

Г.М. ТКАЛЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук
С.В. ГОРАЛЬ, кандидат сільськогосподарських наук,
Інститут захисту рослин НААН

ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ ГЛИБИННОГО КУЛЬТИВУВАННЯ ГРИБА РОДУ *TRICHODERMA*

*На основі проведених досліджень впливу температури, інтенсивності аерації, рН, густоти засіву живильного середовища на продуктивність гриба *Trichoderma lignorum* встановлено їх оптимальні показники і визначено основні технологічні параметри глибинного його культивування, які дають змогу отримувати найвищу продуктивність штаму гриба для промислового виробництва біопрепарату — Триходерміну рідкого — для типових умов виробничих біолабораторій України*

живильні середовища, глибинне культивування, гриб *Trichoderma*, біомаса, титр

В світовій практиці застосовуються понад 50 біологічних препаратів на основі мікроорганізмів-антагоністів, що свідчить про перспективність і розширення сфери їх застосування для біоконтролю поширених патогенів: *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Pythium*, *Rhizoctonia* та ін. З біологічних агентів, які знайшли найбільш практичне застосування для захисту рослин від хвороб у нашій країні та за її межами є біопрепарати, створені на основі грибів роду *Trichoderma*, які мають широкий спектр антагоністичних властивостей: утворюють ряд антибіотиків (гліотоксин, віридин та ін.), токсичних для фітопатогенів; виділяють ферменти, здатні гідролізувати клітинні структури фітопатогенних грибів; гіперпаразитизмом, конкуренцією за субстрат [1, 3, 4, 5].

До того ж, крім високого антагоністичного потенціалу, грибам цього роду властива хороша швидкість росту та можливість культивування на недорогих субстратах, тому їх широко використовують для розробки біологічних препаратів у виробничих умовах.

Залежно від рівня технологічного оснащення виробничих біолабораторій процес напрацювання біопрепаратів може здійснюватися різними способами. В умовах виробничих біолабораторій триходерму частіше за все вирощують поверхневим способом, який не потребує спеціального обладнання, але має ряд суттєвих недоліків (значна тривалість процесу вирощування і витрати ручної праці, забруднення сторонніми мікроорганізмами, нестабільний вихід готового продукту),

що помітно впливають на продуктивність процесу та якість продукту. Однак, за певної організації цей спосіб може широко використовуватись для отримання препарату.

Сучасна технологія одержання мікробіологічних препаратів полягає у вирощуванні мікроорганізмів в умовах глибинної культури з використанням рідких живильних середовищ.

Активність і життєздатність мікроорганізмів за глибинного культивування значною мірою визначаються їх фізіологічним станом і впливом різних факторів (температури, інтенсивності аерації, рН, густоти засіву). Виходячи з цього, метою наших досліджень було визначення впливу цих чинників на ріст гриба *Trichoderma lignorum* в глибинній культурі.

Методика. Досліди з вивчення впливу температури, інтенсивності аерації, рН, густоти засіву на ріст гриба *Trichoderma lignorum* в глибинній культурі проводили в колбах на лабораторних мікробіологічних качалках на різних живильних середовищах — Чапека, на основі пивного суслу, ячмінний і вівсяний відвари, м'ясо-пептонне, синтетичне, кукурудзяно-мелясне.

Основні параметри культивування: кількість біомаси гриба і титр хламідоспор в культуральній рідині визначали через кожних 24 години, протягом 72 годин, інтенсивність аерації сульфитним методом, активну кислотність середовищ за допомогою рН-метра WTW рН 720.

Кількість біомаси грибів, яка утворювалась у відповідні проміжки часу, визначали шляхом відбору проб, фільтрації їх через паперовий фільтр, висушування до постійної маси при температурі 70°C і наступного визначення маси кожного фільтра, кількості міцелію, конідій, хламідоспор та підрахунком їх в камері Горяєва під мікроскопом [2].

Результати досліджень. Ріст і споруутворення грибів за різних способів вирощування проходить у широкому діапазоні температур, однак максимальних значень вони досягають за оптимальних температурних режимів. Їстотно залежать від температури основні показники продуктивності і гриба-антагоніста *Trichoderma lignorum* за глибинного способу вирощування.

Проведені нами дослідження з визначення інтенсивності росту (вихід біомаси і утворення хламідоспор) гриба *T. lignorum* в глибинній культурі засвідчили, що їх показники значною мірою залежали від температури. Як свідчать дані таблиці 1, через 24 години культивування кількість біомаси гриба зростала пропорційно із підвищенням температури і досягала максимальних значень (9,4 г/л) при 30°C; за температури 21—26°C вихід біомаси був в 2,5—1,6 раза менший (3,7—4,7 г/л), ніж за температури 28—30°C, який становив відповідно 5,9—9,4 г/л. Через 48 годин культивування найбільше біомаси гриб накопичував в температурному діапазоні 26—30°C (11,0—11,8 г/л) проти 5,9—7,8 г/л

1. Вплив температури на ріст гриба *Trichoderma lignorum* в глибинній культурі

Температура, °C	Біомаса, г/л, через ... год			Титр хламідоспор, млн/мл, через год	
	24	48	72	48	72
21	3,7±0,43	5,9±0,21	11,0±0,42	5,02±0,46	7,23±1,605
24	4,4±0,31	7,8±0,42	12,1±0,22	14,2±1,26	20,03±1,801
26	4,7±0,94	11,5±0,24	13,1±0,27	15,10±2,269	20,16±0,64
28	5,9±0,55	11,0±0,53	9,7±0,1	18,05±1,602	19,58±1,460
30	9,4±0,2	11,8±0,2	11,6±0,6	18,92±0,286	19,21±0,065

за нижчих температурних показників 21—24°C. Збільшення тривалості культивування гриба до 72 год в температурному діапазоні 21—30°C майже не призводило до збільшення біомаси, яка була на рівні 11,0—12,1 г/л, а температура 28°C навіть пригнічувала утворення біомаси до 13% в порівнянні з 48-годинним вирощуванням гриба.

Встановлено, що підвищення температури через 48 і 72 години глибинного вирощування гриба стимулювало і утворення його хламідоспор. Найбільше хламідоспор в глибинній культурі гриб *T. lignorum* накопичував як через 48 годин, так і через 72 години його культивування за температури 24—30°C (14,2—18,9 і 19,2—20,1 млн/мл відповідно). За температури 21°C через 48 і 72 години вирощування гриб утворював значно менше хламідоспор, кількість яких становила тільки 5,0 і 7,23 млн/мл. Таким чином, в глибинній культурі гриб триходерма добре росте в температурному діапазоні 24—30°C, але найдоцільніше глибинне його вирощування проводити за температури 24—26°C протягом 72 години, а за температури 28—30°C — протягом 48—60 годин, що забезпечує одержання найвищих технологічних параметрів глибинного культивування продуценту.

Одним із важливих факторів, що впливає на активність та життєздатність мікроорганізмів у середовищах, є його рН. Розвиток мікроорганізмів при глибинному культивуванні суттєво залежить від величини рН середовища, причому велике значення має не лише початкова величина рН, але і її зміни в процесі культивування в результаті споживання культурою певних катіонів або аніонів середовища в процесі життєдіяльності мікроорганізмів, в результаті чого відбувається підкислення або підлуження культуральної рідини.

На основі проведених досліджень встановлено, що гриб — антагоніст здатний рости в межах рН від 3,15 до 7,15 (табл. 2). Найінтенсивніше накопичував гриб біомасу через 72 години його культивування, яка була на рівні 13,1—14,2 г/л і практично не залежала від початкового рН середовища. Через 24 години вирощування цей гриб

формував саму нижчу кількість біомаси 5,3—5,9 г/л. Після 48 годин глибинного культивування накопичення біомаси грибом зростало до 10,3—12,5 г/л.

Вивчення впливу рН на титр хламідоспор гриба *T. lignorum* показало, що найінтенсивніший перебіг цього процесу спостерігається за рН 4,15, при якому через 48 і 72 години вирощування гриба в глибинній культурі він утворює найбільшу кількість хламідоспор 17,9 і 20,4 млн/мл відповідно. Після 48 годин культивування гриба з нейтральним значенням рН титр хламідоспор зменшувався в 1,3—1,4 рази. Як за нижчих значень рН 3,15, так і вищих значень 6,65—7,15 утворення хламідоспор цього гриба істотно гальмується і титр знижується в 2,2—3,1 раза. Дослідження показали, що після глибинного культивування гриба протягом 72 годин в середовищах з рН 3,15 і рН 5,25 утворення хламідоспор проходить інтенсивніше (15,1—17,5 млн/мл), порівняно з середовищами з нейтральним або слабколужним значенням рН 6,00—7,15, при яких титр хламідоспор був нижчий на 29,6—46,0%. Отже, оптимум рН кукурудзяно-мелясного середовища для глибинного культивування гриба знаходиться в межах 4,0—4,5.

При вивченні впливу інтенсивності аерації на ріст гриба *T. lignorum* встановлено, що за найнижчої градації інтенсивності аерації 0,38 г O_2 /л за годину через 48 і 72 години культивування вихід біомаси та продукування хламідоспор були найнижчими і становили 6,4—8,7 г/л та 4,84—7,72 млн/мл відповідно (табл. 3). Підвищення інтенсивності аерації до 0,58—0,99 г O_2 /л годину стимулювало розвиток та диференціацію гриба. Технологічні показники — вихід біомаси і титр хламідоспор збільшувалися через 48 годин культивування в середньому в 1,4—1,6 і 3,5—3,9 раза відповідно, а після 72 год вирощування гриба — в 1,5 і 2,6 раза. За найвищої інтенсивності розчинності кисню (1,25 г O_2 /л годину) накопичення біомаси відбувалося дещо швидше і досягало максимуму 12,5 г/л через 48 год культивування, а після 72 год було на рівні (11,5 г/л) попередніх показників. Найбільшу кількість хламідоспор (19,29 і 24,8 млн/мл) гриб продукував за інтенсивності аерації 0,83 г O_2 /л годину після 48 і 72 годин вирощування. Встановлено, що збільшення або зменшення інтенсивності аерації 0,83 г O_2 /л годину призводило до зниження титру гриба.

Результати проведених досліджень впливу густоти засіву на продуктивність гриба *T. lignorum* в глибинній культурі свідчать (табл. 4), що при засіві поверхневими конідіями швидкість росту гриба, утворення біомаси та кінцевий вихід хламідоспор протягом 72 год культивування в незначній мірі залежали від густоти засіву. Кількість біомаси була в межах 5,5—7,5 г/л після 24 год культивування і 11,0—11,7 г/л через 48 і 72 год. Щодо титру хламідоспор гриба, то виняток склала найнижча густина засіву (4×10^5 спор/мл), при якій хламідос-

2. Вплив рН середовища на ріст гриба *Trichoderma lignorum* в глибинній культурі

Початкове рН середовища	рН культуральної рідини через ... год			Біомаса, г/л, через ... год			Титр хламідоспор, млн/мл, через ... год		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72
3,15	3,09	4,00	5,29	5,7±0,26	11,9±0,27	13,6±0,42	0,69±0,02	9,3±0,45	17,5±0,59
4,15	4,31	6,38	6,62	5,6±0,30	12,4±0,58	14,2±0,53	0,61±0,01	17,9±2,83	20,4±1,24
5,25	5,66	6,90	7,17	5,7±0,35	12,5±0,17	14,0±0,81	0,58±0,09	13,5±2,97	15,1±2,55
6,00	6,13	6,93	7,20	5,3±0,18	11,7±0,38	13,1±0,94	0,73±0,08	12,6±1,87	12,2±1,52
6,65	6,68	7,14	7,48	5,7±0,12	12,1±0,26	13,9±0,97	0,77±0,11	8,1±0,85	13,5±2,51
6,90	6,85	7,01	7,75	5,3±0,27	11,1±0,84	13,5±0,16	0,74±0,04	6,9±1,20	10,3±2,03
7,15	6,94	7,56	7,93	5,9±0,24	10,3±0,57	13,5±0,34	1,00±0,07	5,8±1,37	12,8±0,79

3. Вплив інтенсивності аерації на ріст гриба *Trichoderma lignorum* в глибинній культурі

Інтенсивність аерації, г О ₂ /л/год	Біомаса, г/л, через ... год			Титр хламідоспор, млн/мл, через год		
	24	48	72	48	72	72
0,38	4,1±0,07	6,4±0,12	8,7±0,81	4,84±1,419	7,72±0,597	19,81±1,221
0,58	6,6±0,35	10,9±0,07	11,8±0,35	15,44±1,584	19,29±3,796	24,80±1,236
0,83	6,7±0,70	11,6±0,2	11,3±0,29	15,10±2,269	20,16±0,640	18,09±2,053
0,99	4,7±0,94	11,5±0,24	13,1±0,27	13,66±0,766		
1,25	5,8±0,40	12,5±0,37	11,5±0,24			

4. Залежність росту гриба *Trichoderma lignorum* від густоти засіву в глибинній культурі

Густота засіву	Біомаса, г/л, через ... год культивування			Титр хламідоспор, млн/мл, через ... год культивування		
	24	48	72	24	48	72
<i>Засів поверхневими конідіями</i>						
4×10 ⁵ спор/мл	5,5±0,48	11,5±0,18	11,7±0,70	1,72±0,193	12,76±0,422	19,17±0,728
2×10 ⁶ спор/мл	6,9±0,57	11,0±0,12	11,3±0,13	10,25±0,090	16,60±2,102	20,15±1,319
4×10 ⁶ спор/мл	7,5±0,33	10,3±0,37	11,7±0,07	11,38±0,106	19,47±1,908	21,70±0,249
<i>Засів глибинною культурою</i>						
2% (2×10 ⁵ спор/мл)	5,7±0,27	10,2±0,46	12,0±0,31	2,21±0,149	10,09±0,475	15,25±1,694
8% (8×10 ⁵ спор/мл)	8,7±0,88	11,1±0,07	10,8±0,46	4,55±0,748	14,07±2,470	15,09±0,855
20% (2×10 ⁶ спор/мл)	10,0±0,81	11,6±0,31	11,5±0,24	8,03±0,918	14,53±1,891	14,61±1,111

пори в глибинній культурі починали утворюватися пізніше. Через 24 години вирощування їх кількість становила 1,7 млн/мл, тоді як при густоті засіву в 2×10⁶ спор/мл і 4×10⁶ спор/мл вона була вищою в 6–6,7 раза і склала відповідно 10,3–11,4 млн/мл. Підвищувався титр хламідоспор до 30–52% при цих двох посівах і після 48 і 72 годин культивування.

При засіві середовища гриба глибинною культурою за низької густоти 2×10⁵ спор/мл після 24 і 48 годин культивування відмічали самі низькі показники біомаси та титру — 5,7 і 10,2 г/л та 2,21 і 10,09 млн/мл відповідно. Підвищення густоти засіву до 8×10⁵ спор/мл і 2×10⁶ спор/мл супроводжувалося незначним збільшенням біомаси: через 48 год культивування — до 8–13,7%, а після 72 год відмічали зниження з 12 г/л до 10,8–11,5 г/л. Водночас збільшення густоти засіву в 10 разів призводило до підвищення титру хламідоспор на початковому етапі росту через 24 год — в 3,6 раза і в 2,1 раза через 48 год, але через 72 год культивування кількість хламідоспор не залежала від густоти засіву і була на рівні 14,6–15,3 млн/мл. При засіві середовищ поверхневими конідіями середній кінцевий титр гриба через 72 год

культивування становив 20,3 млн/мл, що в 1,3 раза вище, ніж при засіві глибинною культурою (13,6 млн/мл). Це пояснюється тим, що конідії гриба, проростаючи, швидше утворюють міцелій з хламідоспорами, порівняно з глибинною культурою.

ВИСНОВКИ

Встановлено, що основні технологічні параметри глибинного культивування гриба *T. lignorum* — температура вирощування, активна кислотність середовища, інтенсивність аерації, густина засіву маточної культури — істотно впливають на інтенсивність і продуктивність технологічного процесу.

Досліджено, що в глибинній культурі гриб *Trichoderma lignorum* добре росте в температурному діапазоні 24—30°C, але найдоцільніше глибинне вирощування проводити за температури 24—26°C — протягом 72 год, а за температури 28—30°C — 48—60 год, що забезпечує одержання найвищих технологічних параметрів глибинного культивування продукценту.

Визначено, що оптимум рН кукурудзяно-мелясного середовища для глибинного культивування гриба *T. lignorum* знаходиться в межах 4,0—4,5, що дозволяє отримувати найвищу продуктивність штаму гриба — до 20,4 млн/мл.

Оптимальна кількість посівного матеріалу при виробничому культивуванні становить 1—2 млн спор/мл за використання поверхневої культури, отриманої на агаризованих середовищах або зерні, або 2—5% по об'єму глибинної культури. Оптимальні значення інтенсивності аерації для глибинного культивування гриба складають 0,7—0,9 г O₂/л год, при яких гриб продукує найбільшу кількість хламідоспор і забезпечує максимальне накопичення біомаси.

БІБЛІОГРАФІЧНИЙ СПИСОК

1. *Микромицеты почв* / В.И. Билай, И.А. Элланская и др. — К.: Наук. думка, 1984. — 264 с.
2. *Практикум по микробиологии* / А.И. Нетрусов и др. — М.: Академия, 2005. 608 с.
3. *Твердюков А.П.* Биологический метод борьбы с вредителями и болезнями в защищенном грунте / А.П. Твердюков, П.В. Никонов, Н.П. Ющенко // М.: Колос, 1993. — 159 с.
4. *Kubicek C.P., Harman G.E.* Trichoderma and Gliocladium. / C.P. Kubicek, G.E. Harman // Enzymes, Biological Control, and Commercial Applications. Taylor & Francis. 1998. — Vol. 2. — 380 p.
5. *Papavizas G.C.* Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology, and potential for biocontrol II Annu. / G.P. Papavizas // Rev. Phytopathol. 1985. — Vol. 23. — P. 23 — 54.

Ткаленко А.Н., Гораль С.В. Оптимизация параметров глубинного культивирования гриба рода TRICHODERMA

*На основе проведенных исследований по влиянию температуры, интенсивности аэрации, рН, густоты засева питательной среды на продуктивность гриба *Trichoderma lignorum* установлены их оптимальные показатели и определены основные технологические параметры глубинного его культивирования, которые позволяют получать наибольшую продуктивность штамма гриба для промышленного производства био-препарата Триходермин жидкий для типичных условий промышленных биолaborаторий Украины.*

Tkalenko A.N., Goral S.V. Optimization of parameters of submerged cultivation of the fungus genus TRICHODERMA

*On the basis of studies on the effect of temperature, aeration intensity, pH, nutrient density of seeding on the productivity of the fungus *Trichoderma lignorum* set their optimal performance and the main technological parameters of its deep culture that can produce the highest yield of fungal strain for industrial production of biological preparation of *Trichoderma* liquid for typical conditions of industrial biolaboratories in Ukraine.*