	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный аграрный университет»	Методические рекомендации
		Б1.О.29 БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

Б1.О.29 БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ

Направление подготовки
35.03.04 Агрономия

Профиль подготовки
Биотехнология в растениеводстве

Квалификация (степень) выпускника
Бакалавр

Уфа 2024

Рекомендовано к изданию методической комиссией факультета агротехнологий и лесного хозяйства 21 марта 2024 г. (протокол 6).

Составители: к.б.н. Гарифуллина Д.В.

Ответственный за выпуск:

Заведующий кафедрой растениеводства, селекции растений и биотехнологии,
к.с.-х. н., доцент Алимгафаров Р.Р.

г. Уфа, ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ,
кафедра растениеводства, селекции растений и биотехнологий

РАЗДЕЛ I

УСЛОВИЯ И ТЕХНИКА ВЫРАЩИВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОРГАНОВ, ТКАНЕЙ И КЛЕТОК *IN VITRO*

Лабораторная работа №1

Тема: Введение в биотехнологию в растениеводстве. Техника безопасности в лаборатории биотехнологии и при производстве биологических средств защиты растений. Организация работ в биологической лаборатории.

Цель занятия – ознакомить основными правилами техники безопасности в лаборатории биотехнологии и при производстве биопрепаратов

Материалы к занятию: вытяжной шкаф, автоклав, шкаф сушильный, ламинарный бокс, качалка лабораторная термостатируемая, термостат, весы технические, рН-метр, холодильник, электрическая плитка, центрифуга, микроскоп МБС-1, амплификатор, камера для горизонтального и вертикального электрофореза белков и нуклеиновых кислот, источник постоянного тока, трансиллюминатор, микродозаторы.

Посуда, инструменты, материалы: пробирки стеклянные биологические, пипетки, воронки, чашки Петри стеклянные и пластиковые, ланцеты анатомические, скальпели глазные остроконечные, пинцеты анатомические, бритвенные лезвия, петли вольфрамовые с цанговыми держателями, иглы, шпатели стеклянные, спиртовки, колбы Бунзена, Эрленмейера, колбы мерные, широкогорлые, плоскодонные, стаканы химические, цилиндры мерные, марля, негигроскопическая вата, алюминиевая фольга, бумага фильтровальная, крафт-бумага, парафилм, штативы, пробирки типа Эппендорф, наконечники пластиковые одноразовые, планшеты для иммуноферментного анализа, кюветы эмалированные для фиксации и окраски гелей.

Инструкции по технике безопасности работ в лаборатории биотехнологии.

Журнал инструктажа по технике безопасности.

Задания:

- Изучить инструкции по технике безопасности работ в лаборатории биотехнологии университета.
- Ответить на вопросы преподавателя. Расписаться в «Журнале по технике безопасности при проведении занятий по предмету «Биотехнология в защите растений» на кафедре агрохимии, защиты растений и агроэкологии».
- Ознакомиться с научно-исследовательской лабораторией биотехнологии университета.
- Под руководством преподавателя освоить принципы работы автоклава, сушильных шкафов, дистиллятора.

По своему назначению биологические лаборатории делятся на санитарно-эпидемиологические, клинико-диагностические (медицинские и ветеринарные), гигиенические, ведомственные (при мясокомбинатах, молочных, хлебных и пивоваренных заводах, водонасосных станциях, станциях защиты растений), лаборатории по контролю за изготовлением бактериологических препаратов и пр. В связи с большой спецификой исследований, проводимых в биологических лабораториях, их оборудование и режим работы различны.

При сельскохозяйственных институтах и станциях микробиологические лаборатории занимаются изучением роли отдельных видов микроорганизмов в биохимических превращениях в природе веществ, в создании структуры и плодородия почвы, изучают возбудителей инфекционных заболеваний растений, разрабатывают методы их лабораторной диагностики и меры борьбы с ними. Практические разработки, научные исследования в биотехнологии связаны с использованием живых объектов, химических, биохимических, физических факторов, которые способны вызывать

отравления, ожоги, накапливаться в организме, вызывать болезни, изменения в потомстве. Знание техники безопасности и строгое соблюдение их при проведении лабораторных занятий является обязательным условием работы в биотехнологии.

Организация работ в биолaborатории. Для организации биотехнологической лаборатории необходимы просторные изолированные помещения, а также современное оборудование. Для правильного функционирования всех видов биолaborаторий большое значение имеет правильное размещение и состав производственных помещений. Специфика работ требует, чтобы помещение, отведенное под производственную лабораторию, было изолировано от других объектов. В состав производственной биолaborатории должны входить: лабораторная комната для производства бактериологических препаратов и исследований, автоклавная, моечная, препараторская, лабораторная комната для хранения запаса реактивов, посуды, аппаратуры, инвентаря. Оптимальная площадь рабочих комнат – 18-20м², а высота помещений не менее 3м. Все помещения лаборатории должны обеспечиваться хорошим естественным освещением, эффективно действующей вентиляцией, водопроводом, канализацией, электроэнергией.

Стены внутри лабораторных помещений должны быть обложены кафелем на высоту панели (170см), что позволяет производить их дезинфекцию. Рабочие комнаты оборудуются лабораторными столами, стульями, шкафами.

Специфика лабораторных помещений и оборудования определяются характером и объектом исследований, вследствие этого невозможно советовать один определенный набор оборудования, вид планировки лаборатории.

Помещения. Работы с культурой микроорганизмов и другими биообъектами проводятся в специализированных блоках, обычно состоящих из **моечной** комнаты, **автоклавной** (помещения для стерилизации сред, инструментов и материалов), **комнаты для приготовления питательных сред, асептического (бокс) и термостатированного помещений, лабораторных комнат.**

Моечная располагается в просторном помещении, при значительных объемах работ укомплектовывается моечными машинами или мойками. Комната снабжается горячей и холодной водой, приточно-вытяжной вентиляцией. В моечной должны быть установлены стеллажи для сушки посуды, шкафы для хранения чистой посуды и инструментов, вытяжные шкафы, сушильные шкафы с режимом работы для сушки посуды и инструментов – до 100-160°C, бутылки с дистиллированной водой.

Автоклавная – должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией и иметь канализационный слив для отвода конденсата из автоклава. Для стерилизации сред, инструментов и материалов помещение оборудуются автоклавами, сушильно-стерилизационными шкафами для стерилизации сухим жаром. Необходимо установить дистилляторы воды, столы и стеллажи для размещения стерилизуемых сред и материалов, шкафы для их хранения.

Боксы (стерильные помещения) следует располагать как можно дальше от источников заражения, сквозняков, нагревательных устройств. Двери, которые ведут в асептическую комнату, должны закрываться герметично. Пол, стены, потолок, другие поверхности должны быть покрыты легко моющимися и дезинфицирующимися материалами. В комнате должны быть лабораторные столы, стеллажи, шкафы для материалов и оборудования. Стерильность помещения достигается также с помощью бактерицидных ламп.

Ламинар-боксы оснащены специальными встроенными очистительными фильтрами. В отличие от вытяжных шкафов, воздух не выбрасывается из рабочей камеры ламинар-бокса, а проходит через специальные очистительные фильтры, стерилизуется ультрафиолетовым светом, и часть его циркулирует по внутреннему кругу. Такого типа ламинар-боксы рекомендуется использовать при работе с микроорганизмами.

В комнате для производства бактериологических препаратов для выращивания и поддержания культур должна автоматически регулироваться температура,

а также в ней должны быть термостаты. В этой же комнате можно поместить и различные установки (качалки, ферментеры) для накопительного культивирования микроорганизмов. **Комната для приготовления питательных сред** – оборудование комнаты: технические и аналитические весы, холодильники для хранения растворов, химические реактивы надлежащей степени чистоты (ХЧ, Ч, ЧДА), иономер, плитки, набор посуды, шкафы для хранения чистой посуды и реактивов, лабораторные столы.

В лабораторных комнатах для исследований размещают оборудование и приборы, необходимые для гистологических, цитогенетических, микробиологических, биохимических и других исследований.

Моечная комната, комната для стерилизации, приготовления питательных сред, боксы, комната для производства бактериологических препаратов должны располагаться рядом друг с другом по **принципу поточности**, обеспечивая движения нестерильного материала в одну сторону для исключения заражения сред, инструментов, посуды и т.п. Лабораторные комнаты для исследований могут находиться в здании на удалении от других помещений.

Проектирование биотехнологических лабораторий. Биотехнология стремительно соединяется с современным сельским хозяйством. «Мини»-био заводы и биофабрики строятся не только в промышленных центрах, но и в сельской местности. В качестве примера можно привести цеха по производству шампиньонов, вешенок, биогумуса, концентратов биологически-активных веществ, биопрепаратов различного назначения, энтомофагов и т.п. В целях безопасной эксплуатации помещений, исключения аварийных ситуаций на производстве, загрязнения среды, а также для аттестации предприятия и получения лицензии проектные работы должны выполняться проектными организациями. Монтаж вентиляционной, электрической, водопроводной, канализационной и теплосети также должен осуществляться специальными организациями.

При проведении лабораторных работ технику безопасности (см. приложение) можно подразделить на общую (электробезопасность, пожаробезопасность) и специфическую. Для обеспечения безопасности работы с определенными объектами, оборудованием, приборами необходимо знать:

- факторы, представляющие опасность;
- способы защиты от их вредного воздействия;
- действие в аварийных ситуациях.

Техника безопасности при работе в лаборатории биотехнологии с микроорганизмами.

Методы, используемые для изучения микроорганизмов, предъявляет некоторые общие требования к организации биолaborаторий и правилам работы в них:

- работать в лаборатории в застегнутом халате и головном уборе (колпак, косынка);
- в лабораторном помещении не принимать пищу и воду, не допускать излишних разговоров и ненужных переходов;
- не допускать резких движений, отвлекать, ходить около тех, кто производит посев;
- соблюдать чистоту и опрятность в работе, работать сидя, до и после окончания работы тщательно продезинфицировать и вымыть руки с мылом;
- использованные пипетки, предметные и покровные стекла, шпатели, ватные тампоны поместить в сосуд с дезинфицирующим раствором (0,5-3%-ный водный раствор хлорамина, 3-5%-ный водный раствор фенола, 6%-ный раствор перекиси водорода);
- рабочий стол протирать дезинфицирующим раствором, как перед началом работы, так и после окончания;
- перед началом работы руки обрабатываются 70%-ным этиловым спиртом, дать высохнуть, только после этого зажечь спиртовку (во избежание ожогов);
- на рабочем столе не должно быть лишних предметов;
- все реактивы и растворы должны иметь этикетки и стоять на определенных местах;

-перед посевом на пробирке (колбе или чашке Петри) маркером надписать название микроорганизма и дату посева;

-при проведении опытов с фитопатогенными грибами соблюдать особую осторожность: работать в масках, перчатках, остаток биоматериала сдать преподавателю для уничтожения автоклавированием;

-клетки микроорганизмов для посева или приготовления препаратов брать только бактериологической петлей, иглой, если они выращены на плотной среде;

-для взятия клеток из жидкой среды использовать стерильные пипетки;

-бактериологическую петлю (или иглу) перед взятием клеток микроорганизмов стерилизовать прокаливанием докрасна в пламени спиртовки;

-обжигать одновременно на пламени примыкающую к петле часть держателя, которая будет вводиться внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы;

-при прокаливании петлю держать в пламени почти вертикально, чтобы вся проволока была равномерно раскалена;

-сразу после стерилизации петлю (иглу) ввести в сосуд с микроорганизмами, но, вначале прикасаясь к внутренней поверхности сосуда или к питательной среде, свободной от клеток охладить, после этого только захватывать небольшое количество микробной массы;

-клетки микроорганизмов, оставшиеся на петле после приготовления препарата, сжигать в пламени спиртовки, затем петлю перевести в вертикальное положение, прокалить докрасна и только после этого ставить на место;

-все использованные материалы сжигать или обезвредить стерилизацией в автоклаве;

-стол, одежду, обувь и другие предметы, случайно загрязненные исследуемым материалом или культурой микроорганизмов, подвергают немедленной дезинфекции в присутствии преподавателя;

-помните, неаккуратное обращение с культурами микроорганизмов приводит к возникновению бактериального аэрозоля;

-после окончания работы поставить в термостат засеянные чашки и пробирки. Культуры микробов и остатки исследуемого материала сдать преподавателю, рабочее место продезинфицировать;

-производить влажную уборку и периодическую дезинфекцию всех рабочих помещений и оборудования.

Меры первой помощи при ожогах

-при несоблюдении мер предосторожности и неосторожном обращении с питательными средами в процессе кипячения возможно появление ожогов кожных покровов;

-лечебные мероприятия состоят в освобождении обожженного места от одежды или обуви и перевязке стерильным материалом;

-при ожоге глаз пострадавшему наложить холодные примочки на глаза, смочив чистую ткань раствором борной кислоты;

-принимать меры к восстановлению сознания, если оно утрачено (искусственное дыхание, вдыхание нашатырного спирта);

-при получении ожогов необходимо срочно вызвать представителя медицинского персонала;

-при ожогах II-IV степеней, сопровождающихся повреждением глубоких тканей, а также при обширных ожогах I степени, вызвать «Скорую помощь» и направить пострадавших в стационар;

-перевозку и перенос пострадавшего осуществлять с большой осторожностью, не допуская тряски.

Меры первой помощи при травматических

повреждениях мягких тканей

-при нарушении правил безопасной работы со стеклянной посудой возможно механическое повреждение целостности покровов тела (кожи и слизистых оболочек). Для таких ран характерна расхождение краев (зияние) и кровотечение из поврежденных прилежащих сосудов;

-лечебные мероприятия сводятся к остановке кровотечения и к профилактике инфицирования раны;

-при диффузном повреждении мелких сосудов, т.е. при капиллярном кровотечении промыть рану 3% раствором перекиси водорода или 0,1% раствором калия перманганата, кожу вокруг раны смазать 5% спиртовым раствором йода и спиртом, и через стерильную салфетку крепко прижать кровоточащие места пальцами на 5-7 минут;

-если за это время кровотечение уменьшилось, то рану закрыть давящей асептической повязкой;

-при значительном, чаще артериальном кровотечении прижать крупную артерию, кровоснабжающую поврежденную область, либо наложить жгут;

-жгут накладывают тогда, когда кровотечение из ран конечностей невозможно остановить при помощи давящей повязки.

Методика наложения жгута

-он должен располагаться в областях с большим мышечным каркасом (плечо, бедро). Желательно, чтобы под ним была проложена пеленка, полотенце или носовой платок. Конечность приподнять и предварительно растянутый жгут 2-3 раза обернуть вокруг конечности по подложенной ткани;

-концы жгута закрепить с помощью цепочки, крючка или завязывают.

Продолжительность нахождения жгута – не более 2 ч;

-при травматических повреждениях мягких тканей необходимо срочно вызвать представителя медицинского персонала, «Скорую помощь» и направить пострадавших в стационар.

Контрольные вопросы:

- Какими дезинфицирующими средствами проводят уборку помещения?
- Что делать если пролили биопрепарат?
- Как достигнуть стерильности питательных сред, инструментов и посуды?
- Перечислите основные правила безопасности при работе с автоклавом, в ламинар-боксе.
- Перечислите основные правила безопасности при работе в биологической лаборатории.

Тема 2. Условия и техника выращивания изолированных растительных органов, тканей и клеток *in vitro*.

Лабораторная работа 2

Приготовление питательных сред для культуры изолированных растительных тканей.

Цель работ - приобрести навыки приготовления различных сред и субстратов для выращивания изолированных тканей, а также целых растений.

Оборудование и материалы. Весы технические, весы аналитические, рН-метр, холодильник, электрическая плитка, мешалка магнитная с подогревом, микродозаторы.

Колбы мерные с пробками, стаканы химические на 50-500 мл, цилиндры мерные, пробирки мерные с пробками, пробирки биологические, пипетки стеклянные, воронки, пинцеты, негигроскопическая вата, алюминиевая фольга, крафт-бумага. Штативы, наконечники пластиковые одноразовые, ватно-марлевые пробки.

Питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга («basal salt mixture» фирмы «Fluka», «Sigma»), 96%-ный этанол, КОН, HCl, сахароза, гидролизат казеина, мезоинозит, аденин, глицин, зеатин, 2,4-Д, тиамин, пиридоксин, фолиевая и никотиновая кислота, агар.

Задание.

- Приготовить питательную среду МС для получения каллусов из стеблей микрорастений картофеля (табл. 4).

Приготовление питательных сред

Для выращивания культур растительных тканей, клеток и органов применяются различные искусственные питательные среды, основу которых составляет смесь минеральных солей. Поскольку питание культивируемых *in vitro* тканей является гетеротрофным, как источники углерода в состав среды вводятся сахароза или глюкоза. В настоящее время описано много разных питательных сред.

Таблица 1 Состав питательных сред для культивирования изолированных тканей и клеток растений (Калинин Ф.Л. и др., 1980)

Компоненты среды	Концентрация, мг/л		
	Мурасиге и Скуга (МС)	Гамборга и Эвеллега (В ₅)	Уайта
Na ₂ SO ₄	—	—	200
Ca(NO ₃) ₂	—	—	200
NH ₄ NO ₃	1650	2500	—
KNO ₃	1900	—	80
KCl	—	—	65
CaCl ₂ ×2H ₂ O	440	150	—
MgSO ₄ ×7H ₂ O	370	250	360
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	130	—
KH ₂ PO ₄	170	—	16,5
Na ₂ ЭДТА	37,3	37,3	37,3
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27,95	27,95	27,95
NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	—	150	—
H ₃ BO ₃	6,2	3,0	1,5
MnSO ₄ ×4H ₂ O	22,3	10,0	4,5
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8,6	2,0	1,5

KJ	0,83	0,75	0,75
Fe ₂ (SO ₄) ₃	–	–	2,5
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25	0,25	0,0025
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025	0,025	0,02
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,025	0,025	–
Глицин	2,0	–	3,0
Мезоинозит	100	100	10
Никотиновая кислота	0,5	1,0	0,5
Пиридоксин–HCl (вит.В ₆)	0,5	1,0	0,1
Тиамин – HCl (вит. В ₁)	1,0	10,0	0,1
Сахароза	30000	3000	20000

Если в литературе не содержится необходимой информации для культуры, выбранной вами, то работу надо начать с использования широко распространенных сред, таких как по прописи Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962, МС, таблица 1), Гамборга и Эвелеге (Gamborg, Eveleigh, 1968, В5), Уайта (White, 1943) (Калинин Ф.Л. и др., 1980).

Затем подбирают регуляторы роста растений. В большинстве случаев это ауксины, цитокинины и гиббереллины. Кроме того, в среды вводятся витамины и другие, биологически активные вещества. В промышленном масштабе выпускают готовые среды в виде сухих порошков (basal salt mixture), содержащих необходимые компоненты, за исключением регуляторов роста, сахарозы и агара. Компоненты питательной среды можно разделить на шесть групп, которые отражают также порядок ее приготовления из растворов

- – макроэлементы (N, P, K, Ca, Mg, S), которые используются в виде солей: нитратов, фосфатов, сульфатов;
- – микроэлементы (B, Mn, Zn, J, Mo, Cu, Co);
- – источники железа;
- – органические соединения (витамины, аминокислоты);
- – источники углерода (сахароза, глюкоза);
- – регуляторы роста растений (фитогормоны).

Основу всех питательных сред при культивировании изолированных растительных органов, тканей и клеток представляет смесь растворимых минеральных солей калия, натрия, кальция, магния в виде нитратов, нитритов, фосфатов, сульфатов. Азот, фосфор, сера входят в состав белков, нуклеиновых кислот, других соединений. Ионы K⁺, Na⁺, Cl[–], H⁺ необходимы для регуляции pH среды и поддержания физиологических градиентов клеток (тургора, осмотического давления, полярности).

Ионы железа, цинка, марганца, молибдена, кобальта входят в состав активных центров ферментов (например, каталазы, пероксидазы, полифенолоксидазы), в сочетании с порфиринами образуют пигменты фотосинтеза (хлорофилла).

Железо используется в виде хелатов [FeO₄ или Fe₂O₄ + ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или соль Na-ЭДТА] – наиболее доступной форме для усвоения растительными тканями.

В качестве источника углерода используют углеводы в концентрации 20-60 г/л. Обычно это сахароза, глюкоза, фруктоза, ксилоза и другие. Для стимуляции жизнедеятельности клеток используют витамины: группы В (В₁ – тиамин, В₆ – пиридоксин), С (аскорбиновую кислоту), РР (никотиновую кислоту), мезоинозит. Они входят в состав ферментов, участвующих в превращениях углеводов (например, пируватдекарбоксилазы, В₁), декарбоксилирования пировиноградной и кетоглутаровой кислот (транскетолазы, В₁), декарбоксилирования и переаминирования аминокислот (В₆),

в состав дегидрогеназ (никотинамиддинуклеотид и НАД-фосфат, РР). Витамины группы В используют в виде солянокислых солей.

Для регуляции процессов деления и роста растительных клеток, органогенеза и другими в культуре тканей необходимы фитогормоны. Чаще всего используют гормоны, стимулирующие рост и развитие растений: ауксины, цитокинины, гиббереллины (Полевой В.В. 1982; Дерфлинг К., 1985).

К ауксинам относятся: β -индолил-3-уксусная кислота (ИУК), природное соединение, а также синтетические – индолил-3-масляная кислота (ИМК), α -нафтилуксусная кислота (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д). ИУК влияет на образование корней (ризогенез) и их дальнейший рост, применяют в концентрации 1-2 мг/л. Активный стимулятор корнеобразования ИМК используют в концентрации – 0,1-1мг/л, α -НУК – 0,5-1мг/л (стимулятор каллусообразования). 2,4-Д стимулирует процесс дедифференцировки, это объясняется активацией протонной помпы и связанного с ней «истончения» клеточной стенки за счет индукции синтеза ряда ферментов, вызывающих частичный гидролиз клеточной стенки, а также индукцией репликации ДНК. Этот ауксин стимулирует деление клеток и синтез нуклеиновых кислот (Калинин Ф.Л., 1980).

Цитокинины представлены: кинетином (6-фурфуриламинопурин), зеатином, зеатин-рибозидом, N-дифенил-мочевинной, 6 - бензиламинопурином (6-БАП). Они стимулируют клеточное деление, способствуют дифференциации почек, ингибируют корнеобразование. Применяют в концентрации 0,02-0,5мг/л (Калинин Ф.Л., 1980).

К гиббереллинам относятся различные формы гибберелловой кислоты (ГК), обычно ГК₃. Для ГК характерно действие на клеточное деление в меристематических зонах, а не в дифференцированной ткани. Обычно в питательных средах применяют концентрацию 0,2мг/л (Муромцев Г.С., Агнестикова В.Н., 1971) .

В качестве биологических добавок для индукции различных процессов используют аминокислоты (глицин), кокосовое молоко (жидкий эндосперм кокосового ореха), вытяжки из незрелых зерновок кукурузы и т.д. (Шевелуха В.С. и др., 1998).

Если нет готовых порошковых сред (basal salt mixture) при ежедневном или частом приготовлении питательных сред их компоненты готовят из концентрированных (маточных) растворов, приготовленных заранее.

Для сред по прописи МС, например, готовят отдельно маточные растворы следующих компонентов, увеличивая их концентрацию по сравнению с прописью: соли макроэлементов (без солей кальция и хелата железа) – в 10 или 20 раз; соли микроэлементов – в 400 или 100 раз, соли кальция и хелаты железа – в 10 раз. Маточные растворы хлористого кальция и хелата железа (сернокислое железо + ЭДТА, либо Na-ЭДТА) готовят и хранят отдельно от других солей. Для приготовления маточного раствора каждую соль растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, затем сливают в колбу и доводят до нужного объема. В охлажденную смесь солей микроэлементов последним добавляют раствор солей молибдена, макроэлементов – раствор солей магния (для предотвращения выпадения осадка).

Растворы фитогормонов желательно готовить непосредственно перед работой со средами. Кинетин готовят из расчета 0,25мг/мл, другие органические соединения – 1мг/мл. При приготовлении кинетина важно использовать не более 2-3 капель 1N KOH (возможно сильное подщелачивание среды). ИУК растворяют в этаноле или его 70-80%-ных водных растворах.

Маточные (концентрированные) растворы хранят в специальных условиях: соли – в сосудах с притертыми пробками при 0...+4°C; витамины, фитогормоны, ферменты, растительные экстракты – при –20°C в небольших, по 5-10мл, сосудах с пробками.

При работе *in vitro* применяют жидкие и твердые среды. Жидкие среды используются для культивирования клеток и протопластов (суспензионная культура). При этом для поддержания эксплантов каллусов, изолированных органов и тканей в пробирки со средой

помещают специальные мостики-поддержки из фильтровальной бумаги или пористых синтетических материалов (Бутенко Р.Г., 1989, Калинин Ф. Л. и др., 1980).

Агаризованные среды готовят на основе агара (агар-агара) – полисахарида, входящего в состав морских водорослей, который (рис. 1) образует в воде однородный коллоидный раствор с pH 5,6-6,0 при температуре выше 40°C, а ниже этой – застывает в виде геля. Иногда в качестве уплотнителя и заменителя агар-агара используют полиакриламидные гели (биогели) P10 и P200.

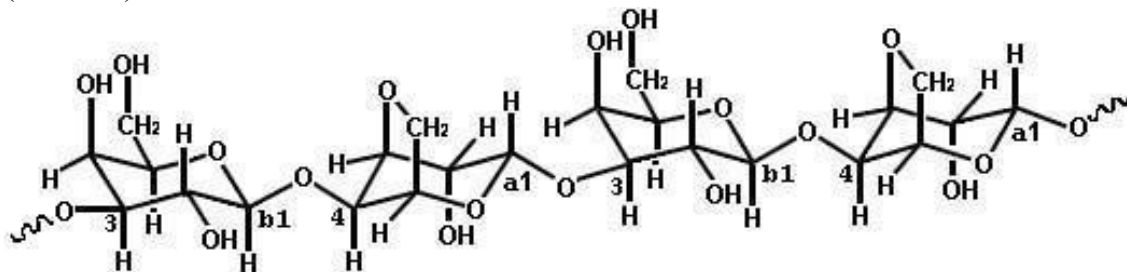


Рис. 1. Структура агара (полисахарида, состоящего из D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы, соединенных β 1 \rightarrow 4 и α 1 \rightarrow 3 связями).

Следует особо подчеркнуть – агар не рассматривается как питательный субстрат, а, в первую очередь, как гелеобразующая среда.

Ход работы.

- Приготовить растворы солей и углеводов. Взвесить на аналитических весах 403мг среды «basal salt mixture», пересыпать в стакан объемом 300мл и добавить 150мл дистиллированной воды, растворить порошок. Взвесить 20г сахарозы и растворить в стакане (объемом 100мл) в 50мл дистиллированной воды.
- Приготовить маточные растворы витаминов. Взять по 10мг навесок витаминов (солянокислые В₁ и В₆, фолиевая кислота, никотиновая кислота), перенести каждый отдельно в стаканчики на 50мл и растворить в 9мл воды. Перенести в мерную пробирку и довести объем до 10мл. Поместить растворы в темные склянки или пластиковые флаконы (для заморозки), закрыть пробками, наклеить этикетки, где указать вещество и дату приготовления.
- Приготовить 10мл 1N раствора КОН. 560мг КОН растворить в стаканчике 5мл дистиллированной воды, перенести в мерную пробирку. Прилить в стаканчик 3мл воды, сполоснуть и внести в пробирку, довести объем раствора в пробирке до 10мл, пробирку закрыть резиновой или пластиковой пробкой.
- Приготовить 1N раствор HCl. Для этого 1мл концентрированной соляной кислоты стеклянной пипеткой под вытяжным шкафом внести по стенке в стаканчик, куда налито 10мл дистиллированной воды. Раствор перемешать и налить в колбу объемом 20-50мл со стеклянной или пластиковой пробкой. На колбе указать название раствора и дату. Колбу закрыть.
- Приготовить маточные растворы регуляторов роста и аминокислоты. Взять навеску 10мг 2,4-Д (с 2,4-Д работать под вытяжным шкафом), растворить в мерных пробирках отдельно 1 мл 96%-ного этанола и довести дистиллированной водой до объема 10мл. Взять навеску 2мг зеатина, растворить в мерной пробирке 0,5мл 95%-ного этанола и довести объем водой до 2мл. Взять 10мг кинетина, растворить в пробирке 0,5мл 1N раствором КОН и довести водой объем до 10мл. По 10мг аденина и глицина поместить отдельно в пробирки и растворить в 10мл дистиллированной воды. Поместить растворы в темные склянки или пластиковые флаконы (для заморозки), закрыть пробками, наклеить этикетки, где указать вещество и дату приготовления.
- Приготовить раствор мезоинозита. 1г мезоинозита растворить в пробирке 10мл дистиллированной воды. Перелить во флакон для заморозки.

- Приготовить раствор гидролизата казеина. 5г гидролизата казеина растворить в стаканчике (на 100мл) в 50мл дистиллированной воды. Перелить во флакон для заморозки. Надписать название раствора и дату приготовления.

- Приготовить раствор питательной среды. В мерный цилиндр (1л) налить раствор сахарозы (50мл), раствор минеральных солей (150мл), регуляторов роста (кинетин 0,2мг (0,2мл), 2,4-Д – 3мг (3мл), зеатин 0,05 г (0,05мл), аденин – 1,0мг (1мл), фолиевая кислота – 0,5мг (0,5 мл), тиамин – 0,5мг (0,5мл), пиридоксин – 0,5мг (0,5мл), мезоинозита (100мг – 1мл), гидролизата казеина – 1г (10мл) и довести объем до 250 мл. Раствор подогреть до 40°C.

- Приготовить раствор агара. Взвесить на технических весах 3,5г агара и внести в колбу объемом 500 мл, добавить 250 мл дистиллированной воды, нагреть на водяной бане до образования прозрачного раствора.

- Расплавленный агар смешать с питательной средой. Довести объем до 500мл. Определить pH (5,8) и при необходимости довести с помощью микродозатора до указанного значения 1N растворами КОН или HCl.

- Разлить питательную среду по пробиркам по 10мл и закрыть ватно-марлевыми пробками. Передать преподавателю на стерилизацию.

- Записать ход работы в рабочую тетрадь. Ответить на следующие вопросы: а) почему растворы компонентов питательных сред готовят отдельно;

- б) почему некоторые растворы компонентов питательных сред замораживают или хранят в холодильнике;

- в) почему для начального растворения отдельных компонентов питательных сред не используют дистиллированную воду;

- г) почему раствор агара должен быть теплым (выше 40 °C).

Контрольные вопросы: Выполнить тесты из «Тестовых заданий по биотехнологии в растениеводстве» на страницах 3-11.

Лабораторная работа 3.

Стерилизация посуды, инструментов, питательных сред и растительного материала.

Цель работы – научиться стерилизовать инструменты и материалы для работы культурой растительных тканей, с семенами, рассадой, микроорганизмами, шляпочными грибами.

Оборудование и материалы. Автоклав, шкаф сушильно-стерилизационный, ламинар-бокс, вакуумный насос, микродозаторы.

Колбы Бунзена, колбы плоскодонные на 100-200 мл, стаканы химические на 100-200 мл, пробирки биологические, фильтры типа «Millipore», чашки Петри стеклянные и пластиковые, скальпели глазные остроконечные, пинцеты длинные, бритвенные лезвия, петли вольфрамовые с цанговыми держателями, иглы, спиртовки, вата, марля, ножницы, крафт-бумага, наконечники пластиковые одноразовые.

Зерновки пшеницы или гречихи. Гипохлорит кальция, этанол, стиральный порошок, пробирки со стерилизованными питательными средами (картофельно-глюкозный агар или МС без фитогормонов и витаминов).

Задание.

Подготовить ламинар-бокс к работе. Простерилизовать посуду, инструменты, питательные среды и растительный материал, предложенный преподавателем.

Стерилизация посуды и инструментов

Основным условием выделения эксплантов и культивирования изолированных растительных тканей и клеток является стерильность помещения, инструментов, исходного растительного материала, питательных сред.

Стерильные помещения (боксы). Требования к боксам были указаны на предыдущих занятиях. Как правило, для работ *in vitro* используют ламинар-боксы.

Подготовка ламинар-бокса и работа с ним. За 1,5-2 ч до работы внутреннюю рабочую поверхность ламинар-бокса протирают марлей или ватой, смоченной 70%-м водным раствором этанола. Затем таким же раствором протирают и размещают в боксе спиртовку, стакан фарфоровый с 96%-ным этанолом, колбу со стерильной водой, стерилизованные инструменты, материалы, спички и включают ультрафиолетовую лампу и вентилятор воздушного потока.

Перед началом работы тщательно моют руки с мылом, протирают спиртом, надевают стерильный халат, завязывают косынку (надевают чепчик), а при необходимости используют и маску. Перед началом работы и во время пересадок руки, рабочий стол постоянно протирают этанолом. По окончании работы вновь протирают ламинар-бокс 70%-м раствором этанола.

Стерилизация посуды, инструментов, материалов. Стерилизации подлежат объекты трех видов: 1 - посуда, инструменты, вспомогательный материалы; 2 - питательная среда; 3 - исходный растительный материал. Такое деление объясняется различием их свойств и требованиям к ним. К питательным средам предъявляется в первую очередь нативность (целостность) входящих в нее компонентов, способных при некоторых способах стерилизации разрушаться или превращаться в физиологически неактивные соединения. В растительном материале клетки должны оставаться живыми.

Основным способом стерилизации инструментов и посуды является высокотемпературная их обработка сухим или влажным жаром (автоклавирование, дробная стерилизация – тиндализация, кипячение, пастеризация), а сред, как правило, влажным жаром. Питательные среды могут стерилизоваться фильтрацией через специальные фильтры (Зейтца), не пропускающие сквозь мембраны клетки и споры микроорганизмов (фильтры типа «Millipore»). Растительный материал стерилизуется различными веществами, убивающими микробов.

Стерилизация посуды. Посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта моющими средствами (обычный стиральный порошок, кальцинированная сода со щелочью), промыта водопроводной, затем дистиллированной водой и высушена. Сильно загрязненная посуда обмывается раствором бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$) или натрия в концентрированной серной кислоте (обиходное название «хромка», «хромпик»). Для этого посуду ополаскивают водой и, не высушивая, погружают в этот раствор, который должен находиться в фарфоровом стакане объемом 1-2 л. Иногда требуется выдерживание грязной посуды в хромпике 4-6 ч. Затем дают раствору стечь. Посуду отмывают под струей теплой воды и не менее 3-х раз ополаскивают дистиллированной водой.

Внимание! При работе с раствором $K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$ следует надеть халат, защитную маску, перчатки, прорезиненный фартук, так как он вызывает сильный химический ожог, быстро разрушает различные материалы (ткань, дерево, бумагу, металл и т.п.). Колбы, пробирки и другие сосуды, где будет выращиваться культура, перед заполнением их питательными средами предварительно стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу. Для этого их заворачивают в плотную бумагу (крафт-бумагу), помещают на эмалированных или металлических поддонах в сушильный шкаф и выдерживают 2 ч при $160^\circ C$ с момента ее установления. Для исключения возгорания бумаги, дверцы шкафа должны быть плотно закрыты, а сам он находится под наблюдением.

Стерилизация инструментов. Перед стерилизацией некоторые инструменты (пинцеты) следует отмыть щеткой в мыльном растворе (растворе стирального порошка),

затем струей водопроводной и дистиллированной воды. Чистые инструменты предварительно стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу в течение 2-х ч при 140°C, завернув их в крафт-бумагу. Стерилизованные инструменты переносят в ламинар-бокс, где они дополнительно обрабатываются этанолом и обжигаются в пламени спиртовки, затем помещаются между листами стерильной бумаги.

Инструмент используют только для одноразовой манипуляции. Инструмент в автоклаве (влажным жаром) не стерилизуется, чтобы исключить его коррозию. Лезвия и иглы не обжигаются, а окунаются в спирт.

Эффективная стерилизация достигается в автоклаве.

К обслуживанию автоклавов допускаются только лица, имеющие право работы на паровых стерилизаторах, подтвержденное соответствующим удостоверением.

Чистую посуду, материалы заворачивают в крафт-бумагу, помещают в биксы и автоклавируют при давлении 2 атм. 25-30 минут. Стекланные пипетки заворачивают в бумагу отдельно друг от друга, предварительно заполнив ватой широкую верхнюю часть.

Стерилизация материалов. Вату, марлю, ватно-марлевые пробки, бумажные «матрасики», халаты, косынки стерилизуют в автоклавах под давлением 2 атм. 40 минут.

Стерилизация питательных сред. Разлитые в пробирки или колбы среды, закрывают ватными пробками, завертывают в целлофан и автоклавируют при температуре 120°C 20 мин.

Стерилизация растительного материала. Поверхностные покровы растений заселены клетками и спорами микроорганизмов (грибов, бактерий). Стерилизация растительных объектов заключается в уничтожении этих микроорганизмов без повреждения внутренних растительных тканей. От плотности, чувствительности ткани к антисептику зависят его вид, концентрация и длительность воздействия. Правильный выбор стерилизующего средства заключается в том, чтобы оно незначительно повреждало ткани и, в то же время, губительно действовало на все микроорганизмы.

Для поверхностной стерилизации растительных тканей применяют большой набор химических веществ, используемых в виде растворов. Они могут быть разделены на три основные группы.

- *Растворы, содержащие активный хлор:* хлорамин, хлорная известь, гипохлорит кальция или натрия. Используют также слабые растворы обычной «Белизны». Токсическое действие этих препаратов наименьшее в сравнении со второй группой веществ.

- *Ртутьсодержащие растворы.* Обладают наиболее выраженным дезинфицирующим эффектом и поэтому применяются в тех случаях, когда хлорсодержащие растворы неэффективны. К ним относятся сулема (HgCl_2) и диацид (этанолртутихлорид с цетилпиридиний хлоридом в качестве детергента).

- *Другие стерилизующие вещества:* перекись водорода (H_2O_2), раствор йода, марганцовки (KMnO_4). Эти вещества часто используются в быту. Действие основано на их высокой способности окислять органические и другие молекулы и, таким образом, обеззараживать поверхность.

Органы растений, из которых берут эксплант для введения в культуру, предварительно моют мыльным раствором. Загрязненную поверхность очищают щеткой, промывают проточной водопроводной водой. С корнеплодов или корней снимают кожуру, у побегов – кору. Органы споласкивают дистиллированной водой. Эти процедуры проводят вне ламинар-бокса. Семена лучше помещать в марлевые мешочки.

Затем операции проводят в ламинар-боксе. Материал пинцетом погружают на несколько секунд в 70%-ный этанол, который обладает большей проникающей способностью, способен активнее растворять некоторые белки по сравнению с 96%-ным этанолом. Семена погружают в спирт на 1-2 минуты. Спирт не только стерилизует поверхность тканей, но и повышает стерилизующий эффект основных стерилизаторов.

После этого растительный материал помещают в один из заранее простерилизованных с крышкой сосудов со стерилизующим раствором (таблица 2). Кроме того, необходимо иметь 4-5 стерильных сосудов с дистиллированной автоклавированной водой. Отмечают время начала стерилизации. По истечении времени стерилизации объект пинцетом переносят в сосуды с автоклавированной водой, выдерживая в каждом из них по 10-15 минут.

Таблица 2 Стерилизация исходного растительного материала (Бутенко Р.Г., 1999)

Объект	Время стерилизации, мин.			
	диацид, 0,1%	сулема, 0,1%	гипохлориты, 5-9%	H ₂ O ₂ , 10-12%
Семена сухие	15-20	10-15	15-20	12-15
Семена набухшие	6-10	6-8	10-15	6-8
Ткани мясистого корня, клубня	20-30	15-25	15-20	-
Ткани одревесневшего стебля	20-40	20-25	20-25	-
Листья	1-3	1-3	3-6	3-5
Апексы	1-10	1-7	3-15	2-7

Приготовление 0,1%-ного раствора диациды. Растворяют отдельно 330 мг этанолмеркурхлорида и 660 мг цетилпиридиния хлорида в горячей воде, затем их смешивают, добавляют несколько капель детергента твин-80, доводят объем жидкости до 1 л, хранят в темноте.

Внимание! Соединения ртути ядовиты! Нельзя использованные растворы выливать в канализацию. Они подлежат специальной утилизации.

Приготовление «хромпика». В вытяжном шкафу 9,2 г бихромата калия или 6,2 г бихромата натрия заливают в фарфоровой чашке 100 мл концентрированной серной кислоты, перемешивают стеклянной палочкой до полного растворения. При необходимости кислоту подогревают. Затем переливают в фарфоровый стакан, закрывают крышкой и помещают в вытяжной шкаф.

Ход работы.

Стерилизация посуды и инструментов.

- Надеть халат.
- Включить освещение ламинар-бокса. Протереть внутреннюю поверхность бокса ватой, смоченной в 70%-ном этаноле, также обработать спиртовку. Поместить спиртовку, спички в ламинар-бокс и включить воздушный поток, затем ультрафиолетовую лампу.
- Приготовить крафт-бумагу и плотную фольгу для стерилизации чистой посуды, инструментов, питательной среды. Приготовить бумажные «матрасики» 20x15 см (5 шт.).
- Стеклянную чашку Петри, 2 химических стакана (объем 100-150 мл), 2 колбы (200-250 мл), 5 пробирок, завернуть в крафт-бумагу. Положить их в сушильный шкаф, установить температуру 160°C и включить шкаф. После набора температуры и срабатывания автомата записать время и оставить шкаф включенным на 2 часа.
- Также завернуть в плотную бумагу скальпели, пинцеты и стерилизовать их в другом шкафу 2 ч при 140°C.

Стерилизация питательных сред и материалов.

- Налить дистиллированную воду в чистую колбу до 1/3 ее объема, закрыть алюминиевой фольгой.

- Поместить колбу с водой в бикс. Передать преподавателю для стерилизации в автоклаве.
- 5 ватно-марлевых пробок, 2 стеклянные пипетки, «матрасики» завернуть в крафт-бумагу и передать преподавателю для стерилизации в автоклаве.
- Рассмотреть внимательно устройство автоклава.

РАЗДЕЛ II. РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ

Тема Фитогормоны. Росторегулирующая активность химических средств защиты растений.

Лабораторная работа 4

Выявление ретардантной активности фунгицидов триазолового ряда.

Цель работы – освоить метод выявления росторегулирующей активности биологических и химических препаратов, применяемых в агрономической практике.

Оборудование и материалы. Шкаф вытяжной, шкаф сушильный ШСС-80, шкаф для проращивания этиолированных проростков, весы технические, микродозаторы.

Стаканы химические на 50 мл, цилиндры мерные, чашки Петри, палочки стеклянные, пинцеты, марля, нитки, наконечники пластиковые одноразовые, бумага фильтровальная, ножницы, линейки.

Семена пшеницы, вода дистиллированная, этанол, фунгицид триазолового ряда (раксил, дивиденд-стар).

Задание.

Определить ретардантную активность фунгицида триазолового ряда.

Регуляторы роста растений

Рост и развитие растений находятся под четким контролем фитогормонов. Фитогормоны – вещества растительного происхождения, способные транспортироваться по растению и в очень низких концентрациях регулировать его рост и морфогенез. Кроме фитогормонов стимулировать или ингибировать ростовые процессы у растений способны и другие природные и синтетические соединения. Такие вещества называются регуляторами роста растений. Среди них различают стимуляторы и ингибиторы роста.

Стимуляторы роста растений. К основным стимуляторам роста растений относятся: 1) ауксины; 2) цитокинины; 3) гиббереллины. Такая классификация связана не только с тем, что эти вещества принципиально различны по своей химической структуре, но также тем, что механизмы стимуляции роста растений фитогормонами разных классов различаются. Так, например, ауксины стимулируют растяжение клеток, цитокинины – деление клеток и дифференциацию органов, задерживают их старение, гиббереллины – стимулируют деление клеток в меристематических тканях, рост целого растения (Полевой В.В., 1982; Дерфлинг К., 1985).

Ингибиторы роста. Среди природных ингибиторов роста растений выделяют абсцизовую кислоту и этилен.

Абсцизовая кислота (АБК) – фитогормон, ингибирующий синтез отдельных белков, активность протонной помпы. Под действием АБК закрываются устьица, прекращается фотосинтетическое фосфорилирование. АБК контролирует покой семян, почек и клубней растений, накапливаясь по мере созревания в запасующих органах и семенах. АБК является одним из основных фитогормонов, при неблагоприятных условиях среды тормозящих рост растений, способствующих их адаптации к стрессу (Кефели В.И. и др., 1989).

Этилен – газообразный фитогормон. Участвует в регуляции опадения листьев, ингибирует рост растений, способствует их переходу в состояние покоя. В практических целях его используют для ускорения созревания плодов. В то же время этилен относится к

фитогормонам, регулирующим ответные реакции растений при поражении фитопатогенами и вредителями, индуцируя синтез защитных белков и ферментов (Кулаева О.Н., 1998).

Другие классы фитогормонов.

Брассиностероиды – фитогормоны стероидной структуры. Действие брассиностероидов на растения многообразно: они могут стимулировать растяжение клеток, как ауксины, усиливать рост целого растения как гиббереллины, подобно цитокининам стимулировать рост изолированных органов (например, семядолей тыквы), повышать устойчивость растений к стрессам, в том числе к болезням (Шакирова Ф.М., 2001).

Жасмоновая кислота и жасмонаты. Жасмоновая кислота и ее производные подобно этилену являются летучими соединениями. Их можно отнести к ингибиторам роста растений. Наиболее известны как соединения, регулирующие устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды, в том числе к фитопатогенам и вредителям (Тарчевский И.А., 2001; 2002).

Салициловая кислота. Действие ее многообразно. Она индуцирует цветение короткодневных растений в условиях длинного светового дня, способен при цветении локально повышать температуру в растительных тканях, активизировать защитные реакции растений и адаптировать их к стрессам (Шакирова Ф.М., 2001).

Олигосахарины – соединения, содержащие в своем составе несколько остатков (5-20) одинаковых или разных по структуре углеводных молекул. Они относятся к нетрадиционным фитогормонам, способны в очень низких концентрациях (10^{-6} – 10^{-9} М) стимулировать деление клеток, влиять на морфогенез растений, активировать у них защитные реакции (Тютюрев С.Л., 2002).

Наиболее привлекательным при изучении регуляторов роста является механизм их действия. Показано, что фитогормоны имеют специфические рецепторы. Образование гормон - рецепторного комплекса запускает каскад реакций, связанных с фосфорилированием / дефосфорилированием белков, активацией / подавлением экспрессии определенных генов, синтезом / ингибированием синтеза отдельных белков и ферментов, ускорением / замедлением активности биохимических процессов с их участием. Уровень фитогормонов четко реагирует на изменение абиотических факторов внешней среды, воздействие определенных неорганических веществ и биомолекул и регулируется ферментами, участвующими в синтезе/деградации фитогормонов (Муромцев Г.С. и др., 1987; Шевелуха В.С., 1993; Шакирова Ф.М., 2001).

Регуляторы роста растений характеризуют как вещества, влияющие на рост и развитие растений, если они не стимулируют рост как удобрение и не угнетают его как гербицид.

Ретардантами называют синтетические и искусственные соединения, подавляющие рост растений. Большинство ретардантов можно разделить на 4 группы веществ: 1) четвертичные соли аммония; 2) производные триазола; 3) продуценты этилена; 4) производные гидразина. Эффект этих и других известных ретардантов связан с их антигиббереллиновым действием. Однако механизм этого действия не одинаков. Некоторые ретарданты блокируют биосинтез гиббереллина, другие препятствуют его связыванию со специфичным рецептором, и поэтому невозможно образование и (или) дальнейшее проявление активности гиббереллин-рецепторного комплекса (Шевелуха В.С., 1996).

В растениеводстве ретарданты, замедляющие избыточный рост побегов, тормозящие вегетативный рост растений применяют для борьбы с полеганием зерновых, избыточным ростом картофеля, технических, овощных, плодовых культур, винограда, стимуляции развития генеративных органов.

Одним из лучших среди препаратов этого класса считается хлорхолинхлорид (ТУР, XXX или CCC, chlorocholine chloride). Этот препарат способен тормозить линейный рост

клеток и усиливать их деление в поперечном направлении. Растения, подвергнутые воздействию ХХХ, имеют укороченный и толстый стебель.

Ретардирующим эффектом обладают также системные фунгициды триазолового ряда – байтан, дивиденд, дивиденд-стар, раксил и другие протравители семян, используемые, например, для защиты злаковых культур от возбудителей головневой инфекции. В связи с тем, что растения, обработанные этими соединениями, меньше повреждаются при воздействии таких стрессовых факторов как действие озона, засухи, низких температур, инфицирование патогенами, вещества класса триазолов, в том числе и байтан, охарактеризованы как мульти-протекторы растений (Андреева Е.И., Ахматова Н.И., 1988).

Фунгицидный эффект триазолов связан с подавлением синтеза стерингов у фитопатогенных грибов, причем аналогичный эффект проявляется и на растении. Под воздействием триазолов может сдвигаться баланс продуктов терпеноидного биосинтеза растений, например, гиббереллинов и АБК, что, возможно, является причиной ретардирующего эффекта указанных фунгицидов. Этот эффект особенно заметно проявляется при высокой температуре воздуха во время прорастания семян, и при засухе. Поэтому фунгициды триазолового ряда для обработки семян следует использовать при наличии достаточного запаса влаги в почве, невысокой температуре воздуха в посевной период.

Ход работы.

- Отобрать две партии семян пшеницы по 10 г.
- Приготовить 50 мл 70%-ного раствора этанола из 96%-ного (привести пример расчета в тетради).
- Приготовить два лоскутка марли размером 8х8 см. Положить в них семена, завязать ниткой. Опустить мешочки с семенами на 1-2 минуты в 70%-ный этанол для стерилизации от поверхностной семенной инфекции, затем тщательно промыть водопроводной и дистиллированной водой до исчезновения запаха этанола.
- Рассчитать норму препарата раксил (дивиденд-стар) для обработки 10 г семян, если доза препарата на 1 т семян составляет 0,4 (1) л. Привести пример расчета в тетради.
- Положить семена из первого мешочка в стакан, внести микродозатором фунгицид, в количестве, соответствующем дозе препарата на 1 т семян. Семена тщательно перемешать стеклянной палочкой.
- Взять две чашки Петри с крышками. Подписать с внешней стороны дно одной из чашек Петри «контроль», другой «фунгицид». На обоих указать группу и фамилию. На дно чашек Петри положить 2 кружка фильтровальной бумаги, залить дистиллированной водой так, чтобы слой воды 1 мм покрывал бумагу.
- В контрольную чашку разложить 15 необработанных зерновок примерно одинакового размера с целыми зародышами. В опытную чашку разложить столько же семян, обработанных фунгицидом и примерно такого же размера. Чашки Петри закрыть и поставить в шкаф для проращивания с температурой 7-10°C до следующего занятия.
- Через 7 дней (следующее занятие) просмотреть проростки. Подсчитать количество нормально проросших и больных семян в контроле и опыте. Измерить длину главного корня и coleoptily у контрольных и обработанных проростков. Занести в таблицу данные (форма – табл.3), подсчитать среднее значение показателей. Сделать вывод о рострегулирующем действии фунгицида.

Таблица 3 Влияние обработки зерновок пшеницы фунгицидом на рост проростков

№ проростка	Длина coleoptily, мм		Длина главного корня, мм	
	контроль	фунгицид	контроль	фунгицид
1				
2				
...				

Средняя % от контроля				
--------------------------	--	--	--	--

Контрольные вопросы: Выполнить тесты из «Тестовых заданий по биотехнологии в растениеводстве» на страницах 16-23.

Лабораторная работа №5

Тема: Технология массового размножения энтомофагов, акарифагов и фитофагов. Приготовление питательных сред.

Цель занятия – изучить особенности массового разведения отдельных видов насекомых и клещей, типы культур насекомых. Ознакомить рецептурой и ролью отдельных компонентов питательной среды.

Материалы к занятию: схемы разведения энтомо-, акари- и фитофагов, жидкие питательные готовые среды, чашки Петри, фильтровальная бумага, калька, марлевые изоляторы.

Оборудование: ламинар-бокс, термостат.

Задания:

1. Внимательно изучив материал выделить особенности массового размножения энтомо-, акари- и фитофагов и выписать основные операции разведения их.

В сельскохозяйственной практике все шире применяют биологические методы борьбы с вредными насекомыми. Поэтому необходимо разработать доступные способы экономичного разведения перспективных видов энтомофагов. Главное место среди средств биологической защиты занимает энтомофаг - трихограмма, которую используют для борьбы с комплексом совок на зерновых, технических и овощных культурах и т.д.

К роду *Trichogramma* Westw., относящемуся к семейству *Trichogramma* *tidae* принадлежат очень мелкие, длиной менее 1 мм паразиты яиц.

Описано 26 видов трихограмм. Против комплекса совок наиболее эффективны *T. euproctidis* и *T. evanescens*.

Цикл развития обоих видов сходен. Зимуют взрослые, закончившие питание личинки трихограммы в яйцах различных видов совок, репной белянки и других, чешуекрылых на тех же полях, где развивались в течение сезона. Самки откладывают яйца в первые сутки жизни. Трихограмма не может активно расселяться на значительные расстояния. Один из главных факторов, ограничивающих увеличение численности трихограммы в природе, это отсутствие синхронности в развитии между паразитом и хозяином. Поэтому трихограмму разводят искусственно.

Методика массового размножения трихограммы.

Трихограмму разводят в биолaborаториях, используя в качестве пищи яйца зерновой моли (*Sitotroga cerealella* Opiv.).

Основные операции разведения трихограммы и зерновой моли:

- **Подготовка помещений и зерна для разведения зерновой моли.**

Оптимальные режимы температуры и влажности, которые создают для разведения зерновой моли, являются также благоприятными для размножения ряда ее паразитов и хищников. Особое внимание нужно обращать на очистку и обеззараживание зерна, поступающего из зернохранилищ. Нельзя хранить запасов неочищенного зерна в помещении биолaborатории. Обеззараживание зерна проводят термическим или химическим способом. Термическая обработка осуществляется в автоклавах в течение 25-30 минут при 85-90°C и давлении 1-1,5 атм или путем погружения зерна в горячую воду при 90-95°C на 1 мин. предварительно в воду добавляют марганцево-кислый калий (1г на

10л воды), чтобы предотвратить появление плесени. Химическая обработка зерна проводится бромистым метилом. Термическое обеззараживание зерна предпочтительнее.

- **Заражение зерна зерновой молью.**

После обеззараживания зерна определяют его фактическую влажность. Для нормального развития зерновой моли в зерне рекомендуется поддерживать влажность в пределах 14-16 %. Заражение зерна производят путем внесения яиц зерновой моли непосредственно перед отрождением из них гусениц. Подготовленное зерно рассыпают по кюветам слоем толщиной 5 см. Яйца равномерно распределяют по поверхности зерна, из расчета 1 г яиц на 1 кг зерна. Сверху на зерно кладут контрольную карточку с яйцами моли, по которой судят о динамике отрождения и начале внедрения гусениц в зерно. Выход гусениц из яиц продолжается 2-3 дня, внедрение в зерно – 3-4 дня. В период отрождения и внедрения гусениц зерно нельзя перемешивать и увлажнять.

Спустя 30-35 дней (в начале вылета зерновой моли) зерно засыпают в специальные кассеты. Максимальный выход бабочек зерновой моли – 90 %.

- **Получение бабочек зерновой моли.**

К моменту установки кассет в боксы в помещении обеспечивают тот же гигротермический режим, что и при заражении зерна (24°C и ОВВ 80 %). Конструкция боксов допускает их объединение до 10 в единую механизированную линию. В этом случае боксы соединяются при помощи насекомопровода, которые устанавливаются под ним. Помещение, где установлены линии боксов, должно быть полностью изолировано от насекомоприемника и пульта управления, снабжено кондиционерами, потолочными вентиляторами и датчиками для регулирования микроклимата.

При оптимальных условиях развития зерновой моли бабочек собирают в течение 30-55 дней. Наиболее интенсивный лет начинается через 6-10 дней после загрузки кассет в боксы и продолжается 10-15 дней.

Перед установкой кассет с новой партией зараженного зерна производят профилактические мероприятия по очистке оборудования и помещения. Заражение следующей партии зерна проводят одновременно или после установки кассет в боксы.

- **Содержание бабочек и получение яиц зерновой моли.**

Поступающую по насекомопроводу зерновую моль собирают в сменные контейнеры насекомоприемника не менее 3-х раз в сутки. Для содержания и откладки яиц зерновую моль из контейнеров расфасовывают в малые контейнеры в специальном вытяжном шкафу.

В малые контейнеры бабочек расфасовывают дозатором объемом 250 мл (примерно 20 тыс. особей). Контейнеры закрывают сменной подложкой и поддоном и помещают в ячеистый термостат, где бабочек содержат в течение 5 суток. Ячеистый термостат служит для поддержания оптимальных условий в период содержания бабочек и откладки ими яиц: 24°C и ОВВ 80 %. Очистку малых контейнеров от яиц моли производят один раз в сутки.

Сбор яиц проводят в вытяжном шкафу после предварительной инактивации бабочек.

Для этого можно использовать охлаждение моли в холодильнике.

Обездвиженную моль пересыпают в пустой контейнер, подложку с отложенными на ней яйцами заменяют новой, а со снятой подложки щеткой осторожно очищают яйца моли. Собранные яйца зерновой моли загрязнены различными примесями. Очистку яиц производят сразу же после сбора, вначале с помощью сит и вибратора, а затем – на пневматическом классификаторе. Очищенные яйца суточного сбора взвешивают и расфасовывают в этикетированные пакеты до 100 г в каждый. Яйца разных сроков сбора не должны смешиваться.

- **Размножение трихограммы.**

Исходной культурой для размножения в биолaborаториях является трихограмма, которую собирают в природе на яйцах основных хозяев. В помещении, где разводят

трихограмму, необходимо поддерживать днем в часы ее наибольшей активности температуру 25-29°C, а ночью 14-16°C.

Перед заражением яйца зерновой моли наклеивают на стеклянные пластины. Для этого пластины предварительно очищают от следов жира и помещают в холодильник. Через 20-30 минут пластины извлекают из холодильника, и после появления на поверхности конденсата воды быстро наносят на них сплошным слоем очищенные яйца зерновой моли. При этом яйца приклеиваются к пластинам. Избыток яиц удаляют легким встряхиванием пластины и помещают их в виварии. Заражение яиц зерновой моли трихограммой проводят в течение 1-2 суток, чтобы вылет имаго в полевых условиях происходил в сжатые сроки. После завершения заражения виварии с пластинами вставляют в вытяжной шкаф для удаления имаго трихограммы. Яйца зерновой моли очищают после их почернения и отрождения основной массы гусениц.

- **Хранение трихограммы.**

На хранение помещают почерневшие яйца, в которых трихограмма находится в фазах предкуколки, куколки или взрослого насекомого. Наиболее холодостойкую фазу развития – предкуколку можно сохранять в течение 30-40 дней, куколку – 20 дней, взрослую трихограмму перед вылетом – не более 10 дней.

Длительное разведение на яйцах чужого хозяина – зерновой моли приводит к вырождению популяции, поэтому необходимо ежегодно производить пассаж (перегонку) маточного материала через яйца природных хозяев. Для введения качественной маточной культуры трихограммы и в оздоровлении биоматериала необходимо постоянно иметь большое количество яиц вредителя, против которого выпускается яйцеед. Это возможно только при массовом разведении этих насекомых в течение всего года на искусственных питательных средах (среда Пуату и Буэ).

Состав питательной среды и методика ее приготовления (в г/ на кг среды):

- набухшие семена фасоли - 200;
- зародыши пшеницы - 30;
- сухие пивные дрожжи - 34;
- агар-агар - 18;
- аскорбиновая кислота - 5;
- метабен - 2;
- формалин - 1,5;
- дистиллированная вода до 1 кг.

За сутки до приготовления среды фасоль измельчают с помощью мясорубки, фарш перемешивают с 350 мл дистиллированной воды и гомогенизируют. Для приготовления агарового геля навеску агара смешивают с 350 мл воды, смесь нагревают на кипящей водяной бане.

В измельченную фасоль при перемешивании добавляют все сухие компоненты (кроме аскорбиновой кислоты) и формалин. Затем добавляют агаровый гель, смесь тщательно перемешивают. После охлаждения всей смеси до 55°C добавляют аскорбиновую кислоту. Приготовленную среду в ламинар-боксе разливают в стерильную посуду и выдерживают в течение суток для испарения излишней влаги или помещают в термостат.

Акарифаг обыкновенного паутиного клеща фитосейулюса – *Phytoseiulus persimilis* Ath.- Непг. Разводят в специально выделенной теплице или в несколько мелких теплицах, площадь 0,5-1 % защищаемой. Изолированную теплицу отводят под маточную культуру паутиного клеща. Оставшуюся часть делят на 7-8 участков. Каждый участок засевают с интервалом в 5 дней, а в темное время года (декабрь-февраль) высаживают рассаду огурцов. Через 13-15 дней растения каждого участка заселяют паутинным клещом и через 12-13 – фитосейулюсом. Спустя 10-12 дней проводят сбор накопившегося хищника и

посев растений 2 и последующих оборотов. За один оборот с 1 м² полезной площади теплицы получают до 10 тыс. особей.

Методы разведения совок-фитофагов на искусственных питательных средах. Для массового лабораторного разведения разных видов совок-фитофагов: капустной, огородной, озимой, хлопковой, наземной серо-бурой и др. используют модифицированную питательную среду Пуату и Буэ, а также среду на основе люцерновой муки и зародышей пшеницы. Методы разведения совок во многом сходны и включают следующие последовательные операции:

- получение исходного материала,
- отсадка бабочек,
- инкубация яиц,
- выращивание гусениц,
- содержание куколок до вылета имаго.

Для большинства видов исходный материал получают посредством отлова бабочек природной популяции светолушками. Отсаживают их по 2-3 пары в марлевые изоляторы, натянутые на цилиндрические проволочные каркасы высотой 15 см и диаметром 10-12 см, и ежедневно подкармливают 7-10 %-ным сахарным сиропом (в зависимости от вида). Поилки меняют через день. Съем яиц для заражения трихограммой проводят ежедневно, для воспроизводства – через день. Изоляторы с бабочками содержат при 20-21°C, ОВВ 75-85 % и естественной смене дня и ночи.

Инкубацию яиц осуществляют в чашках Петри в термостатах при 25-28°C, влажности 75-85 % и естественном освещении. При достижении стадии «черной головки» яйца помещают на среду.

Гусениц выращивают этапами, в зависимости от вида насекомого и целей наработки биоматериала.

На **первом** этапе за день до отрождения гусениц среду разливают по кристаллизационным чашкам ЧТК-180 (75-100 г в каждую) или по 0,5-литровым банкам (50 г). Посуду со средой перед заселением яйцами стерилизуют в течение суток в бактерицидном боксе. Затем на стерильную стеклянную пластинку (20x20 см) кладут квадрат проглаженной фильтровальной бумаги, в центре помещают кладку яиц (100-150 шт.), совок, накрывают чашкой и переносят в термостат. При разведении других видов на дно стерильных банок кладут кружки кальки, марлю с 50 яйцами и кусочками (3-5 г) среды. Закрытые тканевой салфеткой банки устанавливают в термостат до появления гусениц 3-го возраста.

На **втором** этапе (4-5-й возраст) гусениц совок переносят в новые чашки ЧТК-180 (50 особей в каждую), наносят шпателем свежую питательную среду на 1/3 внутренней поверхности чашек. За несколько дней до окукливания на дно насыпают немного стерильных опилок.

На **третьем** этапе (с 6-го возраста до окукливания) гусениц содержат в стерильных кюветах (45x35x8 см) из оцинкованной жести с опилками. В них помещают стеклянные пластинки с кормом. В каждую кювету помещают от 75 до 150 гусениц, в зависимости от вида совок. Для того чтобы гусеницы не расползались, кюветы закрывают тканевыми салфетками и закрепляют резинками. Добавление свежей среды, и удаление экскрементов производят ежедневно.

Через 4-5 дней после прекращения питания гусениц кюветы вскрывают, опилки просеивают и извлекают куколок, которых после разделения по признакам пола до вылета имаго хранят в эксикаторах по 75-100 шт при 20-21°C, ОВВ 65-75% и естественном освещении.

Общий выход имаго составляет в среднем 55-65% от числа отродившихся гусениц. Расход среды на выращивание 1000 особей колеблется от 5 до 10 кг в зависимости от

вида. В лабораторных условиях ежегодно можно наработать 20-25 тыс. имаго, 40-50 тыс. гусениц и 1,5-2,0 млн. яиц.

Порядок выполнения заданий.

- Изучить по коллекциям и раздаточному материалу морфологию энтомофагов, акарифагов и фитофагов, указать особенности пищевой специализации.
- Ознакомившись массовым разведением насекомых, выписать основные операции разведения трихограммы и зерновой моли, акарифагов - обыкновенного паутиного клеща фитосейулюса, а также методами разведения совок-фитофагов на искусственных питательных средах.

Контрольные вопросы:

- Расскажите о цикле развития трихограммы
- По какой методике массово размножают трихограммы
- Как получают бабочек зерновой моли?
- При каких условиях поддерживают жизнедеятельность бабочек и как получают яйца зерновой моли.
- Каким образом хранят трихограмму?

Лабораторная работа №6

Тема: Использование микробных биопрепаратов для борьбы с насекомыми-вредителями сельскохозяйственных культур. Определение титра спор бактериальных биопрепаратов.

Грибные биопрепараты. Титр грибных биопрепаратов.

Цель занятия – ознакомить студентов инсектицидным токсином, научить определять титр биопрепаратов;

– ознакомить грибными препаратами для борьбы с насекомыми-вредителями, научить определять титр грибных биопрепаратов.

Материалы к занятию: суточные культуры бактерий (суспензия), физиологический раствор, пипетки, пробирки, шпатели, чашки Петри картофельно-глюкозным агаром, камеры Горяева, колбы на 1000 мл, мерные пипетки на 10 и 1 мл, стеклянные палочки, посевные петли, спиртовки, предметные и покровные стекла, образцы препарата на основе гриба вертициллиума.

Оборудование: ламинар-бокс, термостат, микроскопы МБР-1, ФЭК, Vortex -6.

Задания:

- Определить титр бактериального препарата высеvom на плотную среду.
- Определить оптическую плотность бактериального препарата на ФЭКе.
- Сравнить данные полученные на ФЭКе и результаты раститровки препарата.
- Изучить методику определения титра суспензии конидиоспор гриба вертициллиума.

Для подавления численности вредных видов (фитофагов, фитопатогенов, сорняков) в защите растений все большее значение приобретают биологические препараты, а также средства, повышающие устойчивость растений к неблагоприятным факторам окружающей среды (бактериальные удобрения, регуляторы роста растений).

Из биопрепаратов наиболее распространены энтомопатогенные. В зависимости от природы энтомопатогенов различают бактериальные, грибные, вирусные препараты.

Известно, что насекомые тоже болеют. Еще Аристотель описал болезнь пчел. В 60-х годах XIX в. Л.Пастер установил, что ряд заболеваний шелковичного червя имеет инфекционный характер, и некоторые из них вызывают бактерии. Несколько позднее И.И.Мечников также столкнулся с бактериальными заболеваниями насекомых. Он считал возможным практическое использование паразитов насекомых и писал, что на них следует возлагать большие надежды для защиты растений. В интересах сельского

хозяйства следует распространить эпизоотии среди вредителей и таким образом бороться с возможными потерями урожая.

В первой половине XX в. культуры патогенных для насекомых бактерий стали применять на практике и в ряде случаев получили хорошие результаты: С. Метальников - в борьбе с вредителями хлопчатника. Он испытывал смеси микроорганизмов против разных вредителей. Высокая эффективность его биопрепаратов объясняется тем, что в их состав входила культура *Bacillus thuringiensis* Bert.

Вид *Bacillus thuringiensis* Bert. был открыт в 1902 г. Японским бактериологом Ишиватой, который выделил этот микроорганизм из больных гусениц тутового шелкопряда и продемонстрировал его способность вызывать инфекцию.

B. thuringiensis Bert. способен образовать устойчивые споры и продуцировать параспоровый кристаллический белок - эндотоксин, токсичный для насекомых различных видов. Круг чувствительности насекомых специфичен для различных таксономических вариантов *B. thuringiensis* Bert. Необходимое условие для патогенности – проглатывание кристалла, а в некоторых случаях и спор. Кристалл в кишечнике со щелочной pH той или иной личинки насекомого, благодаря воздействию среды и протеаз в средней кишке растворяется, белковый токсин частично гидролизует. Субъединицы токсина действуют на внутреннюю поверхность кишечника, вызывая его паралич и вытекание содержимого в гемоцель. Повреждение бывает таким тяжелым, что способно либо сразу убить личинку, либо очень ослабить ее и создать условия для роста и размножения в ней бактерий.

Кристаллический белок, образуемый клетками *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, имеет молекулярную массу 130 кДа. Под действием кишечных протеаз он гидролизует до нескольких пептидов размером 40-60 кДа, токсичен. Синтез кристалла и образование спор у бактерий происходит одновременно.

Из биопрепаратов наиболее распространены энтомопатогенные. Энтомопатогены, являющиеся элементами природного биоценоза, служат основой биопрепаратов против вредителей сельскохозяйственных и лесных культур. В зависимости от природы энтомопатогенов различают бактериальные, грибные, вирусные. Микробиологические средства борьбы с насекомыми-вредителями безопаснее токсичных химических агентов, в меньшей степени нарушают экологический баланс окружающей среды. Энтомопаразиты вызывают заболевание какой-то узкой группы насекомых-вредителей, и болезни их принимают характер эпизоотий, широко распространяются. Описано свыше 90 видов бактерий, инфицирующих насекомых. Большая часть принадлежит к семействам *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Micrococcaceae* и *Bacillaceae*.

По активному действующему началу бактериальные препараты на основе БТ делят на три группы:

- препараты, содержащие споры и кристаллы бактерий (энтобактерин, дендробациллин, лепидоцид),
- препараты, содержащие дополнительно к спорам и кристаллам термостабильный экзотоксин, продуцируемый некоторыми подвидами БТ (битоксибациллин),
- препараты, содержащие только очищенные токсины, вырабатываемые бактерией (турингин, битиплекс).

По действию на насекомых подвиды БТ относятся к разным патотипам:

- патотип А эффективен против Lepidoptera,
- патотип В – против Diptera,
- патотип С – против Coleoptera.

Для борьбы с вредными насекомыми в России выпускаются следующие биопрепараты:

-битоксибациллин, дендробациллин, лепидоцид, бацикон – для контроля численности вредных видов насекомых (колорадского жука, совок, белянок, шелкопрядов), которые заменяют химические инсектициды;

-бактокулицид – для подавления численности личинок кровососущих комаров в водоемах;

-актинидин – актиномицетный препарат, предназначенный для борьбы с паутинным клещом в закрытом грунте.

При применении бактериального препарата необходимо, чтобы титр его рабочей суспензии соответствовал рекомендуемой.

Определение титра спор бактериальных биопрепаратов проводят высевом на плотные питательные среды (метод Коха). В его основе лежит принцип Коха, согласно которому каждая колония является потомством одной клетки. Это позволяет на основании числа колоний, выросших после посева на плотную питательную среду определенного объема исследуемой суспензии, судить об исходном содержании в ней клеток микроорганизмов. Результаты количественного определения микроорганизмов выражают не в числе клеток, а условных колониеобразующих единицах (КОЕ).

Определение числа микроорганизмов включает три этапа: приготовление разведений; посев на плотную среду в чашки Петри и подсчет выросших колоний. Чашечный метод требует большой чистоты и аккуратности при выполнении всех операций. Необходимо тщательно оберегать пипетки и среды от заражения посторонними микроорганизмами. Приготовление разведений и высеvy лучше проводить в боксе.

Подсчет проводят через определенное время после посева в зависимости от скорости роста выделяемых микроорганизмов. Для посева используют разведение препарата, обеспечивающее рост не более 300 и не менее 50 колоний в одной чашке Петри. Разведение определяют делением предполагаемого титра на 300 и 50. Подсчитывают количество колоний, выросших при высеve из определенного разведения на двух чашках Петри. Результаты параллельных высевоv суммируют и определяют среднее число колоний. Колонии считают, не открывая чашки. Для удобства отмечают просчитанную колонию точкой на наружной стороне дна чашки маркером. При большом количестве колоний дно чашки делят на секторы, подсчитывают количество колоний в каждом секторе и результаты суммируют. Например, если при нанесении на чашку 0,1 мл культуры, разведенной в 1000000 раз, образуется 100 колоний, то количество бактериальных клеток в 1 мл исследуемой суспензии составляет $100 \times 10 \times 10^5$, т.е. 1×10^8 .

Известно более 400 видов грибов, поражающих насекомых и клещей, в том числе вредителей сельского хозяйства. Грибы обычно заражают насекомых путем прямой инвазии и способны вредить своим хозяевам, не будучи съеденными. Кроме того, один из основных признаков грибов – их способность спорулировать в мертвом теле хозяина. Они могут распространяться в популяции, вызывая эпизоотии. Они не только губят те особи, на которых поселяются, но и контролируют численность всей популяции хозяина в течение длительного времени. К сожалению, эффективность грибов в достаточной степени зависит от влажности и температуры. По этой причине некоторые из ныне существующих промышленных биоинсектицидов на основе грибов нацелены против тепличных и оранжерейных вредителей, поражающих внесезонные овощи и цветы.

При получении грибных препаратов используют три способа:

- поверхностное культивирование – выращивание биомассы в плоских емкостях на поверхности питательных сред;
- глубинный способ – выращивание биомассы в жидкой питательной среде в емкостях с перемешиванием;
- глубинно-поверхностный – комбинация двух способов.

Сначала культивирование проводится в глубинных условиях для накопления биомассы мицелия, затем биомасса помещается на поверхность питательной среды для массового спорообразования, поскольку для многих энтомопатогенных грибов

спорообразование может идти только на поверхности субстрата. Бластоспоры, получаемые в глубинной культуре, не могут долго храниться, и не приспособлены к размножению.

Производство грибных препаратов включает следующие стадии:

- – приготовление из маточной культуры посевной,
- – стерилизация среды,
- – инокуляция посевной культуры,
- – выращивание гриба,
- – высушивание грибного материала,
- – стандартизация, фасовка и хранение.

Наиболее известный энтомопатогенный гриб *Metarrhizium anisopliae*, описанный около 100 лет назад как зеленый мускатный гриб, был также первым грибом, который стали производить в промышленных масштабах. Конидиеносцы образуют палисадный слой, несущий на вершине конидии. Конидии яйцевидные, темно-зеленые. Возбудитель зеленого мускардиноза впервые выделен И.И. Мечниковым из хлебного жука-кузьки более 100 лет назад и составил основу первого в мире грибного энтомопатогенного препарата, производимого в промышленных условиях.

Гриб поражает разные группы насекомых. Создание биопрепаратов на основе энтомотрофных грибов технически труден, что связано с особенностью получения с помощью глубинного культивирования гриба. Срок хранения грибных препаратов короткий, со временем титр снижается.

Уже много лет в нашей стране используется гриб *Beauveria bassiana* в виде промышленного биопрепарата боверина, представляющий собой порошок, состоящий из конидиоспор гриба, с титром не менее 2×10^9 спор в 1 г. Он не токсичен для теплокровных животных. Препарат разрешен для обработки посевов картофеля против колорадского жука, вредной черепашки, картофельной коровки, свекловичного долгоносика, яблонной моли, плодоярков. Конидиеспоры гриба попав на тело насекомого, прорастают и проникают в полость, растворяя ферментами кутикулу. Мицелий разветвленный, септированный. Конидии шаровидные. Грибница пронизывает все тело насекомого, образуя на его поверхности слой конидиеносцев с конидиями. Хозяин погибает, а конидии переносятся ветром, дождем, самими насекомыми.

Entomophthora thaxteriana (*Conidiobolus obscurus* Rem. Et Kell.). На основе этого гриба создан препарат энтомофторин. Этот препарат особенно эффективен против тлей в условиях теплиц и оранжерей. Энтомофторовые грибы внутри насекомых образуют мицелий, который распадается на гифальные тела, которые разносятся гемолимфой по телу хозяина. На поверхности тела погибшего насекомого образуется бархатистый налет, состоящий из конидиеносцев с конидиями. Кроме конидий образуются покоящиеся споры, которые могут переживать неблагоприятные условия.

Verticillium lecanii (современное название - *Lecanicillium muscarium* Petch. Zare et W). На основе этого энтомопатогенного гриба успешно выпускаются промышленные биопрепараты – микотел, вартолек, вертициллин. Эти препараты в условиях оранжерей могут контролировать численность тлей и алейроид. Грибы образуют одноклеточные продолговатые бесцветные конидии, которые собраны в головки, соединенные слизью.

При применении грибного препарата необходимо, чтобы титр его рабочей суспензии соответствовал рекомендуемой. Титром называют количество спор гриба, находящегося в 1 мл суспензии или в 1 г сухого порошка. Для определения титра препарата, выросшего на пивном сусле-агара, делают смыв конидий и мицелия с поверхности агара несколько раз с 100 мл воды. Суспензию сливают в колбу, фильтруют через два слоя марли и доводят водой до 1 литра, что соответствует разведению в 1000 раз. При обильном спороношении полученную суспензию разбавляют еще в 10 и 100 раз, и по каплям наносят на две площадки камеры Горяева, покрывают покровным стеклом и хорошо притирают. Излишки жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Камеру

помещают на предметный столик при окуляре 10^{\times} и объективе 10^{\times} , находят средний ряд квадратов сетки, переводят объектив на увеличение 40^{\times} и подсчитывают число конидий. Подсчет проводят в 10 больших квадратах камеры, расположенных в среднем ряду сетки, пропустив при этом два первых и два последних квадрата. Если число конидий в большом квадрате превышает 50, для анализа берут суспензию с большим разведением. Вычислив среднее арифметическое числа конидий в одном большом квадрате, подставляют его в формулу для определения титра (Т) маточной культуры:

$$T = 25 \times 10^4 \times a \times p,$$

где а – среднее арифметическое числа конидий в большом квадрате, р – разведение (10, 100 и т.д.).

Порядок выполнения заданий.

Определение титра бактериального препарата высевом на плотную среду.

1. Стерильный физиологический раствор разлить по 9 мл в стерильные сухие 8 пробирок.

2. 1 мл исследуемой суспензии стерильной пипеткой перенести в пробирку с 9 мл физиологического раствора.

- Полученное разведение, сравнить со стандартом мутности на 10 единиц (соответствует 10^9 кл/мл) и новой стерильной пипеткой, несколько раз вбирая в пипетку и выпуская из нее тщательно перемешать полученную суспензию клеток.

- Затем той же пипеткой отобрать 1 мл суспензии и перенести во вторую пробирку, получая второе разведение 10^{-2} .

- Таким образом готовить последующие разведения.

- Посев. В чашки Петри пипеткой внести по 0,1 мл соответствующего разведения (из трех последних) и растереть его стеклянным шпателем досуха по поверхности агаровой среды. Из каждого разведения сделать по два параллельных высева.

- После посева чашки поместить в термостат при 37°C , перевернув крышками вниз, на сутки.

- Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычислить по формуле

$$M = a \times 10^n / V,$$

где М – количество клеток в 1 мл;

а – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения;

V – объем суспензии, мл;

10^n – коэффициент разведения.

- Пипеткой налить в кювету ФЭКа 1 мл бактериальной суспензии и измерить оптическую плотность при длине волны 540 нм относительно холостой пробы (питательная среда для культивирования бактерий).

- Если показания прибора больше 0,24 (соответствует 1×10^9 кл/мл) суспензию разбавить. При подсчете титра учитывать, во сколько раз разбавлялась суспензия. Показания прибора 0,24 соответствует титру 1×10^9 кл/мл.

- Сравнить данные полученные на ФЭКе и результаты раститровки препарата, сделать вывод.

Определение титра суспензии конидиоспор гриба вертициллиума.

- Сделать смыв конидий и мицелия с поверхности агара несколько раз с 100 мл

воды.

- Суспензию слить в колбу, фильтровать через два слоя марли и довести водой до 1 литра, что соответствует разведению в 1000 раз.

- По каплям суспензию нанести на две площадки камеры Горяева, накрыть покровным стеклом и хорошо притереть.
- Излишки жидкости удалить фильтровальной бумагой.
- Камеру поместить на предметный столик при окуляре 10^x и объективе 10^x, найти средний ряд квадратов сетки, перевести объектив на увеличение 40^x и подсчитать число конидий.
- Подсчет провести в 10 больших квадратах камеры, расположенных в среднем ряду сетки, пропустив при этом два первых и два последних квадрата.
- Вычислив среднее арифметическое числа конидий в одном большом квадрате, подставить его в формулу для определения титра (Т) маточной культуры.

Контрольные вопросы:

- Почему препарат на основе бактерий *B. thuringiensis* способен уничтожать вредных насекомых, каков механизм его действия?
- Какие биопрепараты выпускаются в России для борьбы с вредными насекомыми?
- Как определяют титр на ФЭКе?
- Почему необходимо определять титр биопрепаратов?

Лабораторная работа №7

Тема: Применение антибиотиков для защиты растений от болезней.

Антагонизм.

Цель занятия – ознакомить с антибиотиками, применяемыми в защите растений от болезней, и основными методами определения антагонистической активности микроорганизмов.

Материалы к занятию: чашки Петри с высевными газонами грибов *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, пипетки, микробиологическая петля, линейка, этиловый спирт 70%-ный, стерильные пробочные сверла, иглы препаровальные, вата, спиртовка.

Оборудование: термостат, ламинар-бокс.

Задания:

- Ознакомиться с методом перпендикулярных штрихов для выявления антагонистической активности бактерий.
- Методами агаровых блочков выявить антагонистическую активность штамма бактерий 26Д *Bacillus subtilis* по отношению к фитопатогенным грибам.
- Заполнить таблицу «Микробы-антагонисты и их применение для защиты растений»

Многие микроорганизмы в процессе своей жизнедеятельности образуют специфические продукты – антибиотики, которые обладают высокой физиологической активностью по отношению к другим микроорганизмам: вирусам, бактериям, актиномицетам, грибам, водорослям и простейшим полностью подавляя или задерживая их рост. В отличие от ядов антибиотики проявляют свое действие лишь по отношению к отдельным видам микроорганизмов, подавляя рост ограниченного их числа или широким спектром их действия. Наиболее часто встречаются среди стрептомицетов, спорообразующих бактерий и мицелиальных грибов продуценты антибиотических веществ.

Процесс образования антибиотических веществ тесно связан с развитием организмов-продуцентов и осуществляется на определенном этапе роста культуры. Развитие микроорганизмов-продуцентов антибиотика обычно является двухфазным. В первую фазу происходит нарастание биомассы и потребление основных компонентов

среды. Во вторую – рост замедляется, иногда в культуре начинают преобладать процессы лизиса, и именно в эту фазу происходит интенсивный биосинтез антибиотика.

Освобождению почвы от фитопатогенных организмов способствует усиления размножения в ней микробов-антагонистов по отношению к возбудителям тех или иных заболеваний. После посева люцерны почва очищается от возбудителя вертициллезного вилта хлопчатника (*Verticillium dahliae*). Корневая система люцерны выделяет в почву алкалоиды, угнетающие многие микроорганизмы, но и тем, что она стимулирует размножение в почве антагонистов возбудителя вертициллеза. Подобными свойствами обладают и растения рапса, промежуточная культура которого может быть использована между посевами других культур.

Возделывание клевера, вики способствует освобождению почвы от возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis*; житняк, картофель – благоприятствуют размножению этой бактерии. Борьба с болезнетворными микробами почвы возможна путем введения в севооборот тех или иных растений.

Хороший эффект дают культуры микробов-антагонистов при обработке семян, зараженных фитопатогенами, или при внесении на поверхность вегетирующих растений, а также в зараженную почву. Микроб-антагонист, уничтожая вредителя, не причиняет вреда растению-хозяину, они угнетают фитопаразитов не только в зоне корня. Вырабатываемые ими антибиотики проникают в ткани растений, повышая их устойчивость к возбудителям болезней.

Наиболее изучены в качестве антагонистов грибы рода *Trichoderma*. Если внести во влажную почву значительное количество *Trichoderma lignorum*, то он подавит выпревание проростков (болезнь «черная ножка»), благодаря действию токсина, который можно выделить из фильтратов культур гриба. Известно, что другие виды *Trichoderma* вступают в антагонизм или прямо паразитируют на многих грибах и способны существенно снижать заболеваемость, вызываемую рядом почвенных патогенов растений. Они широко распространены в почве и продуцируют активные антибиотики – виридин, глиотоксин, триходермин, соцукаллин, аламецин и другие, обладающие антигрибными и антибактериальными свойствами: против возбудителей корневых гнилей пшеницы и огурца, вилта хлопчатника, склеротинии подсолнечника и кукурузы, черной гнили моркови, болезней льна. Препарат из культуры гриба *Trichothecium roseum* – трихотецин действует против корневых гнилей пшеницы и ячменя, а в теплицах – против мучнистой росы огурца.

Триходерма относится к порядку гифомицетов класса несовершенных грибов. Гриб лучше размножается в почве, богатой органическими остатками. В ВИЗР разработаны формы препарата триходермина, различающиеся составом питательных сред при культивировании гриба. Это высококонцентрированные белково-углеродные среды (зерновки ячменя, овса, пшеницы, кукурузы), поверхностная культура гриба на измельченных и пропаренных субстратах (солома, различные травы, мякина, отходы зерна), использование в качестве среды перегретого торфа, выращивание в лабораторных условиях определенных штаммов гриба *T. lignorum* глубинным способом.

Кроме подавления развития почвенной инфекции, грибы из рода триходерма оказались активными против возбудителей болезней растений, распространяющихся в воздушной среде.

Представляет интерес отечественный препарат гризин – продуцент *Streptomyces griseus*, эффективный в борьбе с рядом грибных и бактериальных болезней растений (гуммоз хлопчатника, бактериальное увядание абрикоса). Он обладает также стимулирующим действием на растения. Используют также фитобактериомицин, продуцентом, которого является *Streptomyces lavandula*. Препарат применяют для обработки семян фасоли и сои в борьбе с бактериозами; пшеницы – корневыми гнилями.

За рубежом используют валидомицин – продуцент *S. hygroscopicus*, – специфично активный против фитопатогенных грибов рода *Rhizoctonia*, вызывающих увядание

листового влагалища риса, при борьбе с черной паршой и коричневой гнилью картофеля. В США и Японии выпускают несколько препаратов, содержащих антибиотик актидион, который готовят на основе *S. griseus*. Эти препараты активны против ржавчины сосны, вилта дуба, цитоспороза персика и сливы, мучнистой росы роз, при заболеваниях пшеницы и кукурузы, вызываемых грибами родов *Fusarium*, *Helminthosporium*, против твердой и пыльной головни ячменя, стеблевой ржавчины пшеницы.

Антибиотики отличаются друг от друга характером воздействия на микроорганизмы. Одни из них приостанавливают рост микроорганизмов или оказывают бактериостатическое действие, другие убивают микробные клетки, т. е. действуют бактерицидно, третьи вызывают не только гибель, но и лизис микробных клеток. На практике антибиотики стали применять в 40-х гг. XX столетия. Однако явление антагонизма у микроорганизмов было известно давно. Еще Л. Пастер отметил угнетение сибиреязвенной палочки (*Bacillus anthracis*) культурой синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*), И.И. Мечников изучал явление антагонизма у кишечной микрофлоры.

Техника использования микробов-антагонистов.

Для обеззараживания семян опрыскивают суспензионной культурой микроорганизмов, разведенной водой. При высадке рассады и саженцев их корни смачивают взвесью в воде соответствующих микробов-антагонистов. Водную взвесь микробов можно использовать и для опрыскивания надземных частей поврежденных растений по вегетации, а также для профилактических целей.

Препараты, для борьбы с почвенной инфекцией типа триходермина, вносят в почву при посеве.

Часто воздействие антибиотика меняется в зависимости от его дозировок. Антибиотики действуют в очень низких концентрациях. Биологическую активность их обычно выражают в условных единицах, содержащихся в 1 мл (ед/мл) или 1 мг препарата (ед/мг).

За единицу антибиотической активности принимают минимальное количество антибиотиков, способное подавить развитие или задерживать рост стандартного штамма микроорганизма в определенном объеме питательной среды. После того как антибиотики были синтезированы химически, условные единицы биологической активности стали выражать в единицах массы.

1 мг чистого основания стрептомицина эквивалентен 1000 единиц биологической активности. Известно более 3000 антибиотиков, их классифицируют по таким признакам:

- систематическая принадлежность организмов-продуцентов
- механизм биологического действия
- химическое строение.

Антибиотики, применяемые в защите растений должны подавлять развитие возбудителей, способны нейтрализовать выделяемые ими токсины и ферменты, повышать устойчивость растений к болезням, стимулировать рост, способствовать повышению урожая, активные, избирательно действующие, с низкой фитотоксичностью и способные проникать в растения и перемещаться по нему.

Преимущества антибиотиков перед синтетическими фунгицидами состоят в их более высокой экологической безопасности. Химические препараты вредно действуют не только на фитопаразитов, но и на высшие растения и микрофлору почвы, в то время как антибиотики обладают селективным действием – убивают вредителя и не вредят растению, в некоторых случаях оказывая даже стимулирующее действие. Недостатки – адаптация к ним патогенных микробов, аллергенность. Применение в сельском хозяйстве антибиотиков медицинского назначения также опасно. Это может содействовать появлению резистентных форм патогенных для человека и животных микроорганизмов. Поэтому микробиологи изыскивают антибиотики, которые могут быть использованы в растениеводстве.

Определение антибиотической активности микроорганизмов.

Существуют различные способы выявления антибиотических свойств микроорганизмов, которые основаны, на способности антибиотиков диффундировать в толщу агаризованной среды и образовывать зоны, где не растут тест-организмы.

Величина зоны отсутствия роста указывает на степень активности данного антибиотика в отношении тест-культуры и зависит от его концентрации, а также от плотности культуры тест-организма, состава и толщины слоя агаризованной среды, температуры инкубации.

В качестве тест-организмов используют представителей различных микроорганизмов, спорообразующие, дрожжи. Антибиотическую активность чаще всего выявляют методами перпендикулярных штрихов и агаровых блочков. В первом случае продуцент и тест-организмы выращивают на одной среде, во втором – на разных, поскольку не всегда одна и та же среда одинаково благоприятна как для развития продуцента и образования им антибиотика, так и для роста тест-организмов.

Метод перпендикулярных штрихов. На питательную среду в чашке Петри высевают по диаметру штрихом предполагаемый продуцент антибиотического вещества и инкубируют определенное время в термостате. После того, как продуцент вырастет, перпендикулярно к его штриху подсевают штрихами суспензий тест-организмов, начиная от периферии чашки. Чашки инкубируют при 28-30°C 2-8 суток в термостате.

Нечувствительные к антибиотику тест-организмы растут вблизи штриха продуцента. Если антибиотик оказывает действие на тест-организм, то его рост будет наблюдаться вдали от штриха продуцента. Чем больше это расстояние, тем более чувствителен тест-организм к антибиотическому веществу, образуемому изучаемым продуцентом.

Метод агаровых блочков предусматривает использование разных питательных сред для выращивания продуцента антибиотика и тест-организмов. В питательной среде продуцент антибиотического вещества высевают сплошным газоном, растирая суспензию, стеклянным шпателем и инкубируют в термостате. Затем стерильным пробочным сверлом (6-8 мм в диаметре) вырезают агаровые блочки с газона и переносят их на поверхность агаризованной среды, только что засеянной тест-организмом. Блочки (4-5 шт.) раскладывают на равном расстоянии друг от друга и плотно прижимают к агаровой пластинке.

Если тест-организм чувствителен к антибиотическому веществу продуцента, то после инкубации вокруг агаровых блочков образуются зоны отсутствия его роста. Чем больше выделяется антибиотика, и чем активнее он, тем больше будет диаметр зоны отсутствия роста тест-организма. Тест-организм, нечувствительный к антибиотическому веществу данного продуцента, растет по всей поверхности среды и даже вблизи блочка продуцента.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам можно определять с помощью готовых бумажных дисков, пропитанных определенными антибиотиками, а также используют метод с применением лунок в толще агара, где в лунки вносят растворы антибиотиков или культуральную жидкость. Этот метод позволяет выявить способность к образованию антибиотиков микроорганизмами, выращенными в жидкой питательной среде.

Порядок выполнения задания.

- **Метод перпендикулярных штрихов.**
- Взять две стерильные чашки Петри. На наружной поверхности дна чашек карандашом по стеклу провести две параллельные линии на расстоянии 8-10 мм друг от друга по диаметру чашки.
- В каждую чашку налить по 20 мл расплавленной агаризованной среды и дать застыть.

- На поверхность стерильного мясопептонного агар в чашке Петри высеять (по линии) суточную бульонную культуру микроба-антагониста (эту работу выполняют заранее).

- После того как микробы хорошо разовьются, перпендикулярно первичному посеву подсеять параллельными штрихами тест-организмы.

- Чашки поместить в термостат на 24 часа при 26-28°C.

- **Метод агаровых блоков.**

- Изучаемый микроорганизм заранее высеять сплошным «газоном» на поверхность агаровой пластинки в чашке Петри. Для этого суспензию спор перенести пипеткой на поверхность среды в чашке Петри и распределить по всей поверхности шпателем.

- Чашки поместить в термостат на 2-3 суток.

- Высеять на поверхность другой агаровой пластинки одного тест-микроба.

- Стерильным пробочным сверлом вырезать агаровые блочки из первых чашек и перенести их на поверхность только что засеянной питательной среды.

- Чашки поместить в термостат на 20-24 часа при температуре, благоприятной для развития тест - организма.

- Нарисовать схему методов перпендикулярных штрихов и агаровых блоков в рабочие тетради.

Таблица 1. Микробы-антагонисты и их применение для защиты растений

№п/п	Микроорганизмы	Действие	Культура	Возбудители болезней
1	Pseudomonas	Лизирует мицелий фитопатогенных грибов	Пшеница, лен	Botrytis, Sclerotinia
2				

Контрольные вопросы:

- Какие антибиотические вещества продуцирует грибок *Trichothecium roseum*?
- Какие отечественные препараты применяются для борьбы с фитопатогенами?
- Как классифицируются антибиотики?
- Каким образом действуют антибиотики на микроорганизмы?
- Как определяют антибиотическую активность микроорганизмов?

Лабораторная работа №8

Тема: Ознакомление с основными стадиями процесса мелкотоннажного получения биопрепаратов. Оценка качества готового продукта.

Цель занятия – ознакомить технологией получения бактериального биопрепарата «Фитоспорин» для защиты растений и методом контроля их качества.

Материалы к занятию: пробирки с питательными готовыми средами для культивирования бактерий («косяки»), пипетки, петля, хлорид натрия, мел, вода дистиллированная, колбы.

Оборудование: шейкер, автоклав, биореактор «БИОК», ламинар-бокс.

Задания:

- Изучить технологию производства биопрепарата на искусственной среде.

Производство микробных препаратов считается мерилем прогресса в сельском хозяйстве, а их применение - неотъемлемой частью высокоразвитого и экономичного земледелия и экологической защите растений. Использование биологических средств защиты растений позволяет снизить дозы применяемых химических пестицидов и минеральных удобрений, что приводит к повышению качества продукции и созданию экологически безопасных технологий возделывания сельскохозяйственных культур.

Условно микробные производства делят на три типа:

- использующие живую или инактивированную биомассу микроорганизмов (производство биологических средств защиты растений, почвоудобрительных препаратов, состоящих из биомассы азотфиксирующих бактерий и др.);
- производящие продукты микробного биосинтеза (аминокислоты, антибиотики, ферменты, гормоны, витамины);
- производящие продукты энергетического метаболизма (углеводы, биогаз, путем утилизации целлюлозы и различных отходов, получение спиртов, органических кислот).

Первые два типа производства лежат в основе получения препаратов для защиты растений.

В основе любого микробиологического производства лежит технология культивирования микроорганизма – продуцента целевого продукта – и селекции самого продуцента. Методы микробной биотехнологии (промышленной микробиологии) лежат в основе получения биопрепаратов, имеющих огромное значение для защиты растений. Производство микробиологических препаратов осуществляются в рамках биотехнологического процесса, основными компонентами которого являются: биологический агент, субстрат, целевой продукт, аппаратура и совокупность методов для управления процессом.

Традиционным биологическим агентом является микробная клетка. Постоянно пополняется арсенал микроорганизмов - продуцентов полезных веществ. Для биотехнологии нужны активные штаммы, а это требует селекции микроорганизмов:

- выделение штаммов из природных источников. Для этого ведут поиск и отбор активных природных штаммов из почвы, насекомых, с поверхности листьев.
- целенаправленное создание новых не существующих в природе биологических агентов экспериментальным путем (методами мутагенеза и генной инженерии). Это новый подход, которому уделяется большое внимание на современном этапе.

Критериями отбора новых штаммов являются: технологичность, вирулентность и спектр действия. Штамм должен превосходить по качеству эталонные культуры существующего продуцента необходимого препарата. Культуры микроорганизмов хранят на среде из свежезастывшего агара под вазелином, лиофилизированном состоянии, стабильность штамма обеспечивается при пересевах каждые 3-4 месяца.

Промышленное культивирование микроорганизмов осуществляют в ферментерах, где многочисленные трубки обеспечивают подачу воздуха, приток питательной среды, отток продукта. Равномерное распределение микробных клеток и питательных веществ достигается механическим перемешиванием среды. Культивирование микроорганизмов в лабораторных или промышленных условиях связано с их особенностями роста. Рост популяции бактерий происходит в виде S-образной кривой. В первоначальной фазе (лаг-фаза) микроорганизмы приспосабливаются к питательной среде. Во второй фазе – фазе ускорения, занимающей наибольший отрезок времени, скорость роста популяции увеличивается от нуля до максимума. Третья – экспоненциальная фаза или фаза логарифмического роста характеризуется максимальной скоростью роста. Четвертая фаза – замедление роста и пятая – отрицательная фаза развития. Последняя – ускоренного отмирания. Процесс культивирования останавливают на четвертой фазе.

Разные культуры отличаются по форме и сложности: простейшей формой культуры является гомогенная суспензия организмов одного типа в водной среде, поддерживаемая в постоянных физических условиях и содержащая минимальное число определенных

компонентов. К сложным культурам относятся культуры, содержащие более одного типа организмов, гетерогенной среде, измененными условиями культивирования.

Культивирование в жидких средах проводится методами: без смены среды, глубинного выращивания, проточных культур. При первом проводят одноразовую загрузку ферментера питательной средой, которую стерилизуют нагреванием под давлением или пропусканием перегретого пара, охлаждают до нужной температуры, вносят в нее микробную культуру и выращивают последнюю, пока не получат максимальное количество желаемого продукта. В этом случае из среды постепенно исчезают питательные вещества, изменяется pH и накапливаются в среде различные продукты обмена микробов. Этот метод часто применяется для накопления микроорганизмов, определения биохимических свойств и для изучения воздействия на них различных факторов среды (антибиотиков, бактериофагов). Затем культивирование прекращают, продукт выделяют, а ферментер готовят для нового культивирования.

При проточном культивировании микробов к культивационному сосуду подается с определенной скоростью питательная среда, чтобы культура успевала поглощать питательные основные компоненты. Благодаря условиям, предусмотренным конструкцией камер, выращиваемые микроорганизмы остаются на месте на специальной площадке, омываемой питательной смесью. Чтобы емкость не переполнялась, из него откачивают с той же скоростью содержимое. Этот метод был применен для изучения процессов накопления и исчезновения серы у серобактерий.

Метод глубинного культивирования применяется в производственных условиях для получения большого количества биомассы, необходимой при производстве дрожжей, антибиотиков, бактериальных удобрений (азотобактерин, нитрагин) и вакцин.

Выращивание бактерий в глубинных культурах с аэрацией производится в специальных реакторах, снабженных устройствами для стерильного внесения питательной среды, ее аэрации и перемешивания, поддержания определенной температуры, pH и газового состава (биореактор «Биок»).

Культуры микроорганизмов подразделяют на «открытые» и «закрытые» системы; открытой, когда все компоненты могут поступать в систему и покидать, закрытой – в которой хотя бы один из компонентов не может поступать в систему извне, или покидать ее. Непрерывные культуры, в которых приток питательной среды с одной стороны и отток продуктов метаболизма с другой являются открытыми. Периодическая культура, содержащая ограниченное первоначальное количество питательного субстрата пример закрытой системы.

Микробы, полученные манипуляциями генной инженерии, и полученные из них продукты метаболизма применяются для борьбы с болезнями растений, насекомыми-вредителями, грызунами. Микробиологические препараты, в отличие от химических, обладают строгой направленностью действия. Уничтожая фитопатогенные микроорганизмы, вредных насекомых и грызунов, они безвредны для человека и животных.

Разработаны технологии получения микробов-антагонистов, которые угнетают рост болезнетворной микрофлоры на растениях, а также технологии преобразования бактерий, обитающих в корневой зоне не бобовых растений, в направлении усиления их азотфиксирующей активности и придания им способности симбиотировать с этими растениями.

Достижения биологической инженерии и биотехнологии направлены на решение насущных проблем человека, на создание новых биологических систем, обладающими более ценными биосинтетическими возможностями.

Биопрепараты для подавления фитопатогенов. В настоящее время существует не только крупнотоннажное производство биопрепаратов, но и их наработка в условиях биолaborаторий или небольших фирм. Это позволяет максимально удовлетворить потребности местных (региональных) производителей сельскохозяйственной продукции.

Производство биопрепарата «Фитоспорин» включает в себя несколько этапов: подготовка посевного материала и питательной среды, стерилизация бутылей, инокуляция – подача жидкого посевного материала в бутылки, культивирование, разлив готовой продукции по стерильным емкостям.

Питательные среды для подготовки штамма бактерии 26Д и хранения культуры (1 л):

Среда Громыко:

Мясопептонный бульон (0.5 л)

Пивное сусло (0.25 л)

Вода водопроводная (0.25 л)

Агар-агар (20г)

pH 8.0

Мясопептонный бульон

Мясной воды 1:1 (0.5 л)

Пептон сухой ферментативный (0.01 кг)

Вода водопроводная (до 1л)

pH 7.2-7.4

Картофельный агар:

200 г очищенного картофеля, мелко нарезать на кусочки кипятить 1 час в 1 л воды на водяной бане. Затем фильтровать полученную массу и добавить по 20 г глюкозы и агара. Питательные среды автоклавировать при 1 атм в течение 20 минут.

• **Приготовление маточной взвеси микроорганизма.**

Для лабораторных научно-исследовательских целей нужен небольшой объем препарата. Для изготовления маточной биомассы необходимо проделать следующую работу: приготовить питательную среду МПБ («косяки»), раствор хлорида натрия 0.09

% (9 г на 1 л дистиллированной воды), пипетки и матрасы простерилизовать. Чтобы получить рабочую культуру исходные рассеивают на несколько «косяков» и инкубируют в течение 24 ч при 28°C, для этого из маточников пипеткой забирают часть культуры и наносят на косячки зигзагообразными движениями, инкубируют при 37°C 18 часов. Затем культуру смывают из пробирок 5 мл раствора хлорида натрия и пипеткой заливают в стерильные колбы или бутылки-матрасы с питательной средой, жидкость равномерно распределяют по поверхности агара. Инкубируют при 37°C 18 часов.

Затем из бутылей берут мазок и смыв культуры с 25 мл физиологического раствора, на ФЭК определяют титр, маточная взвесь микроорганизма должна содержать 1-3 млрд. клеток и спор в 1 мл.

• **Получение маточной биомассы.**

Готовят маточную культуру в емкостях 250 мл с 100 мл среды (сахарозы - 20 г, NaNO_3 - 3 г, KH_2PO_4 - 1г, MgSO_4 - 0.3 г, мел – 1 г, pH 7.0) на качалке при 35°C 72 часов. Маточную культуру используют для инокуляции бутылей. Посевной материал вносят в количестве 3-5 % от объема среды с титром не менее 200×10^6 кл/мл. На 5-литровых бутылках с 1 л жидкой питательной среды выращивают культуру при 30°C 24-36 часов. Среда для бутылей, г/л:

Меласса – 20 г, NaNO_3 – 3 г, KH_2PO_4 – 1 г, MgSO_4 - 0.3 г, мел – 1 г, при pH 7.5. Среду стерилизуют при 2 атм. 40 минут.

В банках емкостью 3-5 л с 2-3 л среды, культуру выращивают на качалках (220 об/мин) в термальной комнате при 35°C 24 часов. Посевной материал (маточная биомасса) вносят в количестве 5-10 % от объема среды.

• **Приготовление препарата, расфасовка.**

Для разлива готового продукта бутылки емкостью 10-20 л моют и стерилизуют 2 часа при 2-х атм., закрывая фольгой или крафт-бумагой. Жидкую среду разливают через

резиновый шланг с металлическим наконечником над пламенем. Шланг предварительно стерилизуют в течение 45 минут паром. Емкости закрывают резиновыми пробками, выдержанными в этаноле.

Жидкий препарат храниться в течение 6 месяцев, при соблюдении норм асептики, и если среда не содержит постороннюю микрофлору. На каждой партии препарата указывается дата изготовления, номер.

- **Определение биологической активности штамма**

Биологическую активность штамма *B.subtilis* 26D определяют посевом суточной культуры на питательную среду в центр чашек Петри (инкубируется 3-е суток при 28°C) и подсевом радиальными штрихами суспензию спор грибов и бактерий или методом агаровых блочков (см. лабораторное занятие №2). Учет результатов производят через 48-72 часа по величине задержки роста этих тест-культур (не ниже 12-15 мм).

Периодически пересеваемая культура в пробирках хранится при комнатной температуре 2-3, а в холодильнике – 6 месяцев.

Разные группы препаратов, характеризующихся различным путем заражения и характером действия, нельзя оценивать по одному стандарту. Все биопрепараты для защиты растений должны быть стандартизованы, иметь определенные показатели качества:

- стабильность препарата при хранении и применении,
- прилипаемость к поверхности растений и растекаемость,
- защищенность от УФ-излучения (защитный экранирующий эффект на микроорганизмы оказывают активированный уголь, окись титана, яичный альбумин), в этих целях перспективно также микроинкапсулирование.

Стандартизация биопрепаратов проводится по числу спор, включений, метаболитов и по биологической активности. Биологическая активность биопрепаратов отличается от активности штаммов-продуцентов, в препаративные формы включены различные ингредиенты.

Для биопрепаратов против болезней растений проводят по оценке антагонистических или антибиотических свойств штамма-продуцента на тест-объекте (фитопатогенном микроорганизме). Количественную оценку антибиотической активности биопрепарата проводят методом диффузии в агар с использованием лунок. В одну лунку вносится суспензия патогена, в другую – биопрепарата. Количественная оценка проводится по радиусу зоны ингибирования роста фитопатогена или инструментальными методами анализа (спектрометрия, хроматография).

Всемирная организация здравоохранения предложила тестирование всех биопрепаратов на безопасность по отношению к нецелевым объектам: растениям, рыбам, полезным членистоногим, птицам и животным.

Порядок выполнения заданий.

- Выписать основные этапы производства, дайте им краткую характеристику.

Технологический процесс производства жидкого препарата «Фитоспорин» в лабораторных условиях состоит из следующих этапов:

- подготовка посевного материала (матрасная культура),
- приготовление питательных сред, стерилизация посуды и материалов,
- получение маточной взвеси,
- инокуляция – подача жидкого посевного материала в бутылки,
- культивирование,
- разлив готовой продукции по стерильным емкостям (фасовка),
- определение биологической активности штамма,
- стандартизация биопрепаратов и оценка качества.

Лабораторная работа №9

Тема: Биоконверсия отходов - использование дождевых червей для переработки органических отходов.

Цель занятия – ознакомить технологией получения биогумуса как средство защиты растений от вредных организмов и повышения плодородия почвы.

Материалы к занятию: биогумус, схема приготовления биогумуса, дождевые компостные черви «Старатель».

Задания.

Внимательно изучить технологию производства биогумуса и выделить:

- Этапы получения вермикомпоста.
- Состав и свойства биогумуса.
- Эффективность применения биогумуса.

Гумус (от лат. humus) – плодородный слой почвы, или органическое вещество почвы, образующееся за счет разложения растительных и животных остатков и продуктов их жизнедеятельности. Гумус состоит из гуминовых кислот, содержит элементы питания растений, является основным показателем плодородия почвы. В естественных условиях образование 10 см слоя плодородной почвы с содержанием гумуса до 5% происходит в течение 100 лет.

Биогумус – экологически чистое биологически активное органическое удобрение создаваемое методом переработки органических отходов, соломы, листьев, опилок с помощью красного калифорнийского червя (технология вермикультивирования, от лат. vermi - червь). Широкое применение минеральных удобрений, пестицидов, химической мелиорации приводит к потере почвой гумуса и снижению почвенного плодородия. Чрезмерная химизация ведет перенасыщению сельскохозяйственных продуктов вредными для человека веществами нитратами. Негативное влияние на почву этих процессов успешно преодолевается с помощью биогумуса. По содержанию гумуса он в 4-8 раз превосходит навоз и компосты. В отличие от них он не обладает инертностью действия и способствует резкой прибавке урожайности (до 30%), вегетационный период у растений при этом сокращается на две-три недели. Это концентрированное удобрение содержит в сбалансированном сочетании целый комплекс необходимых питательных веществ и микроэлементов, ферменты, почвенные антибиотики, витамины, гормоны роста и развития растений. В нем большое количество гуминовых веществ, уникальное микробиологическое удобрение, в котором обитает полезное сообщество почвенных микроорганизмов, создающих плодородие земель, не содержит патогенную микрофлору, яйца гельминтов, семян сорняков и тяжелые металлы. Биогумус содержит большое количество питательных веществ и необходимые для растений микроэлементы. В биогумусе в два раза увеличивается численность азотфиксирующих микроорганизмов. Удобрение легко и постепенно усваивается растениями в течение всего цикла своего развития. Применение этого удобрения улучшает агрохимические свойства, повышает качество и улучшает урожай сельскохозяйственной продукции. (Первыми в стране начали исследование по переработке свиного навоза личинками комнатных мух ученые Новосибирского ГАУ).

Эффективность биогумуса:

- быстро восстанавливает естественное плодородие почвы, улучшает ее структуру;
- не обладает инертностью действия: растения, семена сразу реагируют на него;
- сокращает сроки прорастания семян, ускоряет рост и цветение растений, сокращает сроки созревания плодов на две-три недели;
- обеспечивает крепкий иммунитет у растений, повышая их устойчивость к стрессовым ситуациям, неблагоприятным погодным условиям, бактериальным и грибковым болезням вредным насекомым;

-обеспечивает высокую приживаемость саженцев и рассады, оптимальный рост цветов, их интенсивное и продолжительное цветение;

-значительно повышает урожайность и улучшает вкусовые качества выращиваемой продукции;

-связывает в почве тяжелые металлы и радионуклиды, не дает растениям накапливать нитраты;

-обеспечивает стабильный высокий экологически чистый урожай. Свойства биогумуса:

-он представляет собой выделения или копролиты дождевых червей: черную рассыпчатую и приятно пахнущую почвоподобную массу, похожую на чернозем;

-содержит большое количество (до 32% на сухой вес) гуминовых веществ – гуминовые кислоты, фульвокислоты и гумины, то что придает этому органическому удобрению высокие агрохимические и ростостимулирующие свойства, все питательные вещества находятся в нем в сбалансированном сочетании;

-не содержит патогенных микроорганизмов, яиц гельминтов, семян сорняков и тяжелых металлов;

-содержит в себе уникальное сообщество полезных для почвы и растений микроорганизмов, которые при внесении биогумуса в почву заселяют ее, выделяют фитогормоны, антибиотики, фунгицидные и бактерицидные соединения, что приводит к вытеснению патогенной микрофлоры.

Химический состав биогумуса.

№п/п	Химический состав	
1	Влажность	40-45
2	Зольность	35-45
3	Органические вещества	55-65
4	Гуминовые вещества	25-32
5	Азот общий	1,0-2,0
6	Фосфор общий	1,5-3,0
7	Калий общий	1,2-2,0
8	Кальций	4,0-6,0
9	Магний	0,6-2,3
10	Железо	0,6-2,5
11	Марганец	60-80мг/кг
12	Массовая доля тяжелых металлов, мг/кг	Ниже ПДК для почв
13	Патогенная микрофлора	отсутствует
14	Яйца гельминтов	отсутствует

Таким образом, полученный биогумус является высокоэффективным и экологически чистым органическим удобрением, применение которого улучшает агрохимические свойства и повышает качество и увеличивает урожай сельскохозяйственной продукции.

Дождевые черви и их экологическое значение.

Из большого количества дождевых червей семейства люмбрицидов (Lumbricidae) для вермикультуры пригодны навозный червь, обыкновенный дождевой червь. Дождевые черви – главные воспроизводители плодородия почвы. Это крупные почвенные беспозвоночные животные, самые древние и многочисленные на Земле. Только на территории России их насчитывается около 100 видов. Тело сильно вытянуто, в поперечном сечении округлое. Тело разделено на отдельные сегменты. Передний головной отдел тела – более толстый, с сильной мускулатурой и темнее окрашенный; задний (хвостовой) – более тонкий и бледный. На головном конце тела размещается рот, а на хвостовом – заднепроходное отверстие. По всей длине тела расположены щетинки – органы движения червя. Щетинки почти не видны, но если провести пальцами от заднего конца тела червя к переднему, то можно их почувствовать.

Все тело дождевого червя покрыто эпителием, в составе которого имеются железистые и камбиальные клетки, выделяющие прозрачную слизистую пленку. Это обеспечивает гладкость поверхности кожи и облегчает скольжение тела при движении. Взрослая особь имеет поясok (утолщение), который расположен в передней части тела с 24 по 32 сегмент (на 7-9 сегментах). Его функция – формирование яйцевых коконов. Дождевые черви обоеполые (гермафродиты). Однако для размножения требуется спаривание особей (копуляция). Они размножаются только путем откладки яиц, заключенных в особые яйцевые коконы, которые при оптимальных условиях откладываются один раз в 5-7 дней.

В естественных условиях обитания видовой состав и численность дождевых червей зависят от типа почвы. Они очень плодотворны. Каждая половозрелая особь откладывает за летний период по 18-24 коконов. В каждом коконе находится от 1 до 21 яйца. Через 2-3 недели из яиц появляются новые особи, а еще через 7-12 недель «новорожденные» уже сами способны приносить потомство.

Взрослые особи живут 10-15 лет, длина их составляет от нескольких до десятков сантиметров, а масса – до десятка граммов. Молодые особи по достижении половой зрелости весят до 1г. За летний период популяция из 50 червей в пахотном слое почвы на 1м² прокладывает километр ходов и выделяет на поверхность копролиты слоем 3 мм. Ещё больше их остается в толще почвы.

Каждый червь пропускает через пищеварительный канал за сутки количество почвы, равное массе его тела. Если средняя масса червя 0,5г, то при количестве их 50 особей на 1м² (500000 на га) за сутки на площади 1га ими перерабатывается 250кг почвы. В средней полосе активная деятельность червей продолжается 200 дней в году. За сезон они могут перерабатывать на гектаре 50т почвы, обеспечив ее гумусом.

В последнее время чаще используют красного калифорнийского червя – выведенного селекционным путем высокопродуктивную линию навозного червя. Этот крупный червь темно-красного цвета с длиной тела 6-8см, массой около 1г. Взрослый червь ежедневно потребляет количество пищи, равное массе его тела, а 60% поглощенного выделяет в виде экскрементов. Важная особенность этого червя – утрата способности покидать свое место обитания при неблагоприятных условиях среды. Поэтому его разводят под открытым небом. Черви, культивируемые на отходах, нуждаются в определенных условиях. Важнейшие из них – температура (15-20°C), влажность субстрата (80-90%), кислотность среды, состав корма.

Приготовление биогумуса включает следующие стадии:

- - **подготовка компоста:** сырьем для подготовки питательного субстрата может быть навоз сельскохозяйственных животных, помет птиц, выдержанный на ферме, фабрике в течение 6 месяцев. Категорически запрещается использовать в качестве корма для червей свежий навоз – черви погибнут.

- - **закладка червей в компост:** в случае использования навоза делают гряды 2х1м. На 1га размещается около 1000 таких гряд. Их заселяют коконами и червями разного возраста, равномерно распределяя их по поверхности, на каждый 1 м² 750-1500шт (2-3 кг массы червей на 1м²), кучу закрыть темным воздухопроницаемым материалом.

- - **уход и подкормка:** сводится к поддержанию температуры, рыхлению и поливу гряд (ящиков). Влажность компоста поддерживается на уровне 75-80%. Первую подкормку червей проводят через неделю после заселения их в компост – наслаивая свежий субстрат на одну четвертую поверхность гряд толщиной 3-5см. Через 3 недели - на всю поверхность вновь наносят 5-7см слой корма. Рыхление проводят 2 раза в неделю на глубину залегания червей и коконов без перемешивания слоев компоста.

- - **выборка червей из биогумуса:** перед тем, как выбрать червей и гряд, им дают поголодать несколько дней. На 1/3 часть гряд раскладывают порцию нового корма слоем 5-7см, в которую голодные черви перемещаются. Через два-три дня слой вместе с червями снимают, эту операцию повторить 3 раза в течение трех недель. Затем биогумус-сырец собирают совком, просушивают до 40% влажности.

Производители компоста получают маточную культуру червей у специализированных фирм. Приобретая один раз маточную культуру, производитель вермикомпоста в дальнейшем может обходиться собственными силами. С 1м² грядки в год собирают 12-18кг червей. Для отделения червей от компоста используют различные способы. Одни основаны на светобоязни червей, другие – на их способности чутко реагировать на изменение условий среды и режима питания. Червей определенное время не кормят и проводят дождевание. Они выползают на поверхность кучи, где их собирают. При больших объемах работ компост укладывают в кучу и начинают постепенно сгребать граблями слой за слоем до тех пор, пока черви не окажутся в одном месте (боясь света, они уползают внутрь кучи).

Контрольные вопросы:

- Какие этапы включает схема получения биогумуса?
- Каково значение биогумуса?
- Что такое вермиккультура?
- Каким образом отделяют червей от компоста?

ПРИЛОЖЕНИЕ ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

- Условия труда на рабочих местах должны соответствовать требованиям настоящих рекомендаций, действующих стандартов и другой нормативной документации по безопасности труда.

- Нарботка биопрепаратов производится в специально оборудованных лабораториях. В состав производственной биолaborатории должны входить: лабораторная комната для производства бактериологических препаратов и исследований, автоклавная, моечная, препаратурская, лабораторная комната для хранения запаса реактивов, посуды, аппаратуры, инвентаря. Оптимальная площадь рабочих комнат – 18-20 м², а высота помещений не менее 3 м.

- Стены, потолок, пол должны иметь гладкую легко моющуюся поверхность, непроницаемую для жидкостей, устойчивую к дезинфицирующим средствам.

- Поверхности рабочих столов должны быть устойчивы к дезинфицирующим веществам, кислотам, щелочам и к умеренному нагреванию.

1.5 Помещения лаборатории оборудуются приточно-вытяжной вентиляцией и, независимо от этого устройствами для естественной вентиляции (форточки, фрамуги, вентиляционные каналы). При ориентации на вентилирование помещений посредством открывания форточек и окон необходимо предусматривать сетчатые экраны для предотвращения залета и вылета насекомых.

- Около рабочих мест вывешивается на видном месте инструкция по охране труда, пожарной безопасности.

- Лаборатория снабжается средствами огнетушения (пенными, углекислотными огнетушителями, ящиками с песком) и пожарными кранами со шлангами.

- К работе при производстве биологических средств защиты растений допускаются лица, прошедшие специальные занятия по специализации инструктаж по безопасным методам производства.

- Все лица, занятые на работах с вредными и опасными условиями труда, должны проходить предварительный и периодический медицинские осмотры.

- К работам по производству и разведению полезных насекомых не допускаются дети и подростки до 18 лет, беременные женщины, кормящие матери, а также лица, имеющие незажившие раны, с хроническими заболеваниями органов дыхания, зрения, кожи, склонные к аллергическим заболеваниям.

- Следует предусмотреть помещения для хранения верхней одежды и личных вещей сотрудников, а также для принятия пищи и курения.

- Все работы с едкими, ядовитыми, сильно пахнущими, легковоспламеняющимися и взрывоопасными веществами производятся в изолированных (от общего помещения лаборатории) и обеспеченных надлежащей вентиляцией помещениях или вытяжных шкафах. При приготовлении моющих и дезинфицирующих растворов необходимо надевать резиновые перчатки и защитные очки. Для работы с микроорганизмами в лаборатории выделяется отделение или бокс.

- Запрещается использовать химическую посуду для пищевых целей.

- Запрещается пробовать на вкус или запах неизвестные вещества.

- Все работы по производству биологических средств защиты растений осуществляются под руководством главных или старших специалистов соответствующего профиля.

- По окончании рабочего времени каждый работник лаборатории обязан привести в порядок свое рабочее место, выключить электроприборы, закрыть водопроводные краны, выключить электроосвещение и вентиляцию.

- Дежурный по лаборатории обязан проверить все комнаты и имеющиеся в лаборатории приборы и электрооборудование и сдать лаборанту помещение в полном порядке.

- Ответственность за соблюдение правил охраны труда возлагается на непосредственных руководителей подразделений (начальников цехов, участков, зав. лабораторий), а в целом по предприятию ответственность несут директор и главный технолог (микробиолог или энтомолог).

- Виновные в нарушении рекомендаций по технике безопасности привлекаются к ответственности, а в более серьезных случаях к уголовной ответственности согласно действующему законодательству.

ПРАВИЛА РАБОТЫ С МИКРООРГАНИЗМАМИ

Общие требования и правила работы микроорганизмами на лабораторно-практических занятиях:

- работать в лаборатории в застегнутом халате и головном уборе (колпак, косынка);

- в лабораторном помещении не принимать пищу и воду, не курить, не допускать излишних разговоров и ненужных переходов;

- не допускать резких движений, отвлекать, ходить около тех, кто производит посев;

-соблюдать чистоту и опрятность в работе, работать сидя, до и после окончания работы тщательно продезинфицировать и вымыть руки с мылом;

-использованные пипетки, предметные и покровные стекла, шпатели, ватные тампоны поместить в сосуд с дезинфицирующим раствором (0,5-3%-ный водный раствор хлорамина, 3–5%-ный водный раствор фенола, 6%-ный раствор перекиси водорода);

-рабочий стол протирать дезинфицирующим раствором, как перед началом работы, так и после окончания;

-перед началом работы руки обрабатываются 70%-ным этиловым спиртом, дать высохнуть, только после этого зажечь спиртовку (во избежание ожогов);

-на рабочем столе не должно быть лишних предметов;

-все реактивы и растворы должны иметь этикетки и стоять на определенных местах;

-перед посевом на пробирке (колбе или чашке Петри) маркером написать название микроорганизма и дату посева;

-при проведении опытов с фитопатогенными грибами соблюдать особую осторожность: работать в масках, перчатках, остаток биоматериала сдать преподавателю для уничтожения автоклавированием;

-клетки микроорганизмов для посева или приготовления препаратов брать только бактериологической петлей, иглой, если они выращены на плотной среде;

-для взятия клеток из жидкой среды использовать стерильные пипетки;

-бактериологическую петлю (или иглу) перед взятием клеток микроорганизмов стерилизовать прокаливанием докрасна в пламени спиртовки;

-обжигать одновременно на пламени примыкающую к петле часть держателя, которая будет вводиться внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы;

-при прокаливании петлю держать в пламени почти вертикально, чтобы вся проволока была равномерно раскалена;

-сразу после стерилизации петлю (иглу) ввести в сосуд с микроорганизмами, но, вначале прикасаясь к внутренней поверхности сосуда или к питательной среде, свободной от клеток охладить, после этого только захватывать небольшое количество микробной массы;

-клетки микроорганизмов, оставшиеся на петле после приготовления препарата, сжигать в пламени спиртовки, затем петлю перевести в вертикальное положение, прокалить докрасна и только после этого ставить на место;

-все использованные материалы сжигать или обезвредить стерилизацией в автоклаве;

-стол, одежду, обувь и другие предметы, случайно загрязненные исследуемым материалом или культурой микроорганизмов, подвергают немедленной дезинфекции в присутствии преподавателя;

-помните, неаккуратное обращение с культурами микроорганизмов приводит к возникновению бактериального аэрозоля;

-после окончания работы поставить в термостат засеянные чашки и пробирки. Культуры микробов и остатки исследуемого материала сдать преподавателю, рабочее место продезинфицировать;

-производить влажную уборку и периодическую дезинфекцию всех рабочих помещений и оборудования.

Обязательные требования и условия работы с микроорганизмами в биолaborаториях и биофабриках:

- работа проводится только с производственными штаммами, имеющими заключение органов здравоохранения и безопасности; сведения о наличии авторского свидетельства; справку о депонировании штамма; паспорт на штамм; официальное подтверждение Госхимкомиссии о включении биопрепарата на основе штамма в список химических, биологических препаратов, разрешенных для применения в сельском хозяйстве. Производство микробиологических средств защиты растений в

биолaborаториях и на биофабриках возможно только при наличии утвержденных в установленном порядке ТУ и технологического регламента;

- в боксах и других специальных помещениях, где проводится работа с микроорганизмами, нельзя иметь пищевые продукты и прочие личные вещи. Работу с культуральной жидкостью, пастой, сухими препаратами следует проводить в респираторах типа ШБ «Лепесток» (ГОСТ 12.4.4028-76) либо в ватно-марлевой повязке, резиновых перчатках (ГОСТ 12.4.020-82), в головных уборах, глаза защищают герметическими очками (ГОСТ 12.4.013-85Е), в спецодежде;

- в процессе работы по посеву микроорганизмов запрещается пипетирование ртом. Необходимо пользоваться шприцем непрерывного действия, грушами;

- после работы рабочее место должно быть убрано и продезинфицировано 5%-ным раствором хлорамина, или 10%-ным раствором медного купороса, или 3%-ным раствором перекиси водорода не менее 1 раз в день;

- грязные пипетки обрабатываются в 5%-ном растворе перекиси водорода или фенола, затем стерилизуются в автоклаве при 1,5 атм. в течение 1 часа.

- халаты, шапочки, полотенца, используемые для работы с микроорганизмами, до стирки обеззараживаются автоклавированием при 1,5 атм в течение 1 часа или кипячением в 2%-ном растворе соды – 1 час. Ватно-марлевые маски, перчатки обрабатываются кипячением в 2%-ном растворе соды в течение 1 часа;

- категорически запрещается слив продуктов жизнедеятельности микроорганизмов в канализацию, а также хранение чашек и пробирок с культурами микроорганизмов в открытом виде. Использованная культуральная жидкость перед сливом в канализацию должна стерилизоваться автоклавированием. Условия сброса сточных вод должны быть согласованы с местными органами государственного санитарного надзора;

- после окончания работы вымыть рук и с теплой водой с мылом, прополоскать рот;

- соблюдение стерильности при работе с микроорганизмами обеспечивает качество наработки биопрепаратов и биобезопасность работников;

- для очистки воздуха помещения и в процессе сушки препарата необходимо использовать установки фильтрации воздуха, состоящие из последовательно установленных фильтров грубой очистки и фильтров для ультравысокоэффективной очистки из ткани ФПП-15-30;

- вентиляция должна обеспечивать не только поддержание санитарно-гигиенических условий в рабочем помещении, эффективную очистку воздуха, удаляемого из загрязненных помещений во внешнюю среду, а в особых случаях и очистку подаваемого воздуха;

- максимальная герметизация всех технологических процессов (культивирование грибов-продуцентов, переход от поверхностного к глубинному культивированию микроорганизмов);

- работы по расфасовке сухой биомассы обязательно выполнять под тягой в резиновых перчатках и защитных предохранительных очках;

- размол, растирание, измельчение грибных пленок должны производиться в специально приспособленных для этих целей установках;

- в производственных помещениях должен систематически проводиться анализы воздуха, характерные для данного производства;

- отделения сушки, размола, расфасовки и упаковки могут быть общие для нескольких технологических линий;

- сушку полуфабрикатов и препаратов необходимо осуществлять в закрытых аппаратах, работающих под разряжением с механической загрузкой и выгрузкой;

- хранение культур (бактерий, грибов, вирусов) осуществляется в специально отведенном и опломбированном шкафу или холодильнике в закрывающемся помещении. Каждая культура должна иметь надписи: наименование штамма и дату посева.

ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАСЕКОМЫМИ

- Массовое производство энтомофагов осуществляется путем искусственного размножения на специализированных предприятиях – биофабриках и биолaborаториях на основании утвержденных ТУ и технологических регламентов.

- Разведение энтомофагов (кроме трихограммы) ведется в инсектариях, небольших разводочных теплицах, или надежно изолированных боксах одной теплицы.

- Работы по выращиванию насекомых, сбору яиц, расфасовке их и освобождению их от пушка следует проводить в марлевой повязке или респираторе под вытяжкой.

- Обеззараживание яиц химическими реактивами проводится в резиновых перчатках и респираторе в вытяжном шкафу.

- При измельчении компонентов сред, их взвешивании и приготовлении корма следует пользоваться респираторами или марлевыми повязками.

- Работу с гусеницами и бабочками осуществляют в марлевых повязках.

- Не следует принимать пищу во время работы с насекомыми.

- По окончании работ необходимо провести полную уборку и обработку рабочего места в следующем порядке: использованные посуду, пипетки, трупы насекомых погружают в 3%-ный раствор хлорамина не менее чем на 8 часов, после чего передают на общую мойку. Затем проводят обработку поверхностей столов 3%-ным раствором хлорамина или 70%-ным этиловым спиртом.

- В конце рабочего дня боксовые помещения и предбоксы облучают бактерицидной лампой в течение 40-60 минут.

- Полы в лаборатории подлежат влажной ежедневной уборке с применением 1%-ного раствора хлорамина.

- Для промышленного разведения трихограммы используют механизированные линии, устанавливаемые на биофабриках и в биолaborаториях.

- При производстве энтомофагов должна быть обеспечена безопасность обслуживающего персонала.

- В трихограммных производствах для соблюдения поточности технологического процесса обязательно предусматривают набор следующих помещений: для автоклавирования зерна, разведения ситотроги, разведения трихограммы. Все помещения должны иметь достаточную освещенность.

- Стены и пол производственных помещений (цехи автоклавирования зерна, заражения зерна, ситотрожного, термостатного и трихограммного) необходимо отделать метлахскими плитками, устойчивыми к воздействию воды и дезинфицирующих растворов.

На полу всех цеховых помещений предусматривают уклон для стока промывных вод. Стоки должны обеззараживаться в локальных очистных сооружениях.

- Следует обеспечить биофабрики и биолaborатории централизованным водоснабжением и канализацией.

- Необходимо внедрять автоматизацию ручных процессов на производствах энтомофагов.

- Следует предусмотреть замену открытого способа получения яиц зерновой моли на закрытый: для этого важно обеспечить технологические линии герметическими барабанами с целью отделения бабочек от яиц зерновой моли.

- Производственные помещения должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией.

- В рабочей зоне производственных помещений должны быть обеспечены оптимальные сочетания величин температуры, относительной влажности и скорости

движения воздуха с учетом характера выполняемых технологических процессов и периодов года.

Соблюдение оптимальных параметров микроклимата обязательно при выполнении работ операторского типа, а также в местах временного отдыха рабочих.

На участках автоклавирования и заражения зерна, выращивания ситотроги наблюдается избыточное выделение тепла, рекомендуется соблюдение микроклиматических параметров согласно предъявленным требованиям технологического регламента.

- Воздуховоды от каждого цеха должны быть объединены в общую систему вытяжной вентиляции с установкой очистных сооружений типа простых циклонов.
- ПРАВИЛА РАБОТЫ В БОКСАХ
- Запрещается входить в бокс при включенной бактерицидной лампе. Работу можно начинать только спустя 30-40 минут после выключения ламп.
- В боксе и предбокснике не должно быть лишних предметов и оборудования, не предназначенных для работы, загораживающих выход из них и доступ к средствам пожаротушения.
- Работать в боксе в спецодежде.
- Запрещается использовать спецодежду, предназначенную для работы в боксе, если на ней имеются следы от пролитых легковоспламеняющихся или горючих жидкостей.
- При работе в боксе исключается использование нательного белья из синтетических материалов.
- Работы в боксе осуществляются при наличии одновременно не менее двух сотрудников.
- Перед началом и по окончании работ поверхность стола обрабатывают тампонами, смоченными этиловым спиртом и обжигают (расход спирта при этом не должен превышать 10-15 мл на 1 м² поверхности). Категорически запрещается эту операцию проводить путем разлива этилового спирта на поверхность рабочего стола и обжига его.
- Запрещается иметь в боксе легковоспламеняющиеся и горючие жидкости при работе со спиртовкой.

ПРАВИЛА РАБОТЫ С АВТОКЛАВАМИ И ПОДВЕСНЫМИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМИ КАЧАЛКАМИ

- При работе на автоклавах следует руководствоваться «Правилами эксплуатации и техники безопасности при работе на автоклавах».
- К обслуживанию автоклава могут быть допущены лица, достигшие 18 лет, прошедшие курсы по безопасному обслуживанию автоклавов и имеющие удостоверение о сдаче технического минимума по их устройству и эксплуатации.
- В автоклавной комнате запрещается загромождать проходы, хранить какие-либо материалы и предметы, проводить работы, не связанные с эксплуатацией или ремонтом автоклава.
- Автоклавы должны быть заземлены.
- Персонал, обслуживающий автоклавы, должен вести рабочий журнал, в котором записываются дата, время, режим стерилизации, кто проводил стерилизацию.
- В автоклавной обязательно наличие инструкции по режиму работы и безопасному обслуживанию аппаратов.
- Пол в стерилизационной комнате у рабочих мест изолируется резиновыми ковриками или деревянными решетками.
- О замеченных неисправностях немедленно доложить заведующему лабораторией или лицу, ответственному за безопасную эксплуатацию автоклава.

- Работать можно только с проверенными автоклавами и создавать давление не выше указанного в паспорте, приложенном к аппарату.
- Открывание крышки автоклава, а также его ремонт разрешается только при полном отсутствии давления в нем.
- Во время открытия крышки автоклава обслуживающий персонал должен находиться в стороне от крышки.
- Помещение автоклавной должно быть оборудовано средствами пожаротушения.
- К работе на качалке допускаются лица не моложе 18 лет, прошедшие инструктаж и обучение безопасным методам работы.
- Качалка должна устанавливаться на ровной горизонтальной поверхности в отдельном помещении.
- Включать качалку следует после правильного и прочного закрепления колб в гнездах и балансировки.
- Качалка должна быть заземлена.
- Во время работы необходимо следить за наличием смазки в подшипниках, не допускать перегрева, ослабления крепления колб в гнездах.
- По окончании работы следует отключить качалку от электросети и снять колбы, произвести запись в рабочем журнале о замеченных отклонениях в работе.
- Запрещается: устанавливать колбы без амортизационных колец; производить запуск качалки без проверки масла в подшипниках; работать на неисправной и незаземленной качалке; устанавливать число оборотов выше указанного в паспорте.

РАБОТА С ЛЕГКОВОСПЛАМЕНЯЮЩИМИСЯ (ЛВЖ) И ГОРЮЧИМИ ВЕЩЕСТВАМИ

- Работа с горючими веществами и ЛВЖ должна проводиться в вытяжном шкафу и только при включенной вентиляции и при выключенных электроприборах и газовых горелках.
- Запрещается при работе с ацетоном, спиртом, эфиром и др. проводить нагрев их на открытом огне, а также на всех электронагревательных приборах.
- ЛВЖ следует доставлять в лабораторию в закрытой посуде, помещенной в футляр.
- Общий запас одновременно хранящихся в рабочем помещении лаборатории огнеопасных жидкостей не должен превышать суточную потребность.
- В случае разлива ЛВЖ необходимо немедленно выключить нагревательные приборы. Жидкость следует засыпать песком, который затем убрать деревянным совком.
- Работу с ЛВЖ следует проводить в резиновых печатках, прорезиненных фартуках и защитных очках.
- При работе с ЛВЖ запрещается оставлять немытой лабораторную посуду и емкости освободившиеся из-под ЛВЖ.
- Отработанные горючие жидкости собирают в специально герметично закрывающуюся тару, которую в конце рабочего дня должны выносить из лаборатории для уничтожения. Спуск ЛВЖ в канализацию запрещается.

ПРАВИЛА РАБОТЫ С ХИМИЧЕСКИМИ ВЕЩЕСТВАМИ

- Все работающие с концентрированными едкими щелочами и кислотами, по приготовлению растворов фенола, формалина, перекиси водорода, хлорамина обязаны пользоваться защитными очками, резиновыми перчатками, прорезиненным фартуком и сапогами.
- При приготовлении растворов серной кислоты ее необходимо вливать тонкой струйкой при непрерывном перемешивании. Доливать воду в серную кислоту запрещается.
- Недопустимо засасывать кислоту в пипетку ртом. Для наполнения следует пользоваться резиновой грушей или другим приспособлением.

- Отработанные кислоты и щелочи собираются в специальную посуду, и после нейтрализации сливаются в специально отведенное место.

- Разлитые кислоты или щелочь необходимо немедленно засыпать песком или нейтрализовать, после чего провести влажную уборку.

- Кислоты и щелочи должны храниться на складах химреактивов в отдельном помещении.

- Склад химреактивов должен быть обеспечен в достаточном количестве средствами для нейтрализации пролитой щелочи или кислоты; для щелочи – борная или уксусная эссенция (одна часть эссенции на восемь частей воды), для кислот – 5%-й раствор соды.

- Все химические вещества должны иметь надписи с указанием названия и срока годности.

- При переливании жидкости нужно использовать воронки.

- Перелив дымящихся кислот и растворов аммиака должен производиться в вытяжном шкафу.

- Все концентрированные растворы кисло, кристаллический йод, фосфорнокислый ангидрид, азотнокислую медь и прочие легколетучие вещества следует хранить в специальной стеклянной посуде с притертыми пробками.

- Не допускается сливать через раковину концентрированные растворы агрессивных жидкостей.

ПРАВИЛА РАБОТЫ СО СТЕКЛЯННОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПОСУДОЙ

- При смешивании или разбавлении веществ, сопровождаемых выделением тепла, следует пользоваться термостойкой стеклянной или фарфоровой посудой.

- Нагретый сосуд нельзя закрывать притертой пробкой до тех пор, пока он не охладится.

- Все работы со стеклянной посудой необходимо проводить в защитных очках. Во избежание травмирования рук при работе со стеклом руки защищают полотенцем или куском материи.

- Нагревая жидкость в пробирке, необходимо держать пробирку так, чтобы отверстие не было направлено на людей.

- При надевании резиновых на стеклянные трубочки нужно правильно подобрать их диаметр, смачивать при надевании внутреннюю сторону резиновой трубки водой или глицерином.

- При выгрузке из автоклава или сушильного шкафа стеклянной посуды следует пользоваться матерчатыми рукавицами или трикотажными перчатками.

- Для нагревания стеклянной посуды необходимо пользоваться сеткой или закрытыми электроплитами.

- Запрещается пользоваться разбитой или треснувшей посудой, ставить ее непосредственно на огонь и убирать битое стекло незащищенными руками. Битое стекло следует складывать в специально отведенную емкость.

ПРАВИЛА РАБОТЫ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ МИКРОСКОПАМИ (МБ, МБС, МП, МЛ, МУФ, МИК, ЭС)

- Перед началом работ с микроскопа удаляется пыль мягкой кисточкой или чистой тряпочкой. Затем микроскоп ставится на стол перед наблюдателем так, чтобы окуляр приходился против левого глаза наблюдателя, проверить наличие в трубках окуляра одинакового увеличения.

Разворотом тубусов необходимо установить окулярные трубки в соответствии между глазами так, чтобы поля двух трубок слились в одно. Необходимо ознакомиться с устройством микроскопа и правилами работы с ним по описанию, которое приложено к микроскопу.

- Справа от микроскопа на столе должны располагаться необходимые реактивы, инструмент, предметные и покровные стекла, журнал для записи.
- Переносить микроскоп можно только двумя руками. При этом одной рукой берутся за изгиб тубусодержателя, а другой поддерживают основание штатива.
- Необходимо предохранять микроскоп от толчков, царапин и соприкосновения с кислотами щелочами, растворителями.
- Не следует вынимать из тубуса окуляр, чтобы не загрязнять пылью тубус и объекты.
- Следить за тем, чтобы осветитель выключался каждый раз, когда наблюдатель прерывает работу с микроскопом. Это позволяет сохранить лампочки накаливания от быстрого перегорания.
- После окончания работы микроскоп протирают и ставят в футляр или накрывают колпаком.

ПРАВИЛА РАБОТЫ С ЭЛЕКТРООБОРУДОВАНИЕМ, КОНТРОЛЬНО-ИЗМЕРИТЕЛЬНЫМИ ПРИБОРАМИ И СРЕДСТВАМИ АВТОМАТИЗАЦИИ ПРОИЗВОДСТВА

- Ввод электроустановок в эксплуатацию возможен только при наличии соответствующего технического персонала и назначения лица, ответственного за электрохозяйство.
 - К работе электрооборудованием допускаются лица, прошедшие специальное обучение и имеющие не ниже 3-й квалификационной группы электробезопасности.
- При работе с электроприборами необходимо руководствоваться правилами, изложенными в техническом паспорте.
- Все работы следует проводить при исправном состоянии электропроводки, электрооборудования, арматуры и заземляющих устройств, иметь данные проверок сопротивления, заземления и изоляции электросети.
 - Металлические части электроустановок, которые могут отказаться под напряжением, должны быть заземлены.
 - При обнаружении дефектов в работе электрооборудования требуется немедленно вызвать электриков. Самостоятельно устранять неисправности категорически запрещается.
 - При эксплуатации электроустановок запрещается:
 - использовать кабели и провода с изоляцией, имеющей повреждения или утратившей в процессе эксплуатации защитные и электроизоляционные свойства;
 - пользоваться электронагревательными приборами без огнестойких подставок, а также оставлять их на длительное время включенными в сеть без присмотра;
 - применять для отопления помещений нестандартные нагревательные электропечи или электрические лампы накаливания;
 - оставлять под напряжением кабели и провода с неизолированными концами;
 - пользоваться неисправными розетками, выключателями, рубильниками и другими электроустановочными деталями;
 - вешать на проводах, роликах и выключателях какие-либо предметы, одежду;
 - оборачивать электрические лампы бумагой, материей и другими горючими материалами.
 - Все электродвигатели должны иметь соответствующую защиту от коротких замыканий и перегрузки.
 - На электродвигатели и приводимые ими механизмы наносятся стрелки, указывающие направление вращения механизма и электродвигателя.
 - Электропроводка и арматура силовой осветительной сети в производственных помещениях должны быть надежно изолированы.

- В случае перерыва в подаче электроэнергии все электрооборудование и приборы необходимо отключить от сети.
- Освещенность на рабочем месте должна быть не ниже 300лк.
- В случае загорания электрических проводов или электрических приборов необходимо выключить рубильник и гасить огонь при помощи углекислотного огнетушителя.
- Недопустимо использовать приборы, если в них замечены искрения или чувствуется запах горелых проводов.
- По окончании работы обесточить имеющиеся в лаборатории электрооборудование, убрать за собой рабочее место.

ПОЖАРНАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

- Лаборатория снабжается средствами пожаротушения.
- Нерастворимые в воде органические вещества следует тушить песком или накрыванием асбестом или кошмой.
- Во избежание пожара запрещается:
 - оставлять без присмотра включенное оборудование;
 - допускать перегрузки электродвигателей;
 - хранить на рабочих местах промасленную ветошь, тряпки и другой горючий материал;
 - сушить одежду на горячих трубопроводах.
- При возникновении пожара в лаборатории все огнеопасные и взрывчатые вещества должны быть убраны в безопасное место, которое следует особо предохранять от пламени.
- Все имеющиеся под рукой средства тушения надо немедленно использовать и одновременно вызвать пожарную команду.
- Для тушения пожара, возникшего от загорания газов, горючих жидкостей, электрической проводки и электродвигателя, применяют порошковые и углекислотные огнетушители, сухой песок, кошму.
- Воздушно-пенные огнетушители применяются для тушения различных веществ и материалов, за исключением щелочных металлов и электроустановок.

ПРАВИЛА РАБОТЫ С ПЕСТИЦИДАМИ В ИНСЕКТАРИЯХ И ТЕПЛИЦАХ

- Безопасность при работе с пестицидами для защиты растений от вредителей, болезней и сорняков должна быть обеспечена на всех этапах в соответствии с ГОСТ 12.3.002-75, ГОСТ 12.1.007-76.
- Концентрация вредных веществ в воздухе производственных помещений, в рабочей зоне и на территории населенных пунктов при работе с пестицидами не должна превышать предельно допустимые нормы.
- Все виды работ по обработке растений и обеззараживанию садков, боксов, инсектариюв и теплиц осуществляются с помощью ручных и стационарных опрыскивателей.
- При ручной обработке растений пестицидами работающие должны располагаться друг от друга на расстоянии не менее 5-6м и следить за тем, чтобы факел распыла не направлялся на работающих, электротехнические установки и коммуникации.
- Работающие, связанные с рыхлением почвы в теплицах, без использования индивидуальных средств защиты следует проводить не ранее чем через 5 дней после обработки растений пестицидами.

СРЕДСТВА ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ

- Для защиты органов дыхания, слизистых оболочек, кожи при производстве биологических средств защиты растений (биопрепаратов, энтомофагов) все работающие должны обеспечиваться средствами индивидуальной защиты.

- На работах с вредными условиями труда, а также на работах в особых температурных условиях или связанных с загрязнением, рабочим и служащим выдаются бесплатно по установленным нормам специальная одежда, специальная обувь и другие средства индивидуальной защиты.

- Обеспечение средствами индивидуальной защиты должно осуществляться с учетом физико-химических и токсических свойств биологических средств защиты растений, их препаративных форм, условий труда, а также в соответствии с ростом и размером одежды индивидуально для каждого работника.

- Все работающие обеспечиваются спецодеждой из хлопчатобумажной ткани с водоотталкивающей пропиткой или без нее; костюмами (ГОСТ 12.4.085/86-80), халатами (ГОСТ 24700-81), комбинезонами (ГОСТ 12.4.99/100-80), фартуками рабочими типа В из парусины или полупеньковой ткани с водонепроницаемой пропиткой (ГОСТ 12.4.029-76), сапогами резиновыми (ГОСТ 12.4.071-79) или кирзовыми (ГОСТ 12.4.060-78), перчатками латексными (ТУ 38-106-394-81) или резиновыми (ТУ 38-106-356-79).

- Для защиты органов дыхания от воздействия аэрозоля микроорганизмов, продуктов их жизнедеятельности и других биологических компонентов следует использовать противопылевые респираторы либо ватно-марлевую повязку.

- На производстве микробиологических средств защиты растений должны быть шланговые противогазы типа ПШ-1, ПШ-2 или ДПА-5, применяемые при чистке ремонте ферментеров и других аппаратов.

- Для защиты глаз при производстве биопрепаратов следует применять: очки защитные ПО-2, (ПО-3), очки «Моноблон», очки защитные закрытые СЗЗМ-бц.

- Для защиты кожи рук при работе с пылевидными препаратами используются хлопчатобумажные рукавицы с водоотталкивающей пропиткой или без нее, а также защитные мази (пасты) на жировой основе.

- Спецодежду ежедневно после окончания работы должны очищать от пыли путем встряхивания, выколачивания или чистки при помощи пылесоса.

- Кроме механического удаления пыли не реже чем через 6 рабочих смен необходимо проводить стирку (дезинфекцию) спецодежды с обязательным кипячением в щелочном растворе.

- Перед едой и после окончания работы необходимо снять спецодежду, вымыть с мылом лицо и руки, прополоскать рот и нос, в конце рабочего дня принять душ.

МЕРЫ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ ПРИ НЕСЧАСТНЫХ СЛУЧАЯХ

- Все работающие должны знать и уметь оказать первую помощь при несчастных случаях.

- При ранениях любой степени, ожогах, поражениях электрическим током и других несчастных случаях пострадавшему на месте оказывают первую помощь. При необходимости вызывают скорую помощь или направляют в медицинское учреждение.

- В каждом подразделении биологической лаборатории должна быть аптечка первой помощи.

- При ранениях стеклом нужно удалить его осколки из ранки и, убедившись, что там их больше нет, смазать рану йодом и перевязать.

- При попадании едких жидкостей на тело работающего нужно немедленно обрабатывать пораженное место в течение 10-15 минут струей воды.

- При попадании кислоты в глаза необходимо промыть глаза водой из крана и немедленно обратиться к врачу.

- При попадании кислоты на тело следует промыть пораженные места 2-3%-м раствором двууглекислого натрия, а при поражении щелочью промыть 3-5%-м раствором уксусной кислоты.

- При термических ожогах первой и второй степени обожженное место можно присыпать двууглекислым натрием. Лучшим средством для примочек является

абсолютный или 96%-й этиловый спирт, он оказывает одновременно и обеззараживающее и обезболивающее действие.

- При поражении электрическим током – срочно вызвать врача, немедленно обесточить пострадавшего. Используя резиновые перчатки, сухую одежду, палку, доску или какой-либо другой сухой непроводник. При необходимости делают наружный массаж сердца или искусственное дыхание, или одновременно и то и другое.

- При тепловом ударе пострадавшего помещают в прохладное место и обеспечивают доступ свежего воздуха. Укладывают его так, чтобы голова была выше ног, обмахивают лицо и смачивают голову и грудь холодной водой. Если ослабеет дыхание, делают искусственное дыхание и непрямой массаж сердца, срочно вызывают врача.

- При попадании культуры микроорганизмов на слизистую оболочку и кожные покровы необходимо слизистую оболочку обработать проточной водой, кожные покровы обработать дезраствором 0,5%-го хлорамина или 1-3%-м раствором перекиси водорода и дополнительно промыть теплой водой с мылом.

- При случайном попадании бактериальных, грибных и вирусных препаратов в глаза, ротовую полость или кожу следует промыть загрязненные места струей воды с добавлением соды - одна ложка (чайная) пищевой соды на стакан воды.

- При появлении признаков раздражения кожных покровов, слизистых оболочек или аллергических явлений необходимо прекратить работу с биологическими препаратами и обратиться к врачу.

- При заглатывании раздражающих веществ следует выпить обволакивающее средство. Запрещается давать молоко, жиры, алкогольные напитки.

- При наличии судорог необходимо исключить всякие раздражения, предоставить больному полный покой.

- Общие меры первой помощи, предпринимаемые независимо от характера яда, вызвавшего отравление, направлены на прекращение поступления яда в организм:

- через дыхательные пути (необходимо удалить пострадавшего из опасной зоны на свежий воздух);

- через кожу (тщательно смыть препарат струей воды, лучше с мылом или, не размазывая по коже и не втирая, снять его куском ткани, затем обмыть холодной водой или слабощелочным раствором; при попадании яда в глаза – обильно промыть их водой, 2%-м раствором пищевой соды или борной кислоты);

- через желудочно-кишечный тракт (дать выпить) несколько стаканов воды, желательно теплой, или слабо-розового раствора марганцовокислого калия и раздражением задней стенки глотки вызвать рвоту; проводить эту процедуру 2-3 раза. Рвоту также можно вызвать с помощью горчицы (1/2 - 1 чайная ложка сухого порошка на стакан теплой воды), соли (2 столовые ложки на стакан теплой воды). Нельзя вызывать рвоту у больного в бессознательном состоянии или судорожным синдромом. После рвоты дать выпить полстакана воды с 2-3 столовыми ложками активированного угля, а затем солевое слабительное (20г горькой соли на полстакана воды).

- При кожных кровотечениях прикладывают тампоны, смоченные перекисью водорода, при носовых кровотечениях пострадавшего укладывают, приподнимают и слегка запрокидывают голову, прикладывают тампоны, увлажненные перекисью водорода.

- Наружные кровотечения подразделяются на:

- капиллярное – при поверхностных ранах, при этом кровь из раны вытекает по каплям;

- венозное – при более глубоких ранах (резаных, колотых), происходит обильное вытекание крови темно-красного цвета;

- артериальное – при глубоких рубленых, колотых ранах, кровь ярко-красного (алого) цвета бьет струей из поврежденных артерий, где она находится под большим давлением.

- Для остановки кровотечения необходимо:
- поднять раненую конечность;
- закрыть кровоточащую рану перевязочным материалом (из пакета), сложенным в комочек, придавить сверху, не касаясь пальцами самой раны и в таком положении, не отпуская пальцев, держать в течение 4-5 мин. Если кровотечение остановится, то, не снимая наложенного материала, поверх него наложить еще одну подушечку из другого пакета или же кусок ваты и забинтовать раненое место с небольшим нажимом, чтобы не нарушать кровообращения поврежденной конечности;

- при сильном кровотечении, если его невозможно остановить давящей повязкой, следует сдавить кровеносные сосуды, питающие раненую область, пальцами, жгутом или закруткой, либо согнуть конечности в суставах. Во всех случаях обильного кровотечения необходимо срочно вызвать врача.

- Быстро остановить кровотечение можно, прижав достаточно сильно пальцами кровоточащей сосуд к подлежащей кости выше раны (ближе к туловищу). Кровотечение из раны останавливают (рисунок 1):

- на нижней части лица – прижатием челюстной артерии к краю нижней челюсти (1);

- на виске и лбу – прижатием височной артерии впереди козелка уха (2);

- на голове и шее – прижатием сонной артерии к шейным позвонкам (3);

- в подмышечной впадине и плече – прижатием подключичной артерии к кости в подключичной ямке (4);

- на предплечье – прижатием плечевой артерии посередине плеча с внутренней стороны (5);

- на кисти и пальцах рук – прижатием двух артерий (лучевой и локтевой) к нижней трети предплечья у кисти (6);

- на бедре – прижатием бедренной артерии в паху (7);

- на голени – прижатием бедренной артерии в середине бедра (8);

- на стопе и пальцах ног – прижатием артерии, идущей по тыльной части стопы (9) или задней большеберцовой (10).

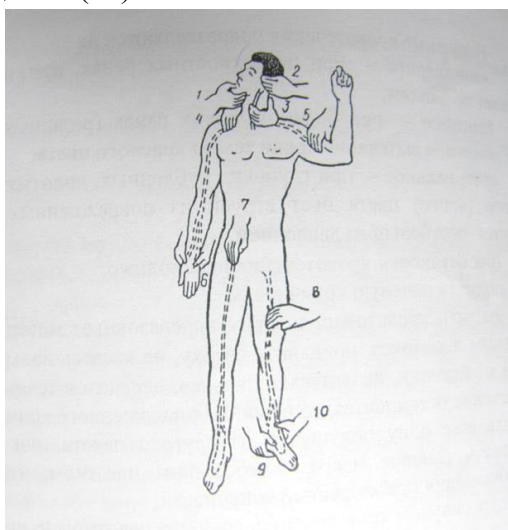


Рисунок 1. Остановка кровотечения пальцами рук.

- Кровотечение из конечности может быть остановлено сгибанием ее в суставах, если нет перелома костей этой конечности. У пострадавшего следует быстро засучить рукав или брюки и, сделав комок из любой материи, вложить его в ямку, образующуюся

при сгибании сустава. Расположенного выше места ранения, затем сильно, до отказа, согнуть над этим комком. В таком положении руку или ногу привязывают к туловищу пострадавшего (рисунок 2).

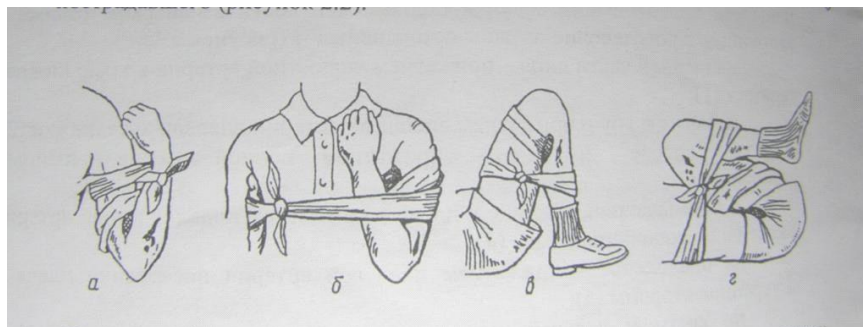
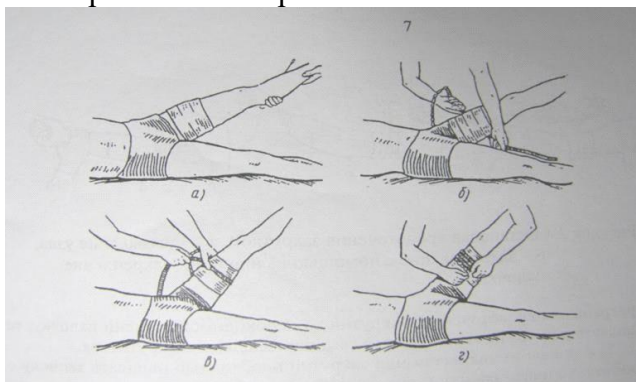


Рисунок 2. Сгибание конечности в суставах для остановки кровотечения: а – из предплечья; б – из плеча; в – из голени; г – из бедра.

Когда сгибание в суставе применить невозможно (при одновременном переломе костей той же конечности), то при сильном кровотечении следует наложить на конечность жгут (рисунок 3). В качестве жгута лучше использовать какую-либо упругую растягивающую ткань, резиновую трубку, ремни, подтяжки и т.п. Перед наложением жгута конечность (руку или ногу) нужно поднять. Жгут накладывают в растянутом состоянии, и между оборотами жгута не было непокрытых участков кожи. Место наложения жгута должно быть обернуто чем-либо мягким, чтобы не прищемить кожу.

Можно накладывать жгут поверх рукава или брюк. Перетягивание жгута конечности не должны быть чрезмерным, чтобы не повредить нерв, натягивать жгут нужно только до прекращения кровотечения. Если после наложения жгута пульс прощупывается, то жгут наложен правильно. Если прощупывается, то жгут снимают и накладывают снова. Держать жгут более 1,5-2 часов (зимой более 1 часа) не допускается, так как это может привести к омертвлению конечности.



Боль, которую причиняет наложенный жгут, бывает очень сильной, в силу чего иногда приходится на время снять жгут. В этих случаях перед тем, как снять жгут, необходимо прижать пальцами артерию, по которой идет кровь к ране, и дать пострадавшему отдохнуть от боли, а конечности – получить некоторый приток крови. После этого жгут накладывают снова. Распускать жгут следует постепенно и медленно. Даже если пострадавший может выдержать боль жгута, все равно через 1 час его следует обязательно снять на 10-15 минут.

Рисунок 3. Наложение жгута: а – подготовка к наложению жгута; б – подведение жгута под бедро и растяжение жгута; в - последующие обороты жгута; г – закрепление жгута.

В случае отсутствия жгута на конечность накладывается закрутка (рисунок 4), сделанная из не растягивающегося материала: галстука, пояса, скрученного платка или полотенца, веревки, ремня.

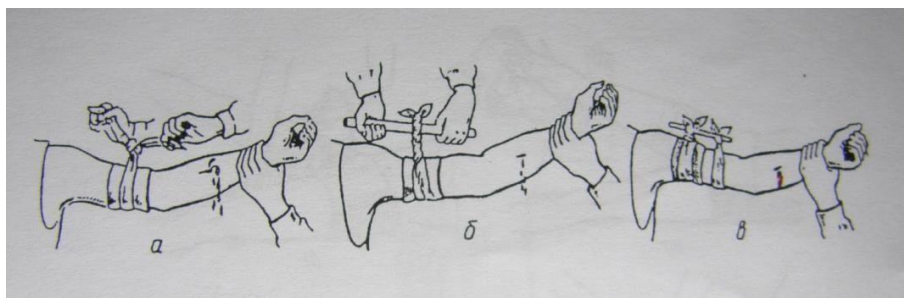


Рисунок 4. Остановка кровотечения закруткой: а - завязывание узла; б - закручивание с помощью палочки; в - закрепление палочки.

Материал, из которого делается закрутка, обводится вокруг поднятой конечности, покрытой чем-либо мягким (несколькими слоями бинта) и связывается узлом по наружной стороне конечности. В этот узел или под него продевается какой-либо предмет в виде палочки, который закручивается до прекращения кровотечения. Закрутив до необходимой степени палочку, ее закрепляют так, чтобы она не смогла самопроизвольно раскрутиться.

После наложения жгута или закрутки необходимо написать записку с указанием точного времени его наложения в 24 – часовом исчислении (02 ч. 35 мин., 19 ч. 38 мин) и вложить ее в повязку под бинт, но так, чтобы она хорошо была видна.

ПЕРВАЯ ПОМОЩЬ ПРИ ПЕРЕЛОМАХ, ВЫВИХАХ, РАСТЯЖЕНИЯХ

Переломы могут быть закрытыми (без нарушения целостности кожных покровов над местом перелома) и открытыми, когда повреждена кожа и мышцы и появляется видимая рана на месте перелома.

При открытом переломе, прежде всего, следует остановить кровотечение и наложить на рану стерильную повязку.

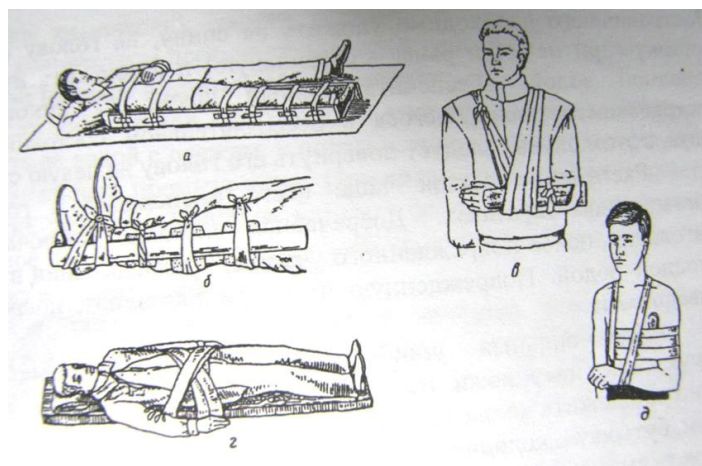


Рисунок 5. Наложение шин и повязок: а – наложение шины при переломе бедра; б – то же при переломе голени; в – то же при переломе руки; г – то же при переломе позвоночника; д - наложение повязки при переломе или вывихе ключицы.

При травме конечностей независимо от того. Произошел перелом или вывих, необходимо обеспечить полную неподвижность травмированной руки или ноги. Нельзя пытаться самостоятельно вправить вывих. Первая помощь в данном случае заключается в том, чтобы прибинтовать к поврежденной конечности жесткие шины или заменяющие их предметы (доски, палки, куски фанеры) с таким расчетом, чтобы зафиксировать и сделать неподвижными суставы выше и ниже места перелома (рисунок 5).

- Центр шины должен находиться у места перелома. Шинная повязка не должна сдавливать крупные сосуды, нервы и выступы костей. Лучше обернуть шину мягкой тканью и обмотать бинтом. Фиксируют шину бинтом, косынкой, ремнем. При отсутствии

шины следует прибинтовать поврежденную верхнюю конечность к туловищу, а поврежденную нижнюю конечность – к здоровой.

- При переломе и вывихе костей кисти и пальцев рук кисть следует прибинтовать к широкой (шириной в ладонь) шине так, чтобы она начиналась с середины предплечья, а кончилась у конца пальцев. Руку подвесить на косынке или бинте к шее.

При переломе и вывихе ключицы необходимо положить в подмышечную впадину с поврежденной стороны ватно-марлевый валик, прибинтовать к туловищу руку, согнутую в локте под прямым углом, подвесить руку к шее косынкой или бинтом.

- При повреждении позвоночника необходимо осторожно, не поднимая пострадавшего, подсунуть под его спину широкую доску или дверь, снятую с петель, или повернуть пострадавшего лицом вниз и строго следить, чтобы при переворачивании его тело не пригибалось во избежание повреждения спинного мозга. Для предотвращения поворота головы с двух ее сторон располагают тугие валики.

- При переломе бедра шины накладывают с двух боковых сторон переломленной конечности. Длину шин выбирают такую, чтобы она обеспечивала фиксацию трех суставов: тазобедренного, коленного и голеностопного. Внешнюю шину ставят от подмышечной впадины до стопы, а внутреннюю – от стопы до паха.

- При переломе ребер необходимо туго забинтовать грудь или стянуть ее полотенцем во время выдоха.

- При падении, ударе возможны переломы черепа (признаки: кровотечение из ушей и рта, бессознательное состояние) или сотрясение мозга (признаки: головная боль, тошнота, рвота, потеря сознания). Пострадавшего необходимо уложить на спину, на голову наложить тугую повязку (при наличии раны - стерильную) и приложить пузырь со льдом, холодной водой, обеспечить полный покой до прибытия врача. У пострадавшего, находящегося в бессознательном состоянии, может быть рвота, в этом случае следует повернуть его голову на левую сторону.

- Растяжение связок чаще всего происходит в голеностопном и лучезапястном суставах. Доврачебная помощь заключается в тугом бинтовании, покое поврежденного участка, прикладывании пузыря со льдом, холодной водой. Поврежденную ногу приподнимают, поврежденную руку подвешивают.

- При сильных ушибах на поврежденном месте появляется припухлость, цвет кожи изменяется (появляется синяк). К месту ушиба нужно приложить «холод» (пузырь или полиэтиленовый пакет со снегом, льдом, бутылку с холодной водой), а затем наложить тугую повязку. Не следует смазывать ушибленное место йодом, растирать и накладывать согревающий компресс, так как это лишь усиливает боль.

ПЕРВАЯ ПОМОЩЬ ПРИ ОЖОГАХ

При несоблюдении мер предосторожности и неосторожном обращении с питательными средами в процессе кипячения возможно появление ожогов кожных покровов.

- лечебные мероприятия состоят в освобождении обожженного места от одежды или обуви и перевязке стерильным материалом;

- при ожоге глаз пострадавшему наложить холодные примочки на глаза, смочив чистую ткань раствором борной кислоты;

- принимать меры к восстановлению сознания, если оно утрачено (искусственное дыхание, вдыхание нашатырного спирта);

- при получении ожогов необходимо срочно вызвать представителя медицинского персонала;

- при ожогах II-IV степеней, сопровождающихся повреждением глубоких тканей, а также при обширных ожогах I степени, вызвать «Скорую помощь» и направить пострадавших в стационар;

- перевозку и перенос пострадавшего осуществлять с большой осторожностью, не допуская тряски.

Библиографический список.

- Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Прокофьев М.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Агропромиздат, 1990.
- Сельскохозяйственная биотехнология /под ред. В.С. Шевелухи. М.: Изд. МСХА, 1995.

- Тамарина Н.А. Основы технической энтомологии. М.: Изд. МГУ, 1990.
- Штерншис М.В., Томилова О.Г., Андреева И.В. Биотехнология в защите растений.- Новосибирск, 2001.
- . Вейзер Я. Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми. (Болезни насекомых). Монография. Перевод с чешского. ЧССР, -М.: «Колос», 1972. 640 с.
- Вирусы растений и насекомых: Труды ЛСХА /Латв. с.-х. акад. Вып.255Елгава: ЛСХА, 1989.- 80с.
- Гулий В.В., Иванов Г.М., Штерншис М.В. Микробиологическая борьба с вредными организмами. - М.: Колос, 1982. 125 с.
- Массовое разведение насекомых. Материалы Всесоюзного совещания. Москва, ВДНХ, январь 1981г. -Кишинев: «Штиинца»,1981. 40 с.
- Пивень В.Б., Штерншис М.В. Состав и биология вредных организмов тепличных культур и их энтомофагов и акарифагов: Лекция /Новосиб. аграр. Ун-т. Новосибирск, 1996.
- Рузимурадов А., Азизов Н. Энтомофаги зоофильных мух Узбекистана. Ташкент: Фан, 1987, с.48.
- Руководство по массовому разведению и применению трихограммы. - М: 1979. 132 с.
- Твердюков А.П., Никонов П.В., Ющенко Н.П. Биологический метод борьбы с вредителями и болезнями в защищенном грунте: Справочник. М.: Колос, 1993.
- Трофимец Л.Н. Биотехнология в картофелеводстве. М., 1989.
- Шмыгля В.А., Петриченко С.А. Основы биологической защиты растений от болезней. Учебное пособие: М.: Изд. МСХА, 1993.
- Штерншис М.В. Повышение эффективности микробиологической борьбы с вредными организмами. Новосибирск, 1995.
- Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология.-М.:Дрофа,2005.
- Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. М.: Издательский центр «Академия», 2005.