Защита растений и иммунология

УДК 633.854.78:632.444.2:632.953.1

DOI 10.25230/2412–608X–2018–1–173–82–86

ЭЛЕМЕНТЫ ЛАБОРАТОРНОГО РЕГЛАМЕНТА ПРОИЗВОДСТВА МИКРОБИОПРЕПАРАТОВ В ПРЕПАРАТИВНОЙ ФОРМЕ «СМАЧИВАЮЩИЙСЯ ПОРОШОК» НА ОСНОВЕ ГРИБОВ-АНТАГОНИСТОВ ИЗ РОДА *TRICHODERMA* ПРИ ПОВЕРХНОСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Л.В. Маслиенко,

доктор биологических наук

А.Х. Воронкова,

младший научный сотрудник

Е.Ю. Шипиевская,

кандидат биологических наук

ФГБНУ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17

Тел.: (861) 275-85-19

E-mail: biometod@vniimk.ru

Для цитирования: Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х., Шипиевская Е.Ю. Элементы лабораторного регламента производства микробиопрепаратов в препаративной форме «смачивающийся порошок» на основе грибов-антагонистов из рода *Trichoderma* при поверхностном культивировании на жидких питательных средах // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2018. – Вып. 1 (173). – С. 82–86.

Ключевые слова: микробиопрепараты, штамм-продуцент, T-2 *Trichoderma sp.*, препаративная форма, поверхностное культивирование, смачивающийся порошок.

Разработаны элементы лабораторного регламента производства микробиопрепаратов в препаративной форме «смачивающийся порошок» (СП) при поверхностном культивировании на жидких питательных средах перспективного грибного штамма-продуцента T-2 *Trichoderma sp.* из коллекции лаборатории биометода. Определён оптимальный срок поверхностного культивирования на жидкой питательной среде Рудакова – десять

суток. Оптимальный объём посевной культуры по отношению к объёму питательной среды составил 2,0 %. Опытные образцы микробиопрепарата в препаративной форме СП, полученные при поверхностном культивировании штамма T-2 *Trichoderma sp.* на жидкой питательной среде, образовывали в воде стойкую суспензию и имели исходный титр 10^{9-10} КОЕ/г и влажность 5,4–6,5 %. При хранении опытных образцов СП микробиопрепарата в пакетах с доступом воздуха и в банках с притёртой крышкой в условиях постоянной низкой температуры (–18 °С) титр в течение 12 месяцев не снизился. При переменной температуре (+24...+26 °С) через шесть месяцев титр опытного образца СП микробиопрепарата снизился на один порядок как в банке, так и в пакете и сохранялся таким 12 месяцев ($1,2–6,0 \times 10^8$ КОЕ). При постоянной высокой температуре (+30 °С) титр в течение двенадцати месяцев снизился на четыре порядка – до 10^5 КОЕ/г. Для сохранения опытных образцов СП микробиопрепарата на основе гриба T-2 *Trichoderma sp.* с незначительным снижением титра (с 10^9 до 10^8 КОЕ/г) в течение двенадцати месяцев при переменной температуре добавление стабилизаторов нецелесообразно.

UDC 633.854.78:632.444.2:632.953.1

Elements of the laboratory regimen for production of microbiopreparation in form of ‘wetttable powder’ based on fungus-antagonists of a genus *Pseudomonas* on surface cultivation on liquid nutrient medium.

Maslienko L.V., doctor of biology

Voronkova A.Kh., junior researcher

E.Yu. Shipievskaya, PhD in biology

All-Russia Research Institute of Oil Crops

17, Filatova str., Krasnodar, Russia 350038

Tel.: (861) 275-85-19

E-mail: biometod@yandex.ru

Key words: microbiopreparations, strain-producer, T-2 *Trichoderma sp.*, preparation form, surface cultivation, wetttable powder.

There were developed the elements of the laboratory regimen for production of microbiopreparation in the form of ‘wetttable powder’ on surface cultivation on liquid nutrient mediums of perspective fungus strain-producer T-2 *Trichoderma sp.* from a collection of the laboratory of biometods. Period of 10 days was determined as optimal for surface cultivation on a liquid nutrient medium of Rudakova. Optimal ratio between volumes of culture and nutrient medium was 2.0%. Test samples of microbiopreparation in the form of ‘wetttable powder’ obtained on surface cultivation of the strain T-2 *Trichoderma sp.* on a liquid

nutrient medium formed a stable suspension in water and had an initial titer 10^{9-10} CFU/g and a moisture content of 5.4-6.5 %. When storing a 'wetable powder' microbiopreparation in packages with air access and in jars with a tightly closed lid, regardless of the method of biomass separation, under conditions of permanent low temperature (-18 °C), the titer have not decreased within twelve months. When storing under variable temperature (+24...+26 °C), after six months the titer of a test sample of a 'wetable powder' microbiopreparation decreased by one order of magnitude both in a jar, and in a package and remained the same for twelve months (1.2×10^8 CFU). Under permanent high temperature (+30 °C) the titer decreased by four orders of magnitude to 10^5 CFU/g in twelve months. It is not reasonable to add antiaging agents to keep test samples of microbiopreparation in the form of 'wetable powder' based on a fungus T-2 *Trichoderma sp.* with insignificant decrease of the titer (from 10^9 to 10^8 CFU/g) during twelve months under variable temperature.

Введение. В лаборатории биометода ФГБНУ ВНИИМК многие годы ведутся исследования по разработке микробиологических средств защиты масличных и других сельскохозяйственных культур от болезней. Создана уникальная коллекция штаммов грибов и бактерий-продуцентов микробиопрепаратов – биофунгицидов. Разрабатываются технологии производства разных препаративных форм микробиопрепаратов и технологии их применения [1].

Ранее в лаборатории биометода были разработаны препаративные формы микробиопрепаратов: жидкая культура, паста и порошок на основе твёрдых носителей – питательных сред (семянки, лузга, отходы от очистки семян подсолнечника) и перлита. Но жидкие культуры и пасты, особенно на основе грибных штаммов-продуцентов, выдерживали хранение не более 10 суток и 3-х месяцев соответственно, даже в холодильнике, а порошки плохо смачивались в воде и забивали отверстия распылителей [2].

Поэтому в последние годы нами решается задача по увеличению срока хранения биопрепаратов без снижения титра в препаративной форме «смачивающийся порошок» (СП) при поверхностном вы-

ращивании штаммов-продуцентов на жидкой питательной среде и конвекционной сушке током воздуха. Ранее нами проведены исследования по отработке элементов лабораторного регламента производства микробиопрепаратов в препаративной форме СП при поверхностном культивировании на жидких питательных средах перспективных грибных штаммов-продуцентов из рода *Penicillium* и бактерий из рода *Bacillus* [3; 4].

В данной работе приведены результаты исследований по разработке элементов лабораторного регламента производства микробиопрепарата в препаративной форме СП при поверхностном культивировании перспективного грибного штамма-продуцента T-2 *Trichoderma sp.* из коллекции лаборатории биометода на жидкой питательной среде. Решены задачи:

- по установлению оптимальных сроков поверхностного культивирования штамма-продуцента на жидких питательных средах и объёма посевной суспензии для максимального образования биомассы;
- по определению сроков хранения опытных образцов микробиопрепаратов в препаративной форме СП на основе штамма-продуцента в зависимости от упаковки, температуры и стабилизаторов без значительного снижения титра.

Материалы и методы. Для установления оптимальных сроков поверхностного культивирования штамм-продуцент выращивали на жидкой питательной среде Рудакова [5] в течение 10, 15 и 20 суток. Определяли массу порошка и титр. Для определения оптимального объёма посевной культуры к 500 мл питательной среды добавляли 2 и 4 % глубинной культуры антагониста, которую предварительно выращивали на жидкой среде, на качалке (195 об./мин) в течение трех суток. Сроки хранения опытных образцов в препаративной форме СП определяли в зависимости от упаковки, температуры и стабилизаторов. Штамм-продуцент выращивали поверхностным способом на жидкой питательной среде при оптимальной температуре 25 °C. Выраженную мицели-

альную плёнку гриба отделяли сливом культуральной жидкости. Затем к биомассе добавляли прилипатель (3 %), растекатель (0,5 %) и наполнитель (20 %). Всё перемешивали, высушивали под вытяжкой при температуре 25–28 °С и размалывали на мельнице с охлаждением. Определяли влажность сырой биомассы и СП методом высушивания до постоянного веса [6]. Опытные образцы хранили в банках с плотно закрытой крышкой объемом 100 мл и бумажных пакетах с доступом воздуха (при этом обе упаковки заполняли СП на 30 % от объема) при постоянных (+30 и -18 °С) и переменной (+24...+26 °С) температурах. При переменной температуре испытывали стабилизаторы: резорцин (0,1 %), тиомочевину (0,05 %), аскорбиновую кислоту (0,05 %), бензоат натрия (0,1 %), сульфат меди (0,05 %), гумат натрия (0,5 %), мелассу (0,3 %), уголь активированный (0,5 %), двуокись титана (1,0 %) и гентамицин (0,015 %). Через 3, 6, 9 и 12 месяцев хранения микробиопрепарата определяли титр микробиологическим способом [7].

Результаты и обсуждение. Опытные образцы микробиопрепарата в препаративной форме СП, полученные при поверхностном культивировании штамма Т-2 *Trichoderma sp.* на жидкой питательной среде Рудакова, образовывали в воде стойкую суспензию, имели исходный титр 10^{9-10} КОЕ/г.

Установлен оптимальный срок поверхностного культивирования грибного штамма-продуцента микробиопрепарата Т-2 *Trichoderma sp.* на жидкой питательной среде (табл. 1).

Установлено, что при всех сроках поверхностного культивирования грибного штамма-продуцента на жидкой питательной среде, из опытных образцов сырой биомассы, получена примерно одинаковая масса СП, с влажностью 5,4–6,5 %. С увеличением срока поверхностного культивирования гриба с 10 до 15 и 20 суток вес СП увеличивался незначительно и составил соответственно 10,06; 12,18 и 12,87 г на 500 мл питательной среды.

Таблица 1

Влияние срока поверхностного культивирования и объёма посевной суспензии грибного штамма-продуцента Т-2 *Trichoderma sp.* на массу опытного образца микробиопрепарата в препаративной форме «смачивающийся порошок» и титр

г. Краснодар, ВНИИМК, 2017 г.

Вариант	Объём посевной суспензии, %	Срок культивирования, сутки					
		10		15		20	
		Масса СП, г	Титр, КОЕ/г	Масса СП, г	Титр, КОЕ/г	Масса СП, г	Титр, КОЕ/г
Т-2	2,0	10,06 ± 0,08	$1,8 \times 10^{10}$	12,18 ± 0,03	$4,5 \times 10^{10}$	12,79 ± 0,03	$6,5 \times 10^{10}$
	4,0	10,3 ± 0,03	$2,9 \times 10^{10}$	11,51 ± 0,07	$4,9 \times 10^{10}$	12,87 ± 0,05	$7,9 \times 10^{10}$

Примечание: *СП – микробиопрепарат в препаративной форме «смачивающийся порошок»

Увеличение объёма посевной культуры к питательной среде с 2 до 4 % значительно не повышало выхода СП, который составил 10,06 и 10,30 г; 12,18 и 11,51 г; 12,79 и 12,87 г соответственно через 10, 15 и 20 суток культивирования. Титр опытных образцов СП микробиопрепарата не зависел от сроков культивирования штамма-продуцента и был одного порядка во всех вариантах выращивания ($1,8–7,9 \times 10^{10}$ КОЕ/г).

Таким образом, оптимальный срок поверхностного культивирования грибного штамма Т-2 *Trichoderma sp.* на жидкой питательной среде Рудакова составил 10 суток, а оптимальный объём посевной культуры – 2 %.

Установлены сроки хранения опытных образцов микробиопрепарата на основе грибного штамма-продуцента микробиопрепарата Т-2 *Trichoderma sp.* в препаративной форме СП в зависимости от герметичности упаковки и температуры хранения (табл. 2).

Изначальный титр опытного образца СП микробиопрепарата был $6,4 \times 10^9$ КОЕ/г. При хранении СП микробиопрепарата в пакетах с доступом воздуха и банках с плотно закрытой крышкой при постоянной низкой температуре (-18 °С) в течение

ние двенадцати месяцев титр сохранялся одного порядка с первоначальным уровнем ($3,2\text{--}3,9 \times 10^9$ КОЕ/г). При переменной температуре (+24...+26 °С) через шесть месяцев титр СП снизился на один порядок как в банке, так и в пакете и сохранялся таким двенадцать месяцев ($1,2\text{--}6,0 \times 10^8$ КОЕ).

Таблица 2

Влияние температуры и упаковки на титр опытных образцов микробиопрепарата в препаративной форме «смачивающийся порошок» на основе грибоного штамма-продуцента T-2 *Trichoderma sp.* в процессе хранения

г. Краснодар, ВНИИМК, 2017 г.

Срок хранения, месяцев	Титр, КОЕ/г					
	+24...+26 °С		+30 °С		-18 °С	
	пакет	банка	пакет	банка	пакет	банка
3	$1,5 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$3,7 \times 10^7$	$3,3 \times 10^7$	$5,7 \times 10^9$	$6,4 \times 10^9$
6	$3,1 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	$2,5 \times 10^9$	$4,7 \times 10^9$
9	$2,2 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$2,6 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$3,1 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$
12	$1,2 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$3,2 \times 10^9$	$3,9 \times 10^9$

При постоянной высокой температуре (+30 °С) титр СП микробиопрепарата на основе гриба-антагониста в течение двенадцати месяцев снизился до 10^5 КОЕ/г.

Таким образом, при хранении опытного образца микробиопрепарата на основе грибоного штамма T-2 *Trichoderma sp.* в препаративной форме «смачивающийся порошок» в пакетах с доступом воздуха и банках с плотно закрытой крышкой в условиях постоянно низкой температуры (-18 °С) титр в течение двенадцати месяцев не снизился. При переменной температуре в лаборатории (+24...+26 °С) за двенадцать месяцев хранения СП титр снизился на один порядок как в банке, так и в пакете (10^8 КОЕ/г). При постоянно высокой температуре (+30 °С) за двенадцать месяцев хранения титр СП снизился на четыре порядка (10^5 КОЕ/г).

Для установления влияния стабилизаторов на сроки хранения опытных образцов микробиопрепарата на основе грибоного штамма-продуцента СП хранили в бумажных пакетах с доступом воз-

духа при переменной температуре в помещении лаборатории от +24 до +26 °С (табл. 3).

Таблица 3

Влияние стабилизаторов на титр опытных образцов микробиопрепарата на основе грибоного штамма-продуцента T-2 *Trichoderma sp.* в препаративной форме СП при хранении в условиях переменной температуры

г. Краснодар, ВНИИМК, 2017 г.

Вариант	Титр, КОЕ/г, через, месяцев			
	3	6	9	12
Контроль	$3,5 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
Резорцин 0,1	$3,1 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
Тиомочевина 0,05	$3,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$	$6,7 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$
Аскорбиновая кислота 0,05	$4,2 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$5,8 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$
Бензоат натрия 0,1	$3,3 \times 10^8$	$2,0 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
Сульфат меди 0,005	$4,5 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
Гидрохинон 0,1	$5,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
Гумат натрия 0,5	$5,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
Меласса 0,3	$3,7 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
Двуокись титана 1,0	$4,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
Уголь активированный 0,5	$4,6 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$4,7 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$
Гентамицин 0,015	$4,3 \times 10^8$	$5,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$

Исходный титр опытного образца СП микробиопрепарата на основе грибоного штамма-продуцента T-2 *Trichoderma sp.* в контроле без добавок составил $5,0 \times 10^9$ КОЕ/г. При хранении в бумажном пакете в условиях переменной температуры от +24 до +26 °С в течение двенадцати месяцев титр микробиопрепарата снизился незначительно, на один порядок – с 10^9 до 10^8 КОЕ/г.

Добавление стабилизаторов не способствовало сохранению титра СП грибоного препарата, а наоборот, снижало титр на порядок, а в вариантах с бензоатом натрия и тиомочевинной – на два порядка (10^6 КОЕ/г). Исключение составили варианты с сульфатом меди и гидрохиноном, в которых титр сохранился на уровне контроля.

Таким образом, установлено, что для сохранения опытных образцов микробиопрепарата на основе гриба T-2 *Trichoderma sp.* с незначительным снижением титра (с 10^9 до 10^8 КОЕ/г) в течение двенадцати месяцев при переменной тем-

пературе добавление стабилизаторов нецелесообразно.

Выводы. 1. Опытные образцы микробиопрепарата в препаративной форме СП, полученные при поверхностном культивировании штамма Т-2 *Trichoderma sp.* на жидкой питательной среде Рудакова, образовывали в воде стойкую суспензию, имели исходный титр 10^{9-10} КОЕ/г и влажность 5,4–6,5 %.

2. Оптимальный срок поверхностного культивирования грибного штамма Т-2 *Trichoderma sp.* на жидкой питательной среде Рудакова составил 10 суток, а оптимальный объём посевной культуры – 2 %.

3. При хранении опытного образца СП микробиопрепарата в пакетах с доступом воздуха и банках с плотно закрытой крышкой при постоянной низкой температуре ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение двенадцати месяцев титр сохранялся одного порядка с первоначальным уровнем ($3,2\text{--}3,9 \times 10^9$ КОЕ/г).

4. При переменной температуре ($+24\text{...}+26\text{ }^{\circ}\text{C}$) через шесть месяцев титр опытного образца СП микробиопрепарата снизился на один порядок как в банке, так и в пакете и сохранялся таким двенадцать месяцев ($1,2\text{--}6,0 \times 10^8$ КОЕ/г).

5. При постоянной высокой температуре ($+30\text{ }^{\circ}\text{C}$) титр опытного образца СП микробиопрепарата на основе гриба-антагониста в течение двенадцати месяцев снизился на четыре порядка – до 10^5 КОЕ/г.

6. Для сохранения опытных образцов СП микробиопрепарата на основе гриба Т-2 *Trichoderma sp.* с незначительным снижением титра (с 10^9 до 10^8 КОЕ/г) в течение двенадцати месяцев при переменной температуре добавление стабилизаторов нецелесообразно.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края, грант № 16-48-230293.

Список литературы

1. Маслиенко Л.В. Обоснование и разработка микробиологического метода борьбы с болезнями подсолнечника: дис. ... докт. биол. наук: защищена 03.06.05, утв. 07.10.05. – Краснодар, 2005. – 377 с.

2. Маслиенко Л.В. Лаборатория биологических средств защиты растений (вчера, сегодня, завтра)

// В кн.: История научных исследований во ВНИИМК за 90 лет. – Краснодар, 2003. – С. 273–281.

3. Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х. Элементы лабораторного регламента производства микробиопрепаратов на основе грибных штаммов-продуцентов в препаративной форме «смачивающийся порошок» // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2016. – Вып. 4 (168). – С. 100–107.

4. Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х. Элементы лабораторного регламента производства микробиопрепарата в препаративной форме «смачивающийся порошок» на основе бактерий антагонистов из рода *Bacillus* // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – Краснодар, 2017. – Вып. 3 (171). – С. 93–96.

5. Рудаков О.Л. Микофильные грибы, их биология и практическое значение. – М.: Наука, 1981. – 160 с.

6. ГОСТ 5180-2015 Грунты. Методы лабораторного определения физических характеристик. – М.: Стандартинформ, 2016. – 20 с.

7. Егоров Н.С. Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1957. – 78 с.

References

1. Maslienko L.V. Obosnovanie i razrabotka mikrobiologicheskogo metoda bor'by s boleznyami podsolnechnika: dis. ... dokt. biol. nauk: zashchishchena 03.06.05, utv. 07.10.05. – Krasnodar, 2005. – 377 s.

2. Maslienko L.V. Laboratoriya biologicheskikh sredstv zashchity rasteniy (vchera, segodnya, zavtra) // V kn.: Istoriya nauchnykh issledovaniy vo VNIIMKe za 90 let. – Krasnodar, 2003. – S. 273–281.

3. Maslienko L.V., Voronkova A.Kh. Elementy laboratornogo reglamenta proizvodstva mikrobiopreparatov na osnove gribnykh shtammov-produtsentov v preparativnoy forme «smachivayushchiysya poroshok» // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2016. – Vyp. 4 (168). – S. 100–107.

4. Maslienko L.V., Voronkova A.Kh. Elementy laboratornogo reglamenta proizvodstva mikrobiopreparata v preparativnoy forme «smachivayushchiysya poroshok» na osnove bakteriy antagonistov iz roda *Bacillus* // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – Krasnodar, 2017. – Vyp. 3 (171). – S. 93–96.

5. Rudakov O.L. Mikofil'nye griby, ikh biologiya i prakticheskoe znachenie. – M.: Nauka, 1981. – 160 s.

6. GOST 5180-2015 Grunty. Metody laboratornogo opredeleniya fizicheskikh kharakteristik. – M.: Standartinform, 2016. – 20 s.

7. Egorov N.S. Vydelenie mikrobov-antagonistov i biologicheskie metody ucheta ikh antibioticheskoy aktivnosti. – M.: Izd-vo Mosk. un-ta, 1957. – 78 s.