

УДК 57.083.13

Д. Д. Зиганшин, А. С. Сироткин

ОСОБЕННОСТИ ГЛУБИННОГО И ПОВЕРХНОСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБОВ *TRICHODERMA* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ КЛЕТОК ГРИБА

Ключевые слова: *Trichoderma*, культивирование, биопрепарат.

На основе литературных данных охарактеризованы особенности глубинного и поверхностного культивирования грибов рода *Trichoderma* с целью получения биопрепаратов для растениеводства. Обсуждена необходимость учета видо- и штаммоспецифичности культур р. *Trichoderma* для их эффективного культивирования на питательных средах разного состава в различных физико-химических условиях среды.

Keywords: *Trichoderma*, cultivation, biological product.

Based on the literature data the features of submerged and surface cultivation of *Trichoderma* fungi with the purpose of obtaining biologics for plant growing are characterized. The necessity to take into account the species and strain specificity of the *Trichoderma* spp. for their effective cultivation on nutrient media of different composition in different physicochemical conditions of the medium was discussed.

Введение

Грибы рода *Trichoderma* - это широкая группа микроорганизмов, играющая важную роль в природе. Представители рода были найдены во всех климатических зонах. Наиболее часто они встречаются в почве и на мертвой древесине [1].

Грибы рода *Trichoderma* обладают целлюлозолитической и хитинолитической активностью, поэтому их часто используют для получения ферментов, разрушающих целлюлозу, лигнин, хитин и пектин [2]. Также их часто используют при производстве кормового белка и некоторых биологически активных веществ, в том числе антибиотиков и токсинов [3,4].

Способность разрушать хлорорганические вещества и различные пестициды, гербициды и инсектициды, а также полиэтилен и некоторые пластмассы открывают возможность для использования в процессах биологической очистки загрязненных почв и в переработке отходов [5].

Антагонистическая активность грибов рода *Trichoderma* по отношению ко многим фитопатогенам, обуславливает их применение в качестве биофунгицидов [6,7]. Также была отмечена рострегулирующая активность, способствующая интенсификации поглощения растением микро- и макроэлементов, стимулирование развития на корнях азотфиксирующих бактерий, что позитивно влияет на рост многих культурных растений [8].

Все вышесказанное свидетельствует о большой ценности грибов рода *Trichoderma* как объекта исследования биотехнологии.

В связи с этим, целью настоящей статьи было обобщение информации об особенностях глубинного и поверхностного культивирования грибов рода *Trichoderma* с целью получения биопрепарата на основе клеток гриба.

1 Глубинное культивирование

1.1 Источники углерода

Одним из основных элементов, влияющих на рост и развитие не только грибов, но и всех живых существ является, безусловно, углерод.

Исследователями по всему миру было проведено множество экспериментов по определению влияния различных источников углерода на рост грибов рода *Trichoderma*.

При их изучении как продуцентов целлюлолитических ферментов было выявлено, что скорость роста и развития при использовании в качестве источника углерода глюкозы, фруктозы, сахарозы и крахмала была одинаково высокой и стабильной. Значительное снижение роста наблюдалось при использовании лактозы, карбоксиметилцеллюлозы, целлюлозы [9].

Согласно другим исследованиям [10], в вопросе выбора источника углерода имеет место видо- и штаммоспецифичность. Среди веществ, которые усваиваются на порядок хуже глюкозы как эталона, всеми или большинством изученными в статье видами, можно назвать: L- и D- арабиноза, мальтоза, лактоза, D-мелзитоза, этанол, инозитол, D-глюкозоамин, растворимый крахмал, инулин, салицин. В качестве источников углерода, которые для большинства изученных видов показывают аналогичную или лучшую усвояемость в сравнении с глюкозой, следует отметить D-фруктозу, D-маннозу, D-галактозу, D-ксилозу, декстрин. Замечено, что в то время, как сахароза и глицерин некоторыми видами усваивались лучше, чем глюкоза, другие виды на них практически не росли.

1.2 Источники азота

Важным элементом питания является азот. Некоторые авторы утверждают [10], что для роста *Trichoderma* на буферизованных средах с pH 4,2-4,3 в качестве источника азота подходят L-аланин, L-аспарагиновая кислота, L-глутаминовая кислота. В то же время D-аспаргиновая кислота, L-гистидин и β-аланин являлись бедными источниками азота. Нитрит натрия оказывал токсическое действие на культуру, о чем свидетельствовало отсутствие роста на соответствующих средах. Отмечен лучший рост микромицетов на средах, содержащих ионы аммония, чем на средах, содержащих нитраты. Считается [10], что в качестве неорганического

источника азота предпочтительней применять нитрат аммония (аммиачную селитру).

Согласно данным других авторов [11], при сравнении в качестве источника азота нитрата калия, нитрата натрия и сульфата аммония, наибольший выход биомассы был получен при использовании сульфата аммония (25,6 г/л), а наименьший - при использовании нитрата натрия (22,2 г/л).

1.3 Физико-химические факторы среды

Одним из важных факторов, определяющих нормальный рост триходермы и ее биосинтетические возможности, является реакция среды. При ее изменении в область неблагоприятных значений организм перестает расти даже в тех случаях, если все остальные условия являются оптимальными. При исследовании оптимальной кислотности среды было установлено [12], что, в зависимости от вида, максимальный рост грибов наблюдается при pH в пределах от 3,7 до 4,7.

Изменение pH среды влияет на накопление конечных продуктов обмена веществ триходермы в культуральной жидкости.

Немаловажным фактором, оказывающим воздействие на рост культуры, является температура культивирования. Согласно [12] для различных видов р. *Trichoderma* оптимальная температура роста отличается и лежит в пределах от 22 до 34 °С.

Грибы рода *Trichoderma* являются аэробами, поэтому для них особенно важен режим аэрации. Так, при культивировании в колбах Эрленмейера необходимо, чтобы объем питательной среды не превышал 20% от объема колбы. Оптимальная скорость перемешивания составляет 150 об/мин [13].

1.4 Спорообразование

Выше были рассмотрены условия для накопления максимальной биомассы в ходе культивирования. Однако, для получения культуральной жидкости, которую можно было бы использовать в качестве биопрепарата-пестицида, после максимального накопления биомассы грибом необходимо индуцировать процесс образования конидий и/или хламидоспор, совмещенный с автолизом мицелия, и добиваться максимального конидиеобразования [14].

Есть несколько факторов, способствующих индукции процесса спорообразования у грибов рода *Trichoderma*:

- минеральные элементы питания. Выявлено, что ионы Ca^{2+} способствуют активации процесса спорообразования у *Trichoderma viride* [15];

- освещение. Доказано [16], что освещение способствует активному конидиеобразованию у грибов рода *Trichoderma*. При этом оптимальным является освещение синего цвета и область ближнего ультрафиолета. Согласно некоторым исследованиям [17], большое значение имеет также режим освещения. При чередовании световой и

темновой фазы культивирования каждые 12 часов наблюдается самое интенсивное конидиеобразование. Кроме того, проводились исследования, показавшие, что эффективным может быть кратковременное отключение подачи воздуха в ферментер с одновременным отключением света [18];

- соотношение углерода и азота в составе питательной среды. Так, была выявлена зависимость между конидиеобразованием и соотношением C:N [19, 20]. Для сахарозы в концентрации 6 г/л максимальное конидиеобразование наблюдалось при соотношении 160:1. Показано, что более высокие концентрации источника углерода, а также меньшая разница в соотношении C:N для *Trichoderma viride* увеличивает выход мицелия, а не конидий [21]. Это наблюдение подтверждают результаты исследований [22,23] о том, что внезапное исчезновение в среде азота стимулирует конидиеобразование у *T. atroviride*.

Методом глубинного культивирования получают, в частности, следующие биопрепараты р. *Trichoderma*:

- Лигнорин, разработанный на основе почвенной культуры *Trichoderma harzianum* S-4. Препарат подвергается лиофильной сушке и выпускается в виде сухого порошка с титром конидий не менее 5×10^9 КОЕ/г [24];

- Оргамика Ф - биофунгицид, защищающий растения от грибных и бактериальных заболеваний. В основе – конидии природного штамма *Trichoderma asperellum* OPF-19, обладающего широким спектром антагонистической активности. Наиболее выраженное действие отмечено на фитопатогенных грибах (корневые гнили, снежная плесень, мучнистая роса и др.). Препарат представляет собой жидкую суспензию конидий гриба в культуральной жидкости, содержащей остатки питательной среды и продукты метаболизма штамма *T. asperellum* OPF-19 с титром конидий не менее 10^8 КОЕ/мл [25].

После анализа и обобщения данных по глубинному культивированию грибов рода *Trichoderma* с целью получения биопрепарата на основе клеток гриба можно отметить следующие характеристики процесса:

- продолжительность культивирования составляет от 4 до 7 сут [10,13];

- выход биомассы в зависимости от питательной среды и используемого вида может составлять от 3 до 48 г/л [10, 26];

- максимальный титр конидий находится в пределах 1×10^8 - 7×10^9 КОЕ/мл [27].

2 Поверхностное культивирование

Помимо глубинного культивирования для получения биопрепаратов на основе грибов рода *Trichoderma* применяют поверхностный метод культивирования. При культивировании поверхностным способом грибы выращивают на поверхности плотной, сыпучей среды или в тонком слое жидкой среды, при этом микроорганизмы получают кислород непосредственно из газовой

воздушной фазы. При подборе питательной среды для поверхностного твердофазного культивирования стараются использовать комплексные натуральные питательные среды, имеющие в своем составе как источник углерода, так и источник азота.

В исследованиях, проведенных российскими учеными, в качестве источника питания, чаще всего, используются отходы лесоперерабатывающей и сельскохозяйственной промышленности. Так, авторами были показаны возможность использования в качестве субстрата для поверхностного культивирования коры и древесной зелени пихты [28], коры лиственницы [29], вегетативной части топинамбура [30].

Зарубежными исследователями в качестве субстрата применяются кукурузные и пшеничные отруби [31], отходы переработки манго [32] и агавы [33].

При поверхностном твердофазном культивировании преимущественно используются *Trichoderma asperellum*, *T. viride*, *T.harzianum*, *T. koningii*, что связано с тем, что изоляты именно этих видов чаще всего встречаются в гниющей древесине и ризосфере деревьев [34].

Следует отметить следующие особенности поверхностного культивирования грибов рода *Trichoderma*:

1. Титр конидий в среднем на порядок выше при поверхностном культивировании в сравнении с глубинным. Однако, время культивирования увеличивается в 2-3 раза. Увеличение продолжительности ферментации объясняется особенностями массопереноса при твердофазном культивировании, который значительно более затруднен в этом случае, чем при жидкофазном.

2. При твердофазном культивировании особую роль начинает играть достаточная влажность субстрата. Так, в работе [31] показано, что изменение влажности на 5-10% от оптимальной является причиной уменьшения титра конидий в 5-10 раз.

Основными характеристиками поверхностного культивирования грибов рода *Trichoderma* с целью получения биопрепарата на основе клеток гриба являются следующие:

- максимальный титр конидий находится в пределах 1×10^8 - 1×10^{10} КОЕ/г [10, 31];

- продолжительность культивирования варьируется в зависимости от вида продуцента и составляет от 7 до 15 суток [31, 32, 35].

Примерами биопрепаратов, полученных методом поверхностного культивирования, являются, в частности:

- Стернифаг - биологический фунгицид на основе гриба *Trichoderma harzianum*, разработанный с целью ускорения разложения стерни и соломы злаковых, растительных остатков сои, сорго, кукурузы, подсолнечника и подавления фитопатогенов на растительных остатках и в почве.

Данный препарат имеет титр конидий 10^{10} КОЕ/г [6];

- Триходермин, действующим веществом которого являются споры и мицелий гриба-антагониста *Trichoderma lignorum* Т 13-82, культивируемый на сыпучем зерновом субстрате, а также продуцируемые культурой гриба в процессе производственного культивирования биологически активные вещества. Данный препарат имеет титр конидий 6×10^9 КОЕ/мл [24];

- Глиокладин - грибная культура *Trichoderma harzianum* ВИЗР-18, используемая в качестве лечебного и профилактического средства при внесении в почву, эффективно подавляет возбудителей грибных заболеваний на всех видах садовых культур и комнатных растениях [6].

Заключение

На основании вышесказанного можно сделать следующие выводы:

1. Грибы рода *Trichoderma* являются ценным объектом биотехнологий благодаря широкой гамме возможных применений, в частности, на их основе перспективным является получение многоцелевых биопрепаратов для растениеводства.

2. Из-за высокой видо- и штаммоспецифичности грибов рода *Trichoderma* выбор культуры, корректировка и оптимизация состава питательных сред, а также физико-химических условий среды является ключевыми аспектами исследований для дальнейшего эффективного использования в составе биопрепаратов.

Литература

1. Druzhinina I.S., Kopchinsky A.G., Kubicek C.P. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data // *Mycoscience*. - 2006. - Vol.47 (2). - pp.55-64.
2. Archer, D. B. & Peberdy, J. F. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi // *Crit Rev Biotechnol*. - 1997. - Vol.17. - pp.273-306.
3. Samuels G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. // *Mycol. Res*. - 1996. - Vol.100 (8). - pp.923-935.
4. Ghisalberti, E.L. and Sivasithamparam, K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. // *Soil Biol Biochem*. - 1991. - Vol.23. - pp.1011-1020.
5. Esposito, E., & da Silva, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma* // *Critical Reviews on Microbiology*. - 1998. - Vol.24. - pp.89-98.
6. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации // Москва: Министерство сельского хозяйства РФ, 2017.
7. Д.Д. Зиганшин, М.А. Лукьянцев, А.А. Егоршина, А.С. Сироткин Оценка способности консорциума микроорганизмов к утилизации стерни. / Вестник Казанского технологического университета. 2016, т.19, в.16, с.103-107.
8. Molla A.H., Haque Md. M., Haque Md. A., Ilias G. N. M. Effect of nitrogen fertilizers and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii*. // *Agronomie*. - 2004. - Vol.24. - pp.281-288.

9. Serrano V. Cellulase production by *Trichoderma reesei* // *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1983. – Vol. 18. – pp. 29-37.
10. Danielson R. M. and Davey C. B. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma* // *Soil Biol. Biochem.* – 1973. – Vol. 5, pp. 505-515.
11. Mehta J., and etc. Impact of Carbon & Nitrogen Sources on the *Trichoderma viride* (Biofungicide) and *Beauveria bassiana* (entomopathogenic fungi) // *European Journal of Experimental Biology.* - 2012. - Vol.2 (6). – pp.2061-2067.
12. Danielson R. M. and Davey C. B. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture // *Soil Biology and Biochemistry.* -1973. – Vol. 5(5). – pp. 495-504.
13. Singh A. and etc. Optimal Physical Parameters for Growth of *Trichoderma* Species at Varying pH, Temperature and Agitation // *Virology and Mycology. Volume 3, 2014.*
14. Влияние различных источников углерода на конидиеобразование микромицета *Trichoderma asperellum* OPF-19 в условиях глубинного культивирования. / Зиганшин Д.Д., и др. // *Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 20-22 февраля 2017 г. (2017), 2, 115-117.*
15. Krystofová S., Varecka L. and Betina V. The 45Ca 2+ Uptake by *Trichoderma viride* Mycelium. Correlation with Growth and Conidiation // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1995. – Vol.14. – pp.323-337.
16. Schmoll M., Esquivel-Naranjo E. U., and Herrera-Estrellab A. *Trichoderma* in the light of day – Physiology and development // *Fungal Genet Biol.* – 2010. – Vol.47(11-2). – pp.909-916.
17. Steyaert J. M. and etc. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma* // *Microbiology.* – 2010. – Vol.156. – pp.2887-2900.
18. Gressel J., Bar-leve S., & Galun E.. Blue light-induced response in absence of free oxygen // *Plant and Cell Physiology.* – 1975. – Vol.16. – pp.367- 370.
19. Aube, C. & Gagnon, C. Effect of carbon and nitrogen nutrition on growth and sporulation of *Trichoderma viride* Pers Ex Fries. *Can J Microbiol.* - 1969. – Vol.15. – pp.703-706.
20. Jackson, A. M., Whipps, J. M. & Lynch, J. M. Nutritional studies of four fungi with disease biocontrol potential // *Enzyme Microb Technol.* 1991. – Vol.13. – pp.456-461.
21. Gao, L., Sun, M. H., Liu, X. Z. & Che, Y. S. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi // *Mycol Res.* -2007. – Vol.111. – pp.87-92.
22. Casas-Flores, S. and etc. Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway // *Eukaryot Cell.* - 2006. – Vol.5. – pp.499-506.
23. Steyaert, J. M., Weld, R. J. & Stewart, A. Isolate-specific conidiation in *Trichoderma* in response to different nitrogen sources // *Fungal Biol.* - 2010. – Vol.114. – pp.179-188.
24. Войтка Д.В. Повышение активности биопрепаратов на основе грибов-антагонистов *Trichoderma spp* // *Современная микология в России. Том 2. Тезисы докладов Второго съезда микологов России. Национальная академия микологии, 2008. – 528с.*
25. И.М. Давлетбаев Биологические препараты для растениеводства // XV Международная конференция молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии» (г. Казань, 13-14 апреля 2016 г.). Сборник материалов конференции. – Казань: Издательство «БРИГ», 2016. – 476 с.
26. Harman G. E. and etc. Production of Conidial Biomass of *Trichoderma harzianum* for Biological Control // *Biological control.* – 1991. – Vol.1. – pp.23-28.
27. Lewis J.A., Papavizas G.C. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma spp* in liquid and solid growth media // *Soil Biology and Biochemistry.* – 1983. - Vol.15. - pp.351-357.
28. Проблемы применения растительных отходов для получения биологических препаратов защиты растений Ю.А. Литовка и др. // *Химия растительного сырья.* 2011. №3. С. 167–172
29. Рязанова Т.В., Чупрова Н.А., Лунева Т.А. Воздействие гриба рода *Trichoderma* на лигнин коры хвойных пород / Катализ в промышленности. 2014. № 6. С. 64-70.
30. Пикозина М.А., Чупрова Н.А., Рязанова Т.В. Культивирование грибов рода *Trichoderma* на вегетативной части топинамбура // *Химия растительного сырья.* 2013. №1.
31. Rosane S. Cavalcante and etc. Effect of Moisture on *Trichoderma* Conidia Production on Corn and Wheat Bran by Solid State Fermentation // *Food Bioprocess Technol.* – 2008. – Vol.1. – pp.100-104.
32. S. de los Santos-Villalobos Production of *Trichoderma asperellum* T8a spores by a “home-made” solid-state fermentation of mango industrial wastes // *BioResources.* - 2012. - №7(4).
33. Naivy Y. Nava-Cruz Agave atrovirens fibers as substrate and support for solid-state fermentation for cellulase production by *Trichoderma asperellum* // *Biotech.* -2016. – pp.6-115.
34. Садыкова В. С. Грибы рода *Trichoderma* Средней Сибири: видовой состав и использование в биотехнологии / В. С. Садыкова, А. В. Кураков, А. Н. Лихачев // *Биоразнообразие и экология грибов и грибоподобных организмов Северной Евразии: материалы Всероссийской конференции с международным участием, Екатеринбург, 20-24 апреля 2015 г. — Екатеринбург : Издательство Уральского университета, 2015 — С. 217-219.*
35. Бондарь П.Н. Штаммы грибов рода *Trichoderma* Pers (Fr.) как основа для создания препаратов защиты растений и получения кормовых добавок: Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. М., 2011.

© Д. Д. Зиганшин, аспирант, кафедра промышленной биотехнологии, Казанский национальный исследовательский технологический университет, ziganshind@gmail.com; А. С. Сироткин, доктор технических наук, профессор, зав. каф. промышленной биотехнологии КНИТУ, asirotkin66@gmail.com.

© D. D. Ziganshin, graduate student, department of industrial biotechnology, Kazan National Research Technological University, ziganshind@gmail.com; A. S. Sirotkin, doctor of technical sciences, professor, head of department of industrial biotechnology of KNRTU, asirotkin66@gmail.com.

Все статьи номера поступили в редакцию журнала в период с 25.04.17. по 25.05.17.