Новосибирский государственный аграрный университет

Агрономический институт

Факультет защиты растений

Кафедра биологической защиты

  *Курсовой проект по биотехнологии*

***«Проект биолаборатории и технологическая карта производства пириформина»***

Выполнила:

студентка 532гр

Исаева М. В.

Проверила:

Шпатова Т.В.

 Новосибирск 2010

  ***Реферат.***

 Данный курсовой проект по биотехнологии в защите растений выполнен на 17страницах машинописного текста. Включает в себя 1 таблицу, 2 рисунка. Для написания проекта были использованы 6 источников литературы.

 В работе были использованы следующие ключевые слова - биологическая защита растений, биопестицид, пириформин, технологическая карта, производств, сырье, материалы, приборы, стандартизация, контроль качества, технико-экономический расчет, конечный продукт, биологическая эффективность.

 ***Оглавление стр***

Введение………………………………………………………………………. 4

1. Аналитический обзор литературы…………………………………… 5
2. Технологическая карта производства пириформина………………. 7
	1. Характеристика конечного продукта…………………………….. 7
	2. Технологическая схема производства…………………………….. 8
	3. Сырье и материалы…………………………………………………. 9
	4. Оборудование и приборы…………………………………………... 9
	5. Описание технологического процесса…………………………….. 9
	6. Контроль качества продукта и стандартизация………………….. 11
	7. Техника безопасности………………………………………………. 12
	8. Технико-экономический расчет…………………………………….. 13
3. Проект биолаборатории…………………………………………………. 14

Заключение………………………………………………………………….. 16

Список литературы…………………………………………………………. 17

 ***Введение***

 Хорошо известно, что здоровье человека находится в прямой зависимости от чистоты потребляемой продукции и окружающей среды. Поэтому с каждым годом вводятся все более жесткие ограничения на применение химических пестицидов, повышаются требования к качеству продукции овощеводства. Появилась необходимость широкого применения биологических средств защиты растений. Как известно, биологический метод базируется на использовании биопрепаратов и на выпуске полезных насекомых и клещей – хищников и паразитов.

 Особо остро стоит вопрос о защите растений в закрытом грунте. Биологическая защита тепличных овощей от вредителей базируется в основном на микробиометоде. Широко применяется златогласка обыкновенная, муха-галлица, амблисейулюс, энкарзия, предпринимаются попытки расширить набор энтомофагов и паразитов.

 Опыт показал однако, что ориентация только на макробиометод не всегда дает положительные результаты. При нарушениях, например, теплового режима в хозяйстве или вследствие влияния других биотических и абиотических факторов возникают срывы в разведении и применении насекомых.

 Лучшие результаты дает совместное применение макро- и микробиологических средств борьбы с вредителями. В качестве микробиологических препаратов для закрытого грунта рекомендованы грибные агенты, производство которых налажено только в биолабораториях.

 Одним из биологических препаратов на основе грибных агентов против вредителей закрытого грунта является пириформин. Он применяется против: оранжерейной белокрылки (Trialeurodes vapovariorum Westw), персиковой тли (Myrus persicae S.), бахчевой тли (Aphis gossypii Glow), большой картофельной тли (Macrosiphum euphorbia Tham), обыкновенной картофельной тли (Aulacorahum solani Kalt), капустной тли (Brevicoryne brassicae L.) [1]

 ***1. Аналитический обзор литературы***

 Быстрый рост населения земного шара вызывает необходимость дальнейшего увеличения производства продуктов питания. Интенсификация сельскохозяйственного производства с использованием традиционных методов (селекция пород животных и сортов растений, химизация, мелиорация) в большинстве случаев достигает своего предела. Кроме этого существующие сельскохозяйственные технологии не являются возобновляющими. В течение 20 лет мы потеряли 15% плодородного почвенного слоя, а используемые природные источники энергии также небезграничны. Наконец, большая часть пригодных к возделыванию почв уже вовлечена в сельскохозяйственное производство. Все это привело к возникновению ряда экономических и экологических проблем, связанных с загрязнением окружающей среды, истощением энергетических ресурсов, возрастанием затрат на единицу продукции. Стал необходимым поиск новых подходов, которые в дальнейшем позволили бы повысить урожай и улучшить качество основных сельскохозяйственных культур, но были бы экономичны в производстве и не наносили вреда окружающей среде. Одним из таких подходов является биотехнология.

 Биотехнология на современном этапе пронизывает все сферы человеческой деятельности: медицину, промышленность, сельское хозяйство. Биотехнологические методы все более широко используются в защите растений от вредных организмов. Использование биотехнологии в защите растений открывает новые перспективы в создании новых устойчивых сортов и экологически безопасных средств защиты растений.

 Биотехнология решает три основные проблемы защиты растений:

1. Получение генетически модифицированных сортов растений, устойчивых к вредным организмам (с использованием методов молекулярной генетики).
2. Создание биологических средств защиты растений (с использованием методов микробиологии, биохимии и технической энтомологии).
3. Разработка методов и средств диагностики объектов защиты растений (с использованием методов клеточной и молекулярной биологии).

 Каждая из данных проблем важна и ее решение имеет большое значение для защиты растений. Но с каждым годом вводятся все более жесткие ограничения на применение химических пестицидов. Поэтому создание биологических средств защиты растений очень актуально. [5]

 Биологический препарат для защиты от вредных организмов – это биологическое средство контроля с вредителями, возбудителями болезней растений и сорняками, активным ингредиентом которого являются агенты биологической природы. Так, основой биопрепаратов против вредителей являются возбудители болезней насекомых, клещей, нематод или грызунов, против болезней растений – антагонисты или гиперпаразиты возбудителей болезней, против сорняков – фитопатогенные высокоспецифические микроорганизмы. [3]

 В данном курсовом проекте рассмотрено получение биопрепарата – пириформин. Этот энтомопатогенный препарат производится на основе гриба Entomophthora pyriformes против вредителей закрытого грунта. Состав основных и факультативных вредителей овощей закрытого грунта варьирует от зоны и набора культур. [1]

 Вредители чувствительные к пириформину:

 Оранжерейная белокрылка – повреждает томаты, сою, арбузы, дыню. Петрушку, иногда вредит огурцу. В Новосибирской области последнюю вспышку численности белокрылки наблюдали в 1983 году.

 Персиковая тля – многоядный вредитель, питается на растениях томатов, перца, петрушки, салата, горчицы и даже злаковых. Вспышки высокой численности наблюдаются повсеместно. Особенно вредоносны в весеннее-летний период.

 Бахчевая тля – особенно охотно заселяют растения огурцов, может питаться также на кабачках, баклажанах, дынях, арбузах.

 Большая картофельная тля – повреждает томаты, огурцы. Это факультативный вредитель теплиц. Является также переносчиком вирусных заболеваний пасленовых.

 Обыкновенная картофельная тля – питается на томатах, встречается на огурце, салате. Является факультативным вредителем тепличных растений.

 Капустная тля – вредит рассаде капусты, горчице листовой, салату, редису, редьке майской. Из-за обильных сахаристых выделений заметно ухудшает товарный вид продукции.

 Зараженные энтомофторозом особи тлей приобретают красновато-коричневый оттенок, теряют подвижность, не питаются. Через 7-10 дней с момента заражения гибнут и мумифицируются. Мумии прикреплены к субстрату ризоидами (выростами гриба с брюшной стороны тела насекомого). На теле прорастают конидиеносцы с конидиями, которые активно отстреливаются и образуют на субстрате вокруг тли мучнисто-белый ореол. Внутри тела тли одновременно с ростом конидиеносцев образуются покоящиеся споры.

 Препарат эффективен в борьбе с активными стадиями сосущих насекомых, а также против нимф оранжерейной белокрылки. Не обладает овицидным действием, поэтому сроки повторных обработок определяются временем отрождения из яиц нового поколения вредителей. Длительность действия пириформина 10 суток (при отсутствий капельного полива и некорневых подкормок) [1].

 Препарат не обладает фитотоксичностью и не вызывает ожогов растений. Не отмечено аллергических воздействий пириформина на человека. При массовых размножениях вредителя допустимо повторять истребительные мероприятия до 5 раз. На протяжении одной вегетации не вызывает привыкания вредителей к препарату. Также не наблюдалось существенного влияния пириформина на златоглазку обыкновенную, сирфид, галлицу при выпуске энтомофагов и паразитов на 2-3 сутки после обработки растений.

 **2. Технологическая карта производства пириформина.**

* 1. **Характеристика конечного продукта.**

 Пириформин – биопрепарат на основе гриба Conidiobolus thromboides (= Entomophthora pyriformes). Разработан в жидкой и сухой формах. Основное действующее начало – конидии и покоящиеся споры гриба.

 Штамм E. Pyriformes-78-2 выделен в 1978 году из гороховой тли. В природе является также патогенном картофельных, злаковых, бобовой, яблонной и других видов тлей.

 Конидии имеют светло-коричневую окраску, грушевидную форму с сосочками. При поверхностном культивировании гриб образует колонии светлого цвета с морщинистой поверхностью правильной формой. На поверхности колонии образуется белый налет конидиального спороношения.

 Глубинная культура гриба образует в основном мицелиальные ростки, которые на 5 – 7-е сутки распадаются и образуют покоящиеся споры. Присутствие конидий в жидкой среде невелико – не более 10% спор. Обязательное условие хорошего роста – активная аэрация. Освещенность не влияет на рост и спорообразование гриба. Оптимальная температура от 220С до 280С. [1]

 **2.2.Технологическая схема производства пириформина**

Процесс производства пириформина включает в себя стадии:

* Коллекционно – поддерживающий пересев маточной культуры.
* Получение инокулюма
* Культивация
* Высушивание, фасовка, упаковка
* Стандартизация и контроль качества

 **2.3.Сырье и материалы**

Для приготовления питательной среды – соевая мука, глюкоза. Для поддержания маточной культуры – сусло пивное неохмеленное, агар микробиологический, дисцилированная вода. Материалы для производства пириформина: пробирки, марля, вата, бумага фильтровальная; для культивации качалка кругового вращения, колбы 1-3 литра или стеклянные емкости [1,5]

 **2.4.Оборудование и приборы**

1. Термошкаф

2. Бактерицидные лампы

3. Холодильник

4. Качалка возвратно-поступательного движения

5. Мельница

6. Автоклав

7. Спиртовка

8. Иглы микробиологические

9. Спиртовка

10. Чашки Петри, колбы конические различной емкости

  **2.5.Описание технологического процесса.**

 *Коллекционно – поддерживающий пересев и маточная культура*.

 Поддерживающие пересевы необходимы для содержания гриба в жизнеспособном состоянии. Культуру хранят в пробирках на косяках сусло-агара. [1:3]

 *Приготовление питательной среды суслоагар.*

 Пивное сусло разбавляют дистиллированной водой до концентрации сахара 5-7%. К разбавленному суслу прибавляют 1,5-2% агар-агара и, перемешивая, нагревают на медленном огне до его расплавления. Готовую среду фильтруют и разливают в пробирки.

 Пробирки с суслом стерилизуют при 0,5 атм 30 минут, после застывания среды гриб пересевают иглой стерильно в пламени спиртовки. При этом иглой с загнутым концом, с помощью которой кусочек среды с культурой переносится в новую пробирку. Гриб растят 5 суток при температуре 26±30С, после чего пробирки закрывают полунепроницаемым материалом (целлофаном, калькой, фильтровальной бумагой), завязывают и хранят в холодильнике при 5…100С до 6 месяцев.

 Для работы следует применять культуру выращенную в чашках Петри. Для этого чашки Петри стерилизуют при 1 атм в течение часа, заполняют стерильной средой сусло-агара [1:3]. После застывания на поверхность среды, в центр чашки стерильно в пламени спиртовки иглой наносят кусочек культуры. Гриб растят пять суток при 26±30С, культуру в чашках хранят в холодильнике до 2 месяцев. Для предотвращения высыхания среды чашки рекомендуется завернуть в плотную бумагу.

 *Получение инокулята.*

 Для инокулята пригодна среда, обедненная углеводами: 1%соевой муки, 2%глюкозы. Колбы объемом 0,5-1,0 литра стерилизуют при 1 атм в течение 0,5 часа, заполняют средой на 1/5 часть, закрывают ватно-марлевыми пробками и снова стерилизуют при 0,5 атм 30 минут. В стерильную среду, когда она остынет, вносят кусочек культуры из чашки Петри возле пламени спиртовки. Культуру растят на качалке (скорость 150-240 об/мин) при температуре 26±30С. За это время в среде образуются мицелиальные клубки, которые затее распадаются на короткие гифальные тела. Готовый инокулят содержит до 105 гиф/мл среды.

 Потребность инокулята для засева культуры – 5% от объема инокулируемой среды, стартовый титр при этом составляет от 103 до 5х103 гиф/мл.

 *Культивация*

 Культивация проводится в ферментере. При его отсутствии несложно изготовить заменитель из стеклянной бутыли объемом 10 литров и более. Для хорошей аэрации по размеру горловины емкости изготавливается резиновая пробка, с тремя отверстиями. Одно отверстие (Ø20-30мм) необходимое для инокуляции, два других Ø 10-15 мм – для подачи и отсоса или кислорода. Посевное отверстие закрывается резиновой пробкой, к воздуходувным подводятся гибкие шланги по диаметру. Воздух подается и отсасывается через микробиологические фильтры для предотвращения заноса посторонней микрофлоры.

 Для культивирования готовится среда, состоящая из 1% соевой муки и 5% глюкозы. При использовании заменителей сои или глюкозы необходимо рН среды доводить до 7.

 Выращивание в емкостях на качалке. Емкость стерилизуют при 1 атм в течение часа, заполняют средой на 1/5 часть объема, повторно стерилизуют при 0,5 атм 30 минут. В остывшую среду вносят инокулят в пламени горелки или в факеле. Культуру выращивают пять суток на качалке при 26±30С.

 К концу культивации в среде образуется до 106 покоящихся спор/мл, которые являются основным действующим началом препарата. [1]

 *Высушивание, фасовка, упаковка.*

 Субстрат со зрелой массой гриба высыпают в пластиковые или эмалированные кюветы слоем не более 3 см и проводят сушку при 30…350С, хорошей вентиляции и периодическим перемешиванием. Влажность готового препарата не должна превышать 8%.

 Готовый препарат затаривают в мешки из крафт-бумаги. Каждый мешок маркируют с указанием номера партии, вида субстрата, даты изготовления препарата, титра, срока и условий хранения. Так же необходимо приложить инструкцию по применению пириформина [5]

 **2.6. Контроль качества и стандартизация пириформина**

 Для определения количества жизнеспособных спор в готовом препарате используется два метода: прямой подсчет в камере Горяева и метод высева на твердую питательную среду в чашках Петри.

 *Определение титра в камере Горяева.*

 От каждой партии препарата отбирают 3-5 проб из разных мест по всей глубине и составляют общую пробу массой 70-100 г. Общую пробу тщательно перемешивают, после чего отвешивают навеску 10г с точностью 0,01г и переносят в колбу со 100 мл стерильной воды и стерильным крупнозернистым песком. Колбу закрывают стерильной пробкой и взбалтывают ее содержимое в течение 5 минут. Разведение препарата в приготовленной взвеси составляет 1:10 Параллельно готовят 7-9 пробирок, в каждую из которых добавляют по 9 мл дистиллированной воды, закрывают ватными пробками и стерилизуют. Затем готовят серию последовательных разведений. Для этого из колбы чистой пипеткой берут 1 мл суспензии и переносят в первую пробирку с 9 мл воды, получают разведение 1:100. Суспензию этого разведения тщательно перемешивают с помощью новой (чистой) пипетки, затем берут 1 мл полученного разведения и переносят его во 2 пробирку (разведение в 1000 раз). Для каждого нового разведения необходимо использовать отдельную стерильную пипетку

 Камеру Горяева с хорошо притертым стеклом заполняют суспензией соответствующего разведения. Количество спор подсчитывают в 5 больших квадратах камеры (или в 20-100 малых квадратах), определяют среднее количество клеток в 1 малом квадрате и рассчитывают по формуле

 Х=N×4×106,

Где Х – титр исследуемой суспензии клеток/1 мл

 N – среднее количество клеток в одном малом квадрате

Для определения титра исходного препарата необходимо титр исследуемой суспензии умножить на соответствующее разведение.

 *Определение титра методом посева на питательную среду*

 Готовят серию последовательных разведений как указанно в предыдущем методе. Из трех последних разведений, предварительно тщательно перемешанных, производят посев в чашки Петри на агаризованную среду Чапека или сусло-агар из расчета 1 мл суспензии на чашку. Этот объем распределяют по поверхности среды шпателем. Из одного разведения делают не менее 5 параллельных высевов. Для параллельных высевов из одного разведения можно пользоваться одной стерильной пипеткой и одним шпателем. Засеянные чашки помещают в термостат с температурой 23-250С. Первый учет роста гриба проводят через 4-5 дней после посева, а затем через каждые 2-3 дня отмечают вновь появившиеся колонии антагониста. Титр препарата вычисляют по формуле:

Т=А+К

Где Т – титр препарата, спор/1г

 А – среднее число колоний, выросших при высеве из данного разведения (среднее арифметическое из 5 чаш Петри)

 К – разведение, из которого произведен высев.

При использовании чашечного метода все операции необходимо проводить в стерильном боксе [5].

 **2.7. Техника безопасности**

 При производстве пириформина следует соблюдать общие правила безопасности в микробиологических лабораториях

* При изготовлении суспензий необходимо пользоваться пипеткой с резиновой грушей
* При взятии навески или проб работу необходимо проводить в вытяжном шкафу
* Не допускать попадание живой культуры на кожу рук
* После окончания работы вымыть руки теплой водой с мылом

 Кроме этого к работе допускаются лица прошедшие предварительный медицинский осмотр, инструктаж по технике безопасности и получившие письменное разрешение на право работы с биологическими агентами. Персонал должен быть обеспечен и систематически пользоваться спецодеждой:респиратором типа РУ-60 МА или ШБ-1 «лепесток», резиновыми перчатками, резиновым фартуком.

 Во время обработок запрещено пить, курить, принимать пищу. [1,4,5]

 **2.8. Технико-экономический расчет**

 Таблица 1

 Перечень оборудования и материалов для получения пириформина

|  |  |
| --- | --- |
| Наименование  | Количество, шт |
|  Для производства пириформина |
| Пробирки  | Не менее 50 |
| Вата и марля (для приготовления пробок) | - |
| Спиртовка  | 1 |
| Иглы микробиологические  | - |
| Чашки Петри | Не менее 50 |
| Колбы конические 0,5-1 л | Не менее 50 |
| Термошкаф (для культивирования и сушки препарата) | 2 |
| Бактерицидные лампы (для стерилизации помещения) | 2 |
| Холодильник для хранения культур | 1 |
| Качалка возвратно-поступательного движения (для роста инокулята)  | 1 |
| Фильтрующий материал (полотно или бумажные фильтры) | - |
| Мельница  | 1 |
| Автоклав  | 1 |
|  Для культивации |
| Качалка кругового вращения | 1 |
| Колбы 1-3 л или стеклянные емкости  | Исходя из разрешающей способности качалки |

 Нормы расхода ректификованного для стерилизации бокса и оборудования.

1. Обработка рук и инструментов – 10мл на 1 раз
2. Горение спиртовки 1ч – 130мл
3. Разовая обработка бокса и емкости – 50м

  **3. Проект биолаборатории**

 Для производства пириформина необходима биолаборатория. Производственная биолаборатория – специфическое и сложное хозяйство, в составе которого имеются здания или помещения, различное оборудование.

1. Рабочая комната – холодильник для хранения культур
2. Автоклавная – в данном помещении располагается автоклав для стерилизации среды.
	1. Бокс с предбоксником – качалка кругового вращения.

5. Термостатная. Термостат для культивации гриба.

6. Комната для сушки биомассы – в данной комнате расположен термошкаф.

7. Моечная – мойка со столом.

8. Комната для размола биомассы – мельница для размола.

9. Комната для контроля качества.

10. Склад для хранения препарата.

 **Заключение**

 Биологические препараты играют ключевую роль в биологической защите от вредителей, болезней. Их использование относится и к оперативным и к фундаментальным способам воздействия на вредные организмы в агроэкосистемах. Как правило, применение биопрепаратов запускает механизмы экологически безопасной защиты растений. Воздействуя только на целевые мишени, биопрепараты обеспечивают активное участие других естественных регуляторов численности в подавлении фитофагов, фитопатогенов или сорных растений. Поэтому актуальной становится тема разработки новых биологических препаратов [5].

 В данном курсовом проекте был разработан проект биолаборатории и технологическая карта производства биологического инсектицида – пириформина. Был произведен аналитический обзор литературы по данной теме, описана технологическая схема производства пириформина, был произведен технико-экономический расчет, а также были приведены сырье, материалы, оборудование и приборы для производства биопрепарата.

 **Список литературы**

1. Производство и применение пириформина в защите овощей закрытого грунта от вредителей: Рекомендации/ВАСХНИЛ Сиб. отд-ние

 НПО «Земледелие» - Новосибирск, 1989.-24с

1. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации 2009 г. Справочное издание, 320с.
2. Штерншис М.В., Джамилов Ф.С., Андреева И.В., Томилова О.Г./Биопрепараты в защите растений: Учебное пособие/Мин-во сельского хозяйства Р.Ф. Новосиб. Гос. Агроуниверситет – Новосибирск, 2000. – 128с.
3. Штерншис М.В. биотехнология в защите растений: учебное пособие/ Мин-во сельского хозяйства Р.Ф. Новосиб. Гос. Агроуниверситет – Новосибирск, 2001. – 156с.
4. Штерншис М.В. биотехнология в защите растений: учебное пособие/- 2-е изд., перераб и доп./Новосиб. Гос. Агроуниверситет – Новосибирск, 2006. – 2000с.
5. Штерншис М.В. регуляция численности вредителей с/х культур с помощью энтомопатогенов: Лекция/ Новосиб. Гос. Аграр. Ун-т. – Новосибирск, 1991г. – 60с.
6. Сельскохозяйственная энтомология/А.А. Мигулин, Г.Е. Осмоловский, Б.М. Лтвинов и др.; Под ред. А.А. Мигулина. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1983 – 416с., ил. – (Учебники и учебные пособия для высш. с-х. учеб. заведений)
7. Монастырский О.А. Биологизация защиты растений: отставание России становится все более очевидным//Защита и карантин растений, №11, 2004г – с.20-21