

МИКРОБНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 606:632.937.1.05

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ МИКРОБНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ГРИБА–АНТАГОНИСТА *TRICHODERMA SP. IZR D–11* БИМ F–457 Д

Д.В. ВОЙТКА, Е.К. ЮЗЕФОВИЧ

РУП “Институт защиты растений”

д. Прилуки, Республика Беларусь, biocontrol@tut.by

Успех использования микробиологического метода защиты растений зависит не только от подбора высокоэффективных штаммов, но и в равной мере от возможности получения препаратов на их основе.

При производстве жидкой формы биопрепарата на основе грибов–антагонистов рода *Trichoderma* является важным не только получение биомассы, но и обеспечение в ней достаточного количества жизнеспособных конидий гриба. Высокие показатели конидиогенеза наряду с видовыми и штаммовыми различиями грибов *Trichoderma* spp. определяются оптимальным подбором питательных сред и условий культивирования [Шарова 1983]. Это обусловлено сильно выраженной гетерогенностью морфологических, физиолого–экологических признаков *Trichoderma* spp. и степенью усвояемости экзогенных источников питания, необходимых для прохождения онтогенетических этапов развития [Гринько, 2006; Войтка, Юзефович, 2013].

Морфологические и культуральные признаки штамма *Trichoderma* sp. IZR D–11 БИМ F–457 Д D–11 – основы биологического препарата Фунгилекс – изучали на следующих питательных средах: сусло–агар, картофельно–декстрозный агар (КДА), Сабуро, Чапека.

В результате проведенных исследований установлено, что штамм *Trichoderma* sp. IZR D–11 БИМ F–457 Д обладает высокой скоростью роста, быстро осваивает питательный субстрат. В зависимости от выбранной питательной среды изменяются культуральные и морфологические свойства штамма и динамика роста. При оптимальных условиях (рН=5,5–6,6; температура 24–25°C) видимый рост колоний на всех средах наблюдали в 1–е сутки после посева. На питательных средах сусло–агар и Чапека колонии антагониста имели типичную интенсивно–зеленую окраску, правильную округлую форму, край колонии – четкий, профиль – выпуклый, цвет – интенсивно–зеленый, обратная сторона колонии – светло–желтая, поверхность колонии – с выраженной концентрической зональностью. На средах КДА и Сабуро отмечено наличие желто–зеленой пигментации субстрата.

Состав питательной среды оказал влияние на формирование текстуры колонии: войлочная – на сусло–агаре и КДА, бархатистая – на среде Чапека, шерстистая – на среде Сабуро. На всех изученных питательных средах для штамма характерен типичный грибной запах.

На питательной среде сусло–агар колонии штамма характеризовались обильным спороношением, начало спороношения отмечено на 3–и сутки, в то время, как на среде Чапека спороношение было умеренным (начало спороношения – на 4–е сутки), а на средах КДА и Сабуро – слабым (начало спороношения на 5–е сутки).

Оценка ростового коэффициента гриба *Trichoderma* sp. IZR D–11 БИМ F–457 Д на питательных средах различного состава в динамике (экспозиция – 16, 19, 22, 25 часа) показала, что данный показатель варьировал от 47,4 на среде Сабуро до 67,5 на КДА (таблица).

Таблица – Рост и продуктивность штамма *Trichoderma* sp. IZR D–11 БИМ F–457 Д на различных питательных средах

Питательная среда	Диаметр колонии в динамике, см				K _r , мм/ч	PK	Титр на 5–е сутки, 1×10 ⁸ спор/см ²
	16 часов	19 часов	22 часа	25 часов			
КДА	50,42±2,12	56,57±3,19	64,00±2,61	70,57±2,19	1,11	67,5	1,5
Сусло–агар	45,57±2,25	53,42±1,98	59,28±1,38	65,71±1,27	1,21	63,5	9,0
Сабуро	39,00±2,06	44,28±2,54	51,28±2,54	57,00±2,44	1,0	47,4	0,5
Чапека	40,71±1,90	47,00±2,50	51,57±2,49	56,42±3,15	0,87	55,0	8,4
<i>HSP</i> _{0,5}							1,71

Примечание – K_r – средняя скорость радиального роста колонии; PK – ростовой коэффициент

Большое значение для роста грибов имеет температура. Температурный оптимум определяется видовыми свойствами грибов и условиями культивирования. Для оценки влияния температуры на динамику роста штамм выращивали на среде сусло–агар и оценивали ростовые параметры при следующих температурах: 7°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C.

Установлено, что гриб *Trichoderma* sp. IZR D–11 БИМ F–457 Д способен расти в пределах температур от 10 до 30°C. Оптимальной температурой для культивирования штамма является 25°C. Высокий ростовой коэффициент и линейная скорость роста в первые сутки свидетельствуют о более короткой продолжительности лаг–фазы, и, как следствие, начало спороношения и накопление биомассы происходит быстрее. При температуре 7°C и 35°C рост мицелия и спороношение гриба не наблюдали.

Питательные вещества усваиваются микроорганизмами только при определенной кислотности питательной среды, так как проницаемость оболочки микробных клеток зависит от этого фактора. Большинство грибов развивается при pH 4,5–6,0. Культивирование штамма *Trichoderma* sp. IZR D–11 БИМ F–457 Д в широком диапазоне значений реакции среды показало, что оптимальное развитие гриба наблюдается при pH 4,5–6,0. Ростовые процессы снижались по мере повышения pH от 6,5 до 8,0. При pH 7,0 по сравнению с оптимумом ростовой коэффициент и продуктивность снижались в 2 раза.

Оценку влияния источников углерода и азота на рост и продуктивность гриба *Trichoderma* sp. IZR D–11 БИМ F–457 Д проводили в условиях жидкофазного глубинного культивирования на жидкой среде, соответствующей по составу среде Чапека (без агара), анализируя количество биомассы в динамике.

Исследования позволили установить, что оптимальным источником углерода для роста штамма является меласса – количество биомассы достигало 22 г/л, титр – 1,2×10⁹ спор/мл. Отмечено, что добавление 2% глицерина в среду, содержащую мелассу, стимулировало спороношение. Титр спор по окончании процесса ферментации составил 1,6×10⁹ спор/мл, биомасса – 26,7 г/л, на среде с глюкозой – 1,5×10⁸ спор/мл и 8 г/л соответственно.

Из источников азота более интенсивно штамм *Trichoderma* sp. IZR D–11 БИМ F–457 Д ассимилировал аммонийную, чем нитратную форму. Биомасса в варианте с сернокислым аммонием составила 36 г/л, на среде с нитратом аммония – 8,7 г/л, титр – 1,5×10⁸ и 1,2×10⁹ спор/мл соответственно. При добавлении в среду дрожжевого экстракта количество биомассы увеличивалось до 58 г/л, титр достигал 1,1×10⁹ спор/мл.

Выводы. Штамм *Trichoderma* sp. IZR D–11 БИМ F–457 Д способен расти в пределах температур от 10 до 30°C. Оптимальной температурой для культивирования штамма является 25°C. Твердофазное культивирование штамма необходимо вести на агаризованных питательных средах: сусло–агар и Чапека.

При жидкофазном глубинном культивировании в качестве оптимального источника углерода целесообразно использовать мелассу, а также дополнительно добавлять глицерин; из источников азота оптимальными являются аммонийная форма азота, дрожжевой экстракт и пептон.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шарова М.Б. Морфолого–цитологическое изучение гриба *Trichoderma* Fr. в связи с производством препарата «триходермин»: Автореф. дис... канд. биол. наук. : 03.00.05. М.: МГУ, 1983. С. 15.

2. Войтка Д.В., Юзефович Е.К. Гетерогенность морфологических признаков новых изолятов микромицетов рода *Trichoderma* Pers.:Fr. // Защита растений: сб. науч. Тр. РУП Институт защиты растений. 2013. Т. 37. С. 259–269.

3. Гринько Н.Н. Экофизиологические особенности штамма *Trichoderma harzianum* Rifai ВКМ F–2477Д // Защита растений: сб. науч. тр. РУП «Институт защиты растений. 2006. Вып. 30, ч. 2. – С. 90–103.