсутствие необходимого оборудования для проведения испытания опытного образца Сл2. Отсутствие достаточного финансирования проектов Сл3. Недостаток литературных данных по данному проекту Сл4. Ограниченность ресурса, в связи с сезонным произрастанием трав . Сл5. Ценовые затраты на курс лечения
<b>Возможности:</b> В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ В2. Появление спроса на продукт В3. Замена синтетических препаратов на ЛВ с растительными компонентами		

<p><b>Угрозы:</b></p> <p>У1. Отсутствие спроса на новые технологии производства</p> <p>У2. Введения дополнительных государственных требований к сертификации продукции</p> <p>У3. Ограничения на экспорт технологии</p> <p>У4. Несвоевременное финансирование обеспечения научного исследования со стороны государства</p>		
--	--	--

Второй этап состоит в выявлении соответствия сильных и слабых сторон научно-исследовательского проекта внешним условиям окружающей среды [45]. Это соответствие или несоответствие должны помочь выявить степень необходимости проведения стратегических изменений.

В рамках данного этапа необходимо построить интерактивную матрицу проекта. Ее использование помогает разобраться с различными комбинациями взаимосвязей областей матрицы SWOT. Каждый фактор помечается либо знаком «+» (означает сильное соответствие сильных сторон возможностям), либо знаком «-» (что означает слабое соответствие); «0» – если есть сомнения в том, что поставить «+» или «-».

Интерактивные матрицы представлены в таблицах 14,15,16 и 17.

Таблица 14 – Интерактивная матрица проекта «Сильные стороны и возможности»

Сильные стороны проекта						
Возможности проекта		C1	C2	C3	C4	C5
	B1	+	+	-	0	+
	B2	-	+	+	-	0
	B3	-	+	+	-	0

Таблица 15 – Интерактивная матрица проекта «Слабые стороны и ВОЗМОЖНОСТИ»

Слабые стороны проекта						
Возможности проекта		Сл1	Сл2	Сл3	Сл4	Сл5
	В1	-	+	+	+	-
	В2	+	+	0	-	-
	В3	+	+	-	+	-

Таблица 16 – Интерактивная матрица проекта «Сильные стороны и угрозы»

Сильные стороны проекта						
Угрозы		С1	С2	С3	С4	С5
	У1	-	-	-	0	+
	У2	-	+	+	+	-
	У3	+	+	0	+	-
	У4	+	-	+	-	+

Таблица 17 – Интерактивная матрица проекта «Слабые стороны и угрозы»

Слабые стороны проекта						
Угрозы		Сл1	Сл2	Сл3	Сл4	Сл5
	У1	+	+	+	0	+
	У2	-	+	-	-	0
	У3	+	+	-	+	0
	У4	+	+	-	0	+

Таким образом, в рамках третьего этапа может быть составлена итоговая матрица SWOT-анализа, представленная в таблице 18.

Таблица 18 – Итоговая матрица SWOT-анализа

	<b>Сильные стороны научно-исследовательского проекта:</b>	<b>Слабые стороны научно-исследовательского проекта:</b>
	С1. Экологичность производственной технологии	Сл1. Стоимость и отсутствие необходимого оборудования для проведения испытания опытного образца
	С2. Минимальное количество противопоказаний и побочных эффектов	Сл2. Отсутствие достаточного финансирования проектов
	С3. Квалифицированный персонал	Сл3. Недостаток литературных данных по данному проекту
	С4. Не используются синтетические составляющие в составе ЛВ	Сл4. Ограниченность ресурса, в связи с сезонным произрастанием трав рода аконитов.
	С5. Комплексный болеутоляющий эффект	Сл5. Ценовые затраты на курс лечения

<p><b>Возможности:</b>  В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ  В2. Появление спроса на продукт  В3. Замена синтетических препаратов на ЛВ с растительными компонентами</p>	<p>С1. Разработка нового метода выделения зонгорина на модифицированном азопоксиадсорбенте  С2. Появится большой спрос на ЛВ за счет быстрого синтеза продукта.</p>	<p>Сл1. Отсутствие некоторых необходимых оборудований для проведения опытов  Сл2. Не до конца изучен данный метод синтеза</p>
<p><b>Угрозы:</b>  У1. Отсутствие спроса на новые технологии производства  У2. Введения дополнительных государственных требований к сертификации продукции  У3. Ограничения на экспорт технологии  У4. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства</p>	<p>С1. Синтез данным методом ускорит получение продукта, тем самым увеличив спрос на внутреннем рынке  С2. Снижение зависимости от внешних рынков  С3. Прибыль на внутреннем рынке  С4. Повышение себестоимости  С5. Рынок имеет более дешевые синтетические препараты.  С6. Изменение платежеспособности населения.</p>	<p>Сл1. Отсутствие рекламной компании на данный продукт  Сл2. Отсутствие единого документа, подтверждающего качество ЛС  Сл3. Недостаточная прибыль</p>

Лабораторные исследования проходят достаточно в стабильных условиях, однако для получения дополнительных конкурентных преимуществ перед синтетическими лекарственными препаратами необходимо получить поддержку Министерства Здравоохранения России, тем самым занять свою нишу на рынке производства и сбыта. Для устранения слабых сторон проекта необходим поиск источника финансирования проекта, которым может стать коммерческая организация, так как в условиях развития биотехнологической отрасли (В1) их количество постоянно растет. Для увеличения скорости проведения исследования необходимо увеличить количество исполнителей и оптимизировать методики проведения исследования.

## 4.3 Планирование научно-исследовательских работ

### 4.3.1 Структура работ в рамках научного исследования

Для выполнения научно-исследовательской работы формируется рабочая группа, в состав которой входят: бакалавр – Андрюкова Д., научный руководитель – Чернова. А.П., консультант по экономической части (ЭЧ) – Якимова Т.Б. и консультант по части социальной ответственности (СО) – Сечин А.А. Составим перечень этапов и работ в рамках проведения научного исследования и проведем распределение исполнителей по видам работ (Таблица 19).

Таблица 19 – Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

№ этапа	Название этапа	Содержание работ	Должность исполнителя
1	Введение	Разъяснение темы НИР, основных направлений деятельности по осуществлению НИР.	Чернова А.П. (доцент ОХИ)
2	Литературный обзор	Обзор учебных материалов, научных статей, патентов по теме исследования.	Андрюкова Д.Г. (студент)
3	Теоретический анализ	Разработка плана НИР, выбор методики и техники выполнения.	Чернова А.П. (доцент ОХИ) Андрюкова Д.Г. (студент)
4	Постановка задачи исследования	Постановка задачи на эксперимент, предсказание возможных результатов.	Чернова А.П. (доцент ОХИ)
5	Экспериментальная часть	Проведение работ по получению каллусной культуры растения <i>Alfredia cernia</i>	Андрюкова Д.Г. (студент)
6	Результаты и обсуждение	Оценка эффективности полученных результатов и определение целесообразности проведения ВКР	Чернова А.П. (доцент ОХИ) Андрюкова Д.Г. (студент)

7	Разработка технической документации и проектирование	Оценка экономической эффективности проекта	Якимова Т.Б. ( <i>доцент</i> ОСГН) Андрюкова Д.Г. ( <i>студент</i> )
8	Разработка главы «Социальная ответственность»	Изучение правовых и организационных вопросов обеспечения безопасности	Сечин А.А. ( <i>доцент</i> ООД) Андрюкова Д.Г. ( <i>студент</i> )
9	Оформление отчета по НИР	Разработка презентации, дипломной работы и раздаточного материала	Андрюкова Д. ( <i>студент</i> )

#### 4.3.2 Определение трудоемкости выполнения работ

Трудоемкость выполнения научного исследования оценивается экспертным путем в человеко-днях и носит вероятностный характер, т.к. зависит от множества факторов.

Таблица 20 – Трудозатраты при выполнении проекта

ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудозатраты, час.
Чернова А.П., доцент ОХИ	Руководитель НИР	Контроль над ходом выполнения проекта, консультации по поводу проведения эксперимента, получения и анализа результатов НИР	128
Андрюкова Д., студент	Исполнитель	Выполнение проекта (проведение эксперимента, получение и анализ результатов НИР)	640

Трудозатраты были рассчитаны на основании следующих данных:

проект выполняется 4 месяца, руководитель проекта принимает участие 4 раза в неделю на протяжении 2-х часов, студент работает в среднем 5 дней в неделю по 8 часов.

### 4.3.3 Разработка графика проведения научного исследования

При выполнении дипломных работ студенты становятся участниками сравнительно небольших по объему научных тем, поэтому наиболее удобным и наглядным является построение ленточного графика проведения научных работ в форме диаграммы Ганта [44].

Диаграмма Ганта – это горизонтальный ленточный график (Приложение А), на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ. Для удобства построения графика, длительность каждого из этапов работ из рабочих дней следует перевести в календарные дни. Для этого необходимо воспользоваться формулой:

$$T_{ki} = T_{pi} \cdot k_{\text{кал}}, \quad (4)$$

где  $T_k$  – продолжительность выполнения  $i$  – й работы в календарных

$T_{pi}$  – продолжительность выполнения  $i$  – й работы в рабочих днях;

$k_{\text{кал}}$  – коэффициент календарности.

Коэффициент календарности определяется по формуле:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}} \quad (5)$$

где  $T_{\text{кал}}$  – количество календарных дней в году;

$T_{\text{вых}}$  – количество выходных дней в году;

$T_{\text{пр}}$  – количество праздничных дней в году. Таким образом по формуле (3):

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}} = \frac{365}{365 - 93 - 95} = 1.48.$$

## 4.4 Бюджет научно-технического исследования

### 4.4.1 Расчет материальных затрат НТИ

Бюджет затрат на выполнение НТИ составляется с целью

проведения данной работы. Затраты на НТИ рассчитываются по статьям калькуляции, которые включают две группы затрат прямые затраты и накладные затраты.

Расчет стоимости материальных затрат производился по действующим прейскурантам и ценам с учетом НДС. В стоимость материальных затрат включили транспортно-заготовительные расходы (3 – 5 % от цены).

Результаты расчета затрат на сырье, материалы и покупные изделия в процессе проведения НИР представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Затраты на сырье

Наименование	Ед. изм.	Количество			Цена за ед., руб.			Затраты на материалы, (Зм), руб.		
		Исп.1	Исп.2	Исп.3	Исп.1	Исп.2	Исп.3	Исп.1	Исп.2	Исп.3
Нитрат аммония	500г	0,01	0,01	0,01	128	128	128	12,8	12,8	12,8
Нитрат калия	100г	0,2	0,2	0,2	200	200	200	40	40	40
Кальций хлористый 2-водный	кг	0,05	0,05	0,05	31	31	31	2	2	2
Магний сернокислый 7-водный	кг	0,02	0,02	0,02	158	158	158	3	3	3
Калий фосфорнокислый 1-замещенный	кг	0,02	0,02	0,02	458	458	458	9	9	9
Иодид калия	кг	0,02	0,02	0,02	734	734	734	15	15	15
Борная кислота	100г	0,2	0,2	0,2	119	119	119	24	24	24
Серная кислота	л	0,05	0,05	0,05	2389	2389	2389	120	120	120
Хлорид натрия	100г	0,2	0,2	0,2	58	58	58	58	58	58
Гидроксид аммония	100г	0,2	0,2	0,2	54	54	54	54	54	54
Никотиновая кислота	100мл	1	1	1	90	90	90	90	90	90
Пиридоксин-HCl	100мл	1	1	1	40	40	40	40	40	40
Тиамин -HCl	100мл	1	1	1	30	30	30	30	30	30
Сахароза	кг	0,2	0,2	0,2	451	451	451	90	90	90
Агар-агар	кг	0,1	0,1	0,1	3650	3650	3650	365	365	365
6-Безидамино-пуридин	100г	0,1	0,1	0,1	19800	19800	19800	-	198	198

Нафтилукусная кислота	100г	0,1	0,1	0,1	3850	3850	3850	-	385	385
Сулема	100г	0,1	0,1	0,1	804	804	804	80,4	80,4	80,4
Перекись водорода, 37 %	кг	0,5	0,5	0,5	497	497	497	248,5	248,5	248,5
Спирт этиловый, 96%	л	2	2	2	900	900	900	1800	1800	1800
Фильтровальная бумага	упак.	1	1	1	400	400	400	400	400	400
Латексные перчатки	шт.	15	15	15	11	11	11	165	165	165
Вата хирург н/с	кг	1	1	1	157,3	157,3	157,3	157,3	157,3	157,3
Колба, 500 мл	шт.	3	3	3	179	179	179	537	537	537
Стакан химический	шт.	7	7	7	43	43	43	301	301	301
<b>Итого:</b>								<b>4105</b>	<b>5225</b>	<b>5225</b>

#### 4.4.2 Расчет затрат на оборудование

Расчет сводится к определению амортизационных отчислений, так как оборудование было приобретено до начала выполнения данной работы и эксплуатировалось ранее, поэтому при расчете затрат на оборудовании учитываем только рабочие дни по данной теме. Амортизация оборудования рассчитывается по формуле [44]:

$$A = \frac{C_n \times H_a \times n}{100 \times k} \quad (6)$$

где  $C_n$  - первоначальная стоимость оборудования;  $H_a$  -

норма амортизации, %;

$n$  - число проработанных месяцев;  $k$  - количество месяцев в году.

Таблица 22 - Амортизация используемых приборов

№ п/п	Наименование прибора	Стоимость * С, руб.	Количество, шт.	Норма амортизации, $H_a$ , %	Амортизация А, руб.
1	Суховоздушный шкаф-стерилизатор Binder	723000,00	1	10	24100
2	Ламинарный шкаф SC2-4A1 Streamline Esco	750000,00	1	15	37500

3	Цифровой автоклав WiseCube	477400,00	1	10	15913
4	Шкаф термостатируемый WiseCube	107669,49	1	10	3589
6	Дистиллятор 3,5 л/ч	34500	1	30	3450
7	Весы лабораторные аналитические	132943	1	10	4431
8	Одноканальный дозатор «ВЮШТ» 100-1000 мкл	4000	1	1	4000
9	Одноканальный дозатор «ВЮНІТ» 10 - 100 мкл	4202	1	1	4202
10	Плитка нагревательная НР- 20А	15200	1	10	380
Итого амортизационные отчисления с учетом дней использования оборудования					97565

#### 4.4.3 Расчет основной заработной платы

Основная заработная плата ( $Z_{\text{осн}}$ ) находится по формуле [46]:

$$Z_{\text{осн}} = Z_{\text{дн}} \times T_{\text{раб}} \quad (7)$$

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

$T_{\text{раб}}$  – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн.;

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

Среднедневная заработная плата в свою очередь рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_{\text{м}} \times M}{F_{\text{д}}} \quad (8)$$

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

$M$  – количество месяцев работы без отпуска в течение года: при отпуске в 48 раб. дня  $M = 10,4$  месяца, 6-дневная неделя;

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

Таблица 23 - Баланс рабочего времени за 2020 год

Показатель рабочего времени	Руководитель	Бакалавр
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней		
- выходные дни	44	44
- праздничные дни	14	14
Потери рабочего времени		
- отпуск	48	48
- невыходы по болезни	6	6
Действительный годовой фонд рабочего времени	253	253

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_M = Z_{TC} \times (1 + k_{пр} + k_d) \times k_p \quad (9)$$

где:  $Z_{TC}$  – заработная плата по тарифной ставке, руб.;

$k_{пр}$  – премиальный коэффициент, равный 0,3 (т.е. 30% от  $Z_{TC}$ );

$k_d$  – коэффициент доплат и надбавок составляет примерно 0,2 – 0,5

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

Расчет основной заработной платы приведен в таблице 24.

Таблица 24 – Расчет основной заработной платы

Категория	$Z_{TC}$ , руб.	$k_d$	$k_p$	$Z_M$ , руб	$Z_{дн}$ , руб.	$T_{р.раб.}$ дн.	$Z_{осн}$ , руб.
Руководитель							
ППС3	35120	0,35	1,3	75332	3096	16	48263
Инженер							
УВП (1квал. уровень)	12130	0,35	1,3	26019	1049	104	109096
Консультант по ЭЧ							
ППС3	35120	-	1,3	45656	1929	2	3858
Консультант по СО							
ППС1	27770	-	1,3	36010	1440	2,5	3858

Общая заработная плата исполнителей работы представлена в таблице 25.

Таблица 25 – Общая заработная плата исполнителей

Исполнители	З <sub>осн</sub> , руб	З <sub>доп</sub> , руб	З <sub>зп</sub> , руб
Научный руководитель	48263	7239	88808,8
Бакалавр	109096	16364	125450
Консультант по ЭЧ	4880	732	5612
Консультант СО	3858	579	4437

#### 4.4.4 Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления)

Отчисления на социальные нужды составляет 30,2% от суммы заработной платы всех сотрудников. Отчисления на социальные нужды составляет: отчисления в пенсионный фонд 22%, отчисление на социальное страхование 2,9%, отчисление на медицинское страхование 5,1%, 0,2% страхование жизни, от несчастного случая.

Рассчитываем затраты на отчисление на социальные нужды по формуле:

$$Z_{\text{о.с.н}} = 0,302 \times (Z_{\text{осн.рук.}} + Z_{\text{осн.инж.}}) \quad (10)$$

где:  $Z_{\text{о.с.н}}$  – затраты на отчисления на социальные нужды, руб.

$$Z_{\text{о.с.н}} = 0,302 \times (48263 + 109096 + 4880 + 3858) = 49853$$

Отчисления во внебюджетные фонды представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнители	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.
Научный руководитель	48263	7239
Бакалавр	109096	16364
Консультант по ЭЧ	3858	579
Консультант СО	3858	579

Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды	0,302
ИТОГО:	49853

#### 4.4.5 Накладные расходы

Накладные расходы учитывают прочие затраты организации, не попавшие в предыдущие статьи расходов: печать и ксерокопирование графических материалов, оплата услуг связи, электроэнергия, транспортные расходы и т.д. Их величина определяется по следующей формуле:

$$Z_{\text{накл}} = k_{\text{нр}} \cdot (\text{сумма статей } 1 \div 5) \quad (11)$$

где:  $k_{\text{нр}}$  – коэффициент, учитывающий накладные расходы.

Величину коэффициента накладных расходов  $k_{\text{нр}}$  допускается взять в размере 16%.

#### 4.4.6 Формирование бюджета затрат НИИ

Рассчитанная величина затрат научно-исследовательской работы является основой для формирования бюджета затрат проекта, который при формировании договора с заказчиком защищается научной организацией в качестве нижнего предела затрат на разработку научно-технической продукции.

Определение бюджета затрат на выполнение научно исследовательского проекта приведен в таблице 27.

Таблица 27 – Расчет бюджета затрат НТИ

Наименование статьи	Сумма, руб.			Примечание
	Исп.1	Исп.2	Исп.3	
1. Материальные затраты НТИ	<b>4105</b>	<b>5225</b>	<b>5225</b>	Табл.21
2. Затраты на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	97565	97565	97565	Табл.22
3. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	165075	165075	165075	Табл.24
4. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	24761	24761	24761	Табл.25
5. Отчисления во внебюджетные фонды	49853	49853	49853	Табл.26
6. Накладные расходы	54855	55034	55034	16 % от суммы ст.1-5
7. Бюджет затрат НТИ	392109	392288	392288	Сумма ст. 1-6

#### **4.5 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования**

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

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\text{финр}}^{\text{исп}i} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\text{max}}} \quad (12)$$

где:  $I_{\text{финр}}^{\text{исп}i}$  – интегральный финансовый показатель разработки;

$\Phi_{pi}$  – стоимость i-го варианта исполнения;

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

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в разгах либо соответствующее численное удешевление

стоимости разработки в размах (значение меньше единицы, но больше нуля).

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

$$I_{pi} = \sum a_i \times b_i \quad (13)$$

где:  $I_{pi}$  – интегральный показатель ресурсоэффективности для  $i$ -го варианта исполнения разработки;

$a_i$  – весовой коэффициент  $i$ -го варианта исполнения разработки;

$b_i^a, b_i^p$  – балльная оценка  $i$ -го варианта исполнения разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

$n$  – число параметров сравнения.

Результаты по расчету интегрального показателя ресурсоэффективности представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Критерии	Весовой коэффициент параметра	Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3
1. Стимулирование роста	0,30	3	3	5
2. Материалоемкость	0,25	4	5	5
3. Энергоемкость	0,20	4	4	4
4. Простота подготовки	0,25	3	5	5
ИТОГО:	1	3,45	4,2	4,8

$$I_{p \text{ исп.1}} = 3 \cdot 0,30 + 4 \cdot 0,25 + 4 \cdot 0,20 + 3 \cdot 0,25 = 3,45;$$

$$I_{p \text{ исп.2}} = 3 \cdot 0,30 + 5 \cdot 0,25 + 4 \cdot 0,20 + 5 \cdot 0,25 = 4,2;$$

$$I_{p \text{ исп.3}} = 5 \cdot 0,30 + 5 \cdot 0,25 + 4 \cdot 0,20 + 5 \cdot 0,25 = 4,8.$$

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

$$I_{\text{исп } i} = \frac{I_{\text{р-исп } i}}{I_{\text{финр}}} \quad (14)$$

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

$$\mathcal{E}_{\text{ср}} = \frac{I_{\text{исп } 1}}{I_{\text{исп } 2}} \quad (15)$$

где  $\mathcal{E}_{\text{ср}}$  – сравнительная эффективность проекта;

$I_{\text{исп } 1}$  – интегральный показатель разработки;

$I_{\text{исп } 2}$  – интегральный технико-экономический показатель аналога.

Сравнение значений интегральных показателей эффективности позволяет понять и выбрать более эффективный вариант решения поставленной в бакалаврской работе технической задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности. Наглядно данное сравнение представлено в таблице 29.

Таблица 29 – Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Исп.1	Исп.2	Исп. 3
1	Интегральный финансовый показатель	0,986	1	1
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности	3,45	4,2	4,8
3	Интегральный показатель эффективности	3,50	4,2	4,8
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	0,73	0,875	1

Сравнение значений интегральных показателей эффективности показывают, что наша разработка нового метода получения каллусной культуры *Alfredia cernua* (исп.3) имеет более эффективный вариант решения поставленной технической задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности.

## **5 Социальная ответственность**

Целью данной выпускной квалификационной работы является получить каллусную культуру растения *Alfredia cernua*. Получение биологически активных веществ с использованием каллусных культур является актуальным перспективным направлением биотехнологии. Создание лекарственных препаратов на основании метода *in vitro* имеет ряд преимуществ перед использованием сырья растительного происхождения, такие как неограниченность сезонностью и ареалом произрастания, возможность стандартизировать получения растительного сырья, а также возможность получения более ценных БАВ. Разработанный метод может быть использован в фармацевтической практике.

Работа проводилась в учебно-исследовательской микробиологической лаборатории отделения химической инженерии НИ ТПУ, снабженной всем необходимым для работы оборудованием.

В настоящем разделе рассматриваются вопросы охраны труда, связанные с работой в лаборатории, мероприятия по предотвращению воздействия на здоровье работников опасных и вредных факторов, а также возможное влияние на окружающую среду и потенциальные ЧС. Четкое следование правилам безопасности, соблюдение требований к проведению опытов, грамотная организация рабочего процесса помогут полностью избежать возникновения аварийных ситуаций, травм и отравлений.

### **5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности**

Право работников на труд в условиях, отвечающих требованиям охраны труда, гарантировано главой 36 Трудового Кодекса Российской Федерации. Федеральный закон Российской Федерации N 426-ФЗ устанавливает правовые и организационные основы и порядок проведения специальной оценки условий труда, определяет правовое положение, права, обязанности и ответственность участников оценки условий труда. СН

2.2.4/2.1.8.562 – 96 нормирует шум на рабочих местах. Нормы СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278 – 03 устанавливают гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещённому освещению.

Для квалифицированного использования многочисленных практических методов работы работник должен изучить и прочно усвоить основы добросовестного и сознательного обращения с химическими веществами. Последовательно и точно применяя приобретенные знания и опыт, химик должен уметь работать со всеми химическими веществами, известными как «опасные», а также с потенциально опасными веществами, не подвергая при этом риску свое окружение и себя.

Работа проводилась в учебно-исследовательской микробиологической лаборатории Отделения химической инженерии НИ ТПУ, снабженной всем необходимым для работы оборудованием. Данное помещение оборудовано рабочими местами для проведения химических экспериментов, вентиляционной системой для работы с летучими веществами, имеется ряд аппаратов для проведения опытов и дальнейшего анализа результатов, шкафы для хранения лабораторной посуды. При лаборатории так же есть весовая комната, моечная. Рабочее место - лабораторный стол и ламинарный шкаф.

Основные меры по обеспечению безопасности в рабочей зоне для проектируемого решения регламентируются нормативной документацией, в частности [47], которая устанавливает следующие необходимые меры:

- достижение возраста 18 лет и медицинское освидетельствование для приема на работу в аналитическую лабораторию;
- обязательное проведение вводного и периодического (дважды в год) инструктажей;
- обязательное проведение внеплановых инструктажей при переводе сотрудников на новые виды работ; регистрация проведения инструктажей в журнале;

- назначение в каждое рабочее помещение ответственного за соблюдение правил техники безопасности;
- обязательная обеспеченность всех сотрудников ИСЗ и необходимой спецодеждой.

В соответствии с [48], необходимо соблюдать правила обращения с вредными веществами, чтобы их концентрация в воздухе рабочей зоны не превышала предельно допустимого уровня, указанного в нормативной документации.

## 5.2 Производственная безопасность

Все виды негативных воздействий, формируемых в процессе трудовой деятельности, разделяют в соответствии с ГОСТ 12.0.003—74 на следующие группы: физические, химические, биологические и психофизиологические. При работе в лаборатории на человека могут воздействовать следующие опасные производственные факторы (Таблица 30) [49].

Таблица 30 - Возможные опасные и вредные факторы

Факторы [50]	Этапы работы		Нормативные документы
	Исследование	Обработка результатов	
1.Использование токсичных веществ	+	+	ГОСТ 12.1.005-88 [43]
2.Отклонение показателей микроклимата	+	+	ГОСТ 12.1.007-76 [44] ГОСТ 9805-84 [45] СанПиН 2.2.4.548-96[46]
2.Превышение уровня вибрации	+	+	СП 60.13330.2016 [47]
3.Отсутствие или недостаток естественного света	+	+	ГОСТ 12.1.012-90 [48] СН 2.2.4/2.1.8.566–96[49] СП 52.13330.2016 [50]
4.Недостаточная освещенность рабочей зоны	+	+	ГОСТ 12.1.019-2017 [51] ГОСТ 12.1.030-81 [52] ГОСТ 12.4.011-89[53]
5.Повышенное значение напряжения в электрической цепи, замыкание которой может произойти через тело человека	+	+	ПНД Ф 12.13.1-03[54]

### Работа с вредными веществами

В представленной работе объект исследования не является токсичным веществом, но в процессе работы используются токсичные реактивы, их характеристика указана в таблице 31.

Таблица 31 – Характеристика токсичных веществ

Вещества	ПДК, мг/м <sup>3</sup>	Класс опасности	Общая характеристика токсического действия
Нитрат аммония	Более 10	4	При попадании на части тела человека, которые имеют повышенную потливость, может вызывать дерматит и раздражение.
Нитрат калия	1,1-10,0	3	Опасен при вдыхании, попадании на кожу и в глаза.
Кальций хлористый 2-водный	1,1-10,0	3	При систематическом воздействии раздражает и осушает кожу, особенно раздражающе действует на слизистые оболочки верхних дыхательных путей и глаз.
Магний сернокислый 7-водный	Более 10	4	При попадании на кожу вызывает кожные заболевания.
Калий фосфорнокислый 1-замещенный	1,1-10,0	3	Вызывают злокачественные образования, заболевания ЖКТ
Иодид калия	1,1-10,0	3	Может привести к угнетению функции щитовидной железы, гастроэнтерит
Борная кислота	1,1-10,0	3	Нарушают клеточный обмен, в особенности обмен нервных клеток.
Марганец сернокислый	1,1-10,0	3	Вызывает заболевания ЖКТ
Цинк сернокислый 7-водный	0,1-1,0	2	Повышают заболеваемость органов дыхания, пищеварения, кровообращения
Натрий молибденов окислый 2-водный	1,1-10,0	3	Действует на нервную систему, нарушает обмен веществ

Медь сернокислая 5-водная	1,1-10,0	3	Вызывает желудочно-кишечные расстройства, кашель, затрудненное дыхание, боли в животе, тошнота, рвота, покраснение кожи, боль, отек, краснота, слезотечение.
Кобальт Хлористый (II) 6-водный	0,1-1,0	2	Потерю аппетита, рвоту, покраснение лица и конечностей, а также острый дерматит.
Железо сернокислое 7-водное	1,1-10,0	3	Вызывает тошноту, рвоту, диарею, незначительное раздражение кожи.
Динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты	0,1-1,0	2	Может вызвать раздражение кожных покровов, слизистых оболочек глаз и дыхательных путей и симптомы бронхита.
Серная кислота	0,1-1,0	2	Раздражает дыхательные пути, вызывает ожоги кожи
Хлорид натрия	1,1-10,0	3	Вызывает гипертонию, мигрень, набор лишнего веса
Гидроксид аммония	1,1-10,0	3	Раздражает слизистую оболочку пищеварительного тракта
Никотиновая кислота	Более 10	4	Аллергические реакции, раздражения
Пиридоксин -HCl	Более 10	4	Аллергические реакции, развивается анемия, нарушается координация движений и появляется онемение конечностей
Тиамин -HCl	Более 10	4	Аллергические реакции и спазматические головные боли, тошнота, рвота, крапивница
Сулема	0,0001	1	Поражает кроветворную, ферментативную, нервную системы и почки

Лаборатория снабжена приточно-вытяжной вентиляцией и вытяжным шкафом для защиты органов дыхания и слизистой оболочки глаз. Для предотвращения попадания вредных веществ внутрь и на кожу, необходимо использовать средства индивидуальной защиты: перчатки, маски и халаты.

### *Микроклимат в химической лаборатории*

Микроклимат характеризуется температурой воздуха, его влажностью и скоростью движения, а также интенсивностью теплового излучения. Длительное воздействие на человека неблагоприятных метеорологических условий резко ухудшает его самочувствие, снижает производительность труда и приводит к заболеваниям.

В ГОСТ 12.1.005—88 указаны оптимальные и допустимые показатели микроклимата в производственных помещениях. Для микробиологической лаборатории предусмотрены санитарные нормы, представленные в таблице 32.

Таблица 32 - Оптимальные показатели микроклимата в лаборатории [51]

Период года	Температура воздуха, °С	Температура поверхностей, °С	Относительная влажность воздуха, %	Скорость движения воздуха, м/с
Холодный	19-21	18-22	60-40	0,2
Теплый	20-22	19-23	60-40	0,2

### *Уровень шума и вибрации*

Шум с уровнем звукового давления до 30- 45 дБ привычен для человека и не беспокоит его. Повышение уровня звука до 40-70 дБ создает дополнительную нагрузку на нервную систему, вызывает ухудшение самочувствия и при длительном воздействии может стать причиной неврозов. Длительное воздействие шума с уровнем свыше 80 дБ может привести к ухудшению слуха — профессиональной тугоухости.

По уровню шума, локальной и общей вибрации лабораторию 2 корпуса НИ ТПУ можно отнести к допустимому классу, ПДУ <25 дБ, позволяющему безопасно выполнять работу. В работе используется оборудование, обладающее вибрационным воздействием, поэтому вибробезопасность труда в соответствии с [52] должна быть обеспечена:

- улучшением условий труда (в т.ч. снижением или исключением действия сопутствующих неблагоприятных факторов);
- применением средств индивидуальной защиты от вибрации;

- введением и соблюдением режимов труда и отдыха, в наибольшей мере снижающих неблагоприятное воздействие вибрации на человека;
- санитарно-профилактическими и оздоровительными мероприятиями, предусмотренными рекомендациями Минздрава РФ.

#### *Производственное освещение*

От освещенности зависит здоровье, сопротивляемость стрессам, усталости, физическим и умственным нагрузкам. Следует очень четко соблюдать требования по нормам, ведь от этого зависит экологическая обстановка и физическое и психологическое здоровье работающих лаборатории. Норма освещения химической лаборатории составляет 400 люкс [53].

Согласно в химических лабораториях организовано естественное освещение через светопроемы, обеспечивающее КЕО не ниже 1.5%. Искусственное освещение представлено комбинированной системой.

Согласно [53] для обеспечения нормируемых значений освещенности в помещениях следует проводить чистку стекол оконных рам и светильников не реже двух раз в год и проводить своевременную замену перегоревших ламп.

#### *Электробезопасность и пожаровзрывобезопасность*

Лаборатория относится к категории особо опасных помещений по возможности поражения людей электротоком [54], так как характеризуется наличием химически активных и органических сред, разрушающих изоляцию и токоведущие части электрооборудования, а также повышенной влажностью при работе автоклава. В рабочих зонах лаборатории используется электрооборудование и электроприборы, которые могут являться источником электрического воздействия. Оборудование работает от сети с напряжением 220 В, автоклав – от сети с напряжением 380 В. Электробезопасность работников лаборатории и студентов должна обеспечиваться выполнением следующих мероприятий:

- соблюдение соответствующих расстояний до токоведущих частей;
- ограждение токоведущих частей;

- заземление оборудования;
- применение предупреждающих надписей и плакатов;
- по окончании рабочего дня необходимо снять напряжение с отдельных приборов, а также отключить все щитки на лабораторных столах и общий рубильник за пределами лаборатории.

Пожаро- и взрывоопасность в лаборатории обусловлена наличием оборудования, работающего под давлением, а также наличием легковоспламеняющихся жидкостей, электроприборов и электрооборудования. По классификации, приведенной в [55], микробиологическая лаборатория относится к пожаровзрывоопасным помещениям группы В1.

Общие меры по обеспечению пожаровзрывобезопасности и устранению возможных источников пожаров и взрывов следующие:

- запрещается держать ЛВЖ и горючие вещества вблизи открытого огня, в теплом месте или вблизи нагревательных приборов;
- запрещается нагревать ЛВЖ и горючие вещества на открытом огне, на сетке, вблизи огня или открытых сосудах;
- следует с осторожностью обращаться с оборудованием, работающим под давлением (автоклав) и контролировать значение давления по встроенному манометру.

### **5.3 Экологическая безопасность**

В ходе работы используются химические соединения, которые могут оказывать вредное влияние на окружающую среду [56], однако это может происходить лишь при значительных потерях веществ (испарения) в атмосферу, а поскольку для анализа используются небольшие количества соединения, то воздействие на окружающую среду отсутствует.

Вредное воздействие на гидросферу [57] может оказывать химическое и биологическое загрязнение водотоков в результате удаления биологических,

неорганических и органических отходов в канализационную сеть населенных пунктов. Раздельный сбор отходов признан основным стратегическим способом снижения остроты экологических проблем. Применительно к лабораторным отходам данного исследования предлагается выделить следующие виды сливов:

- сливы сильных концентрированных (10% и более) кислот;
- сливы сильных концентрированных (10% и более) щелочей;
- сливы водных разбавленных (менее 10%) кислот, щелочей, солей;
- сливы элементоорганических соединений.

В ходе исследования в лаборатории образуются твердые отходы в виде бытового мусора, выбрасываемого в урну, и твердый биоматериал класса Б [58]. Твердый биоматериал должен быть удален в одноразовый пакет с надписью «медицинские отходы». Транспортирование всех видов отходов класса Б вне пределов медицинского подразделения осуществляется только в одноразовой упаковке после ее герметизации. Сбор и утилизацию отходов производят специальные службы.

#### **5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях**

Вероятными ЧС, характерными для данного типа работ и зданий, при разработке проектируемого решения могут стать [59]: пожар, взрыв, поражение электрическим током, ураган, разряды атмосферного электричества. Пожар может возникнуть в результате нерегламентированного хранения и транспортирования взрывчатых веществ, легковоспламеняющихся жидкостей, переохлажденных и нагретых жидкостей. В лаборатории использование легковоспламеняющихся жидкостей происходит в малых количествах, поэтому возможный пожар может быть охарактеризован как локальный. Для его ликвидации необходимо воспользоваться огнетушителем, песком или асбестовым одеялом.

О каждом несчастном случае или чрезвычайной ситуации в

университете пострадавший, очевидец либо участник происшествия после оказания первой помощи незамедлительно, используя все доступные средства связи, извещает руководителя (начальника подразделения).

Оказание первой помощи пострадавшим осуществляется в соответствии с внутренней инструкцией организации «Оказание первой помощи в чрезвычайных ситуациях».

### **Вывод по разделу**

В данном разделе рассмотрены правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности работы при выполнении исследования, выявлены вредные и опасные факторы физической, химической и биологической природы, а также разработаны мероприятия по снижению или ликвидации действия данных факторов на работников лаборатории. Описано возможное влияние различных факторов на окружающую среду: атмосферу, гидросферу и литосферу, рассмотрены способы минимизации их воздействия. Также рассмотрены возможные чрезвычайные ситуации как антропогенной, так и неантропогенной природы, профилактические мероприятия для их предотвращения и ликвидации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы исследовали влияние стерилизующего агента на всхожесть семян и установили, что оптимальным методом стерилизации семян является их выдерживание в 0,1%-ном растворе сулемы в течение 60 с. Получили стерильное растение Альфредии поникшей. Первые признаки всхожести наблюдались у семян на безгормональной питательной среде МС при температуре 25 °С, влажности 70% и с доступом дневного света через 14-18 дней с начала эксперимента.

Исследовали влияние гормонального состав (НУК и 6-БАП) на формирование каллусной ткани Альфредии поникшей в диапазоне концентраций НУК 0,6-10 мг/л и 6-БАП 0,3-5 мг/л. Появление каллусообразования обнаружили через 14 дней после переноса экспланта на гормональную питательную среду МС. Установили, что наиболее оптимальной концентрацией гормонов в питательной среде МС для получения каллусной ткани является концентрация НУК 1 мг/л и 6-БАП 2 мг/л.

Исследовали влияние света на формирование каллуса и определили, что культивирование каллусной культуры Альфредии поникшей необходимо проводить в темноте.

Также в ходе данной работы были определены ресурсная, финансовая, социальная и экономическая эффективности исследования и рассчитан бюджет научно-исследовательского проекта. Рассмотрены условия проведения экспериментов и вредные факторы, возникающие в процессе работы и возможность защиты от них.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Осадчий С. А. Дисс. Потенциально ценные для медицины нативные и синтетически трансформированные алкалоиды, кумарины и гликозиды флоры Сибири и Алтая // Док. хим. наук. Новосибирск: Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, 2008, - 220 с.
2. Русакова, О. А., Ральчеко, И. В., Герберт, И. Я., Вердиева, С. И. Изучение аптечного ассортимента фитопрепаратов // Фармация и фармакология. - 2015. - 6(13). - С. 54-59.
3. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений // Учебно-методическое пособие. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003. – 57 с.
4. Мустафин Р.Н., Шилова И.В., Суслов Н.И. «Антидепрессантные и анксиолитические свойства экстракта *Alfredia cernua*», «Растительные ресурсы» т. 47 вып. 3 – С. 130-136.
5. Лавренов В.К., Лавренова Г.В. «Энциклопедия лекарственных растений народной медицины», Санкт-Петербург, Издательский дом «Нева», 2003 – 15 с.
6. 20.Анатомическое строение надземной части альфредии поникшей / Н. В. Кувачева [и др.] // Фармация – 2006. – № 6. – С. 10-12.
7. Антиоксидантные свойства биологически активных веществ *Alfredia cernua* и *Alfredia nivea* (Asteraceae) / И. В. Шилова [и др.] // Раст. ресурсы. – 2008. – Т. 44, вып. 1. – С. 114-121.
8. Амельченко, В. П. Особенности развития и компонентный состав *Alfredia cernua* (Asteraceae) в условиях интродукции (г. Томск) / В. П. Амельченко, И. В. Шилова, Н. В. Кувачева // Раст. ресурсы. – 2009. – Т. 45, вып. 2. – С. 23- 31.
9. Классификация биологически активных веществ лекарственных растений [Электронный ресурс]// Режим доступа: URL:

<https://znaytovar.ru/new732.html>, свободный. (дата обращения: 01.04.2020).

10. Разработка ноотропных средств на основе растений Сибири / И. В. Шилова, И. А. Самылина, Н. И. Суслов; Сибирский государственный медицинский университет [и др.]. — Томск: Печатная мануфактура, 2013. — 267 с.
11. Мустафин Р.Н., Шилова И.В., Суслов Н.И., Кувачев Н. В. И др. «Ноотропная активность экстрактов из дикорастущей и культивируемой альфредии поникшей», Бюллетень экспериментальной биологии и медицины т. 150, № 9, 2010 г. — С. 302-304.
12. Состояние и перспективы развития фармацевтического рынка лекарств ноотропного действия / И. В. Шилова [и др.] // Сиб. вестн. психиатрии и наркологии. — 2008. — № 2. — С. 128-130.
13. Шилова, И. В. Рациональные подходы к поиску и созданию ноотропных средств растительного происхождения / И. В. Шилова // Вестн. РУДН. Сер. Медицина. — 2007. — № 6. — С. 236-240.
14. Влияние экстрактов альфредии поникшей на поведение, память и работоспособность в эксперименте / Р. Н. Мустафин [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. — 2010. — Т. 73, № 1. — С. 16-18.
15. Яковлевич В.Ф. Лекарственные растения Урала и Западной Сибири/ В.Ф. Яковлевич; под ред. Т. Кайсиной. — М.: Литур, 2010. — 384 с.
16. Носаль М.А., Носаль И.М. Лекарственные растения и способы их применения в народе. — Л.: Научный центр проблем диалога, 1991. — 240 с.
17. Шилова, И. В. Химический состав и ноотропная активность растений Сибири / И. В. Шилова, Н. И. Суслов, И. А. Самылина. — Томск: Изд-во Томского ун-та, 2010. — 236 с.
18. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе. М.: ФБК– ПРЕСС, 1999. — 160 с.

19. Загребельный С.Н. Биотехнология. Часть 1. Культивирование продуцентов и очистка продуктов. - Новосибирск.: Новосиб. гос. ун-т, 2000. - 108 с.
20. Катаева Н.В., Аветисов В.А. Клональное размножение в культуре ткани / Культура клеток растений. - М.: Наука, 1981. – С. 137-149.
21. Изучение каллусной ткани *Aconitum septentrionale* Koelle: физиологические и генетические аспекты // И.Г. Мигранова автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Уфа – 2000.
22. Биотехнологические основы выращивания клеточной культуры стевфании гладкой (*stephania glabra*), как продуцента алкалоида стефарина // Т.А. Савина автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Москва – 1992.
23. Nhut D. T., Luan V. Q., Binh N. V., Phong P. T., Huy B. N., Ha D. T., et al. The effects of some factors on in vitro biomass production of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) and preliminary analysis of saponin content // J. Biotechnol. Viet. – 2009. - P. 365-370.
24. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. - 160 с.
25. Носов А.М. Культура клеток высших растений - уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений -1999. - т.46, №6. – С. 837-844.
26. Носов А. М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. – М.: БИОНОМ, 2011. – С. 386-403.
27. Багратишвили Д.Г., Запрометов М.Н., Бутенко Р.Г. Получение суспензионной культуры клеток чайного растения // Физиология растений, 1979, т.26, вып.2, – С. 449–451.

28. Murashige T. Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Culture / T. Murashige, F.A. Skoog // *Physiol. Plant.* - 1962. - V. 15, № 13. - P. 473-497.
29. Смирнова Ю. Н., Решетняк О. В., Смоленская И. Н., Воеводская С. Ю., Носов А. М. Влияние регуляторов роста на синтез гинзенозидов в культуре клеток двух видов женьшеня // *Физиология растений.* – 2010. – Т. 57, № 3. – С. 458-466.
30. Ляпкина Н.С., Хадеева Н.В., Шаин С.С., Майсурян А.Н. Разработка методов культивирования тканей копеечника *in vitro* // *Биотехнология.* 1999. -№ 1. – С. 55-61.
31. Бондарев Н.И., Носов А.М., Корниенко А.В. Влияние экзогенных регуляторов роста на каллусогенез и рост культивируемых клеток *Stevia rebaudiana* // *Физиология растений,* –1998. Т. 45. - №6. – С. 888-892.
32. Kataeva N.V., Alexandrova I.G., Butenko R.G., Dragavtzeva E. // Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro* // *Plant Cell Tissue Organ Cultures,* 1991, v.27. - P.149- 154.
33. Ramachandra Rao S. and Ravishankar G. A., Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnol. Adv.* – 2002. – vol. 20. – P. 101-153.
34. Tuan T. T., Dieu-Hien T., Hoang C. N., Dieu-Thai T., Huyen-Trang N. T., Giap D. D., Ho N. H. Biomass accumulation of *Panax vietnamensis* in cell suspension cultures varies with addition of plant growth regulators and organic additives // *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine,* 2017. - 10(9). - P. 907-915
35. Small J. G., Garner C. Gibberellin and stratification required for the germination of *Erica junonica*, an endangered species. — *Z.: Pflanzenphysiol.,* 1980. - Bd 99, №2, S. – P. 179-182.

36. Шумихин С.А. Оптимизация отдельных этапов микроклонального размножения георгии культурной: стерилизация эксплантов//Вестник пермского университета. – 2004. - №2. - С. 61-63.
37. Косолапова А.С. Исследование влияния ультразвука на отдельные стадии в технологии культуры растительных клеток и тканей *in vitro*. Стерилизация эксплантов/ А.С. Косолапова, М.Э. Ламберова//Химия растительного сырья. – 2010. - №2. – С.179-180.
38. Staden J. van, Olatoye S. T., Hall M. A. Effect of light and ethylene upon cytokinin levels in seed of *Spergula arvensis*. — J.: Exp. Bot, 1973. - vol. 24, №81. - P. 662-666.
39. Головацкая И.Ф. Влияние света на баланс фитогормонов и рост проростков овса / Головацкая И.Ф., Карначук Р.А., Никитина А.В., Пенкина Ю.В., Мусатенко Л.И. // Физиология и биохимия культурных растений. – Томск, 2000. - Т.32 – 453 с.
40. Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауксины в культурах тканей и клеток растений. – Новосибирск, 1990.
41. Егорова, Н.А., Разработка биотехнологических приемов микроразмножения *in vitro* для *Lavandula angustifolia* Mill. / Н.А. Егорова, И.В. Ставцева // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – №4 (55). – С. 304–309.
42. Головацкая И.Ф. Регуляция роста и развития растений *Brassica oleracea* L. с помощью коррекции солнечного излучения/И.Ф. Головацкая, А.С. Минич, И.Б. Минич // Биология. - Вестн. Том. гос. ун-та, 2012. - № 2 (18). - С. 151–165.
43. Рыжакина Т.Г. Экономика и управление производством. Расчет экономической части дипломного проекта: метод. указ. для студентов хим. спец. ИДО. - Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2007. – 22 с.
44. Фатхудинов Р. А. Инновационный менеджмент. – СПб.: Питер, 2008. – 448 с.

45. Барановский А.М., Кожевников Н.Н., Пирадова Н.В. Экономика промышленности: учеб. пособие для вузов. – М.: Изд-во МЭИ, 2007. – 345 с.
46. Волков О.И. Экономика предприятия. – М.: Инфра, 2013. – 690 с.
47. ПНД Ф 12.13.1-03 Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения) / Министерство природных ресурсов РФ. - М., 2003.
48. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/5200233> (дата обращения 15.05.2020).
49. Федеральный закон Российской Федерации от 28 декабря 2013 г. N 426-ФЗ "О специальной оценке условий труда";
50. ГОСТ 12.0.003-2015 «Опасные и вредные производственные факторы. Классификация». Официальное издание. М.: Стандартинформ, 2016.
51. СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений. – URL: <https://base.garant.ru/4173106/> (дата обращения 18.05.2020).
52. ГОСТ 12.1.012-90 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вибрационная безопасность. Общие требования». – URL: <http://docs.cntd.ru/document/5200329/> (дата обращения 10.05.2020)
53. СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. М.: Стандартинформ, 2017. – 121 с.
54. Правила устройства электроустановок (ПУЭ). Седьмое издание. – URL: <https://files.stroyinf.ru/Data1/7/7177/> (дата обращения 05.05.2020).
55. СП 12.13130.2009 Определение категорий помещений, зданий и наружных установок по взрывопожарной и пожарной опасности. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200071156> (дата обращения 15.05.2020).
56. ГОСТ 32419-2013 Классификация опасности химической продукции. Общие требования. – URL <http://docs.cntd.ru/document/1200107879> (дата обращения 15.05.2020).

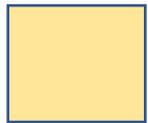
- 57.ГОСТ 17.1.3.06-82. Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к охране подземных вод. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200004387> (дата обращения 15.05.2020).
- 58.ГОСТ 30775-2001 Ресурсосбережение. Обращение с отходами. Классификация, идентификация и кодирование отходов. Основные положения. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200028877> (дата обращения 15.05.2020).
- 59.Федеральный закон от 21 декабря 1994 г. № 68-ФЗ. О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера (с изменениями на 23 июня 2016 года). – URL: <http://docs.cntd.ru/document/9009935> (дата обращения 15.05.2020).

## Приложение А

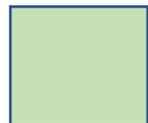
Таблица 33 – Календарный план-график проведения НИР

№	Вид работы	Исполнитель	Тк <sub>i</sub> , дней	Продолжительность выполнения работы											
				февраль			март			апрель			май		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	Составление и утверждение технического задания	Руководитель	1												
2	Выбор направления исследования	Инженер	6												
3	Календарное планирование работ	Руководитель, инженер	3												
4	Изучение литературы	Инженер	10												
5	Проведение экспериментов	Инженер	70												
6	Оценка эффективности полученных результатов	Руководитель, инженер	10												

7	Составление пояснительной записки	Инженер	14															
8	Разработка презентации	Инженер	6															



- Инженер



- Руководитель