

УДК 632.4.01/08

Шагаев А.А., Зеленова Н.А., Дмитриева Е.Н., Белов А.А., Марквичёв Н.С.

## ПОВЕРХНОСТНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* И *TRICHODERMA* НА ЦЕЛЛЮЛОЗНОМ НОСИТЕЛЕ В НЕПРЕРЫВНЫХ УСЛОВИЯХ

**Шагаев Антон Александрович**, магистр 1-го курса факультета биотехнологии и промышленной экологии, e-mail: shagaev.anton.94@mail.ru

**Зеленова Наталья Александровна**, студент 4-го курса факультета биотехнологии и промышленной экологии;

**Дмитриева Евгения Николаевна**, заведующая лабораторией кафедры биотехнологии;

**Белов Алексей Алексеевич**, д.т.н., доцент кафедры биотехнологии;

**Марквичёв Николай Семёнович**, к.т.н., доцент кафедры биотехнологии;

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20.

*Было изучено развитие и рост микроскопического гриба Trichoderma viride и Fusarium oxysporum на поверхности целлюлозного носителя при культивировании в непрерывных и периодических условиях. Получены данные об образовании редуцирующих веществ при культивировании Trichoderma viride и Fusarium oxysporum на поверхности целлюлозного носителя. Так же были определены ферментативные активности в этих условиях. Сделаны выводы о целесообразности исследований взаимодействия микроорганизмов на модельных системах в непрерывных условиях.*

**Ключевые слова:** непрерывное культивирование, целлюлозный носитель, ферментные системы, метаболизм.

## SURFACE CULTIVATION OF FUNGI OF THE GENUS *FUSARIUM* AND *TRICHODERMA* ON A CELLULOSE CARRIER IN CONTINUOUS CONDITIONS.

Shagaev A.A.\*, Zelenova N.A., Dmitrieva E.N., Belov A.A., Markvichev N.S.

D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia.

\*e-mail: [shagaev.anton.94@mail.ru](mailto:shagaev.anton.94@mail.ru)

*We studied the growth and development of the microscopic fungus Trichoderma viride and Fusarium oxysporum on the surface of the cellulose carrier during cultivation under continuous and intermittent conditions. The data obtained about the formation of reducing substances during the cultivation of Trichoderma viride and Fusarium oxysporum on the surface of the cellulose carrier. Also was determined the enzymatic activity in these conditions. Conclusions on the feasibility studies of the interaction of microorganisms in model systems in continuous conditions.*

**Key words:** continuous cultivation, a cellulose media, enzyme systems, metabolism.

Одним из важных этапов разработки биологических препаратов средств защиты растений является скрининг штаммов микроорганизмов, оказывающих влияние на фитопатогенную микрофлору. В основе скрининга лежит взаимодействие микроорганизмов при их росте на агаризованных средах. Техническая организация метода может быть различной, посев микроорганизмов уколом, методом пересикающихся штрихов, методом диффузии в агар и т.д. Результаты взаимодействия микроорганизмов при таких методах исследований достаточно сложно однозначно интерпретировать, так как при таком способе культивирования на полученные результаты оказывают влияние сразу несколько факторов: микроорганизмы развиваются на питательных средах, не соответствующих ни по составу, ни по концентрациям тем средам, которые формируются в ризосфере растения за счет выделения им корневых экссудатов. Развитие микроорганизмов при культивировании на чашках Петри описывается периодическими законами роста [1], в то время как экссудация растений процесс непрерывный [2]. Кроме того, в ризосфере растения сама корневая

система является на определенном этапе развития субстратом, который метаболизируется фитопатогенным микроорганизмом. Всё это зачастую не позволяет правильно спрогнозировать поведение выбранного для дальнейшей работы над биологическим препаратом средства защиты растения микроорганизма в реальных условиях, и как следствие эффективность препарата на его основе не всегда высока. Для создания эффективного метода биологической защиты растений необходимо создавать модельные системы, имитирующие живое растение, и анализировать поведение сосуществующих микроорганизмов в условиях, приближенных к реальным.

На первом этапе разработки таких систем культивирования необходимо показать, что выбранные микроорганизмы способны расти в условиях, созданных в рамках выбранной модели. Причем, этапы развития микроорганизмов в модельных условиях должны адекватно соответствовать этапам при культивировании на богатых искусственных средах. Для этого была проведена серия экспериментов с культурами микровицетов. Штаммы *Trichoderma viride* и

*Fusarium oxysporum* культивировали отдельно в периодических условиях во «влажных камерах» и на среде Чапека. В качестве единственного источника углерода в каждую влажную камеру помещался диск лабораторной фильтровальной бумаги [3] диаметром 9 см и плотностью 75г/м<sup>2</sup>.

В центр каждой чашки вносили суспензию спор *Trichoderma viride* и *Fusarium oxysporum* объемом 0,2 мл. Затем чашки Петри помещали в термостат и культивировали в течение пяти суток при 27°C. Для поддержания влажности в камеры каждые сутки вносили по 3 мл стерильной воды. В течение первых трех суток наблюдали за ростом культуры в чашках. Рост культуры на среде Чапека был более обильным. На третий день культивирования прослеживался рост микроорганизмов на бумаге. Развитие микроорганизмов во влажных камерах было менее интенсивным, чем на среде Чапека.

На третьи сутки культивирования из влажных камер начали отбирать пробы для определения количества редуцирующих веществ (РВ) и целлюлолитической активности. Через 1, 3, 5, 24 и 48 часов из каждой влажной камеры отбиралось по 2 мл культуральной жидкости. Для поддержания влажности после отбора проб в чашки вносили по 3 мл стерильной воды.

Отобранную культуральную жидкость анализировали на предмет содержания редуцирующих веществ по методу, основанному на связывании РВ динитросалициловой кислотой.

Определение целлюлолитической активности (ЦА) микромицетов осуществляли по методу, который основан на связывании динитросалициловой кислоты с редуцирующими сахарами, образующимися в процессе гидролиза субстрата под действием целлюлазных полиферментных систем микромицетов [4]. Результаты представлены на рисунках 1,2.

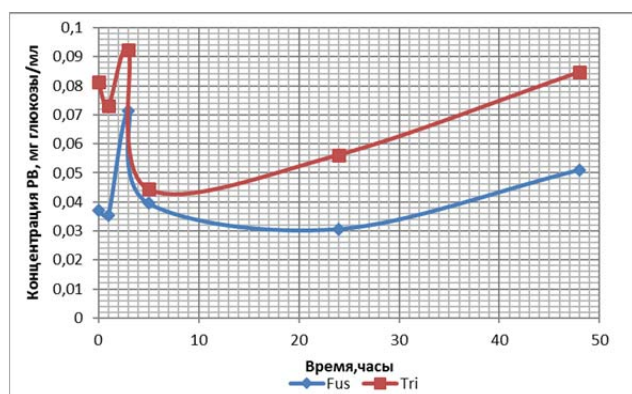


Рисунок 1. Анализ изменения ферментативной активности при периодическом культивировании на бумаге во влажных камерах.

Опыт показал, что выбранные микроорганизмы способны расти в периодических условиях во влажных камерах, в которых единственным источником углерода является целлюлоза.

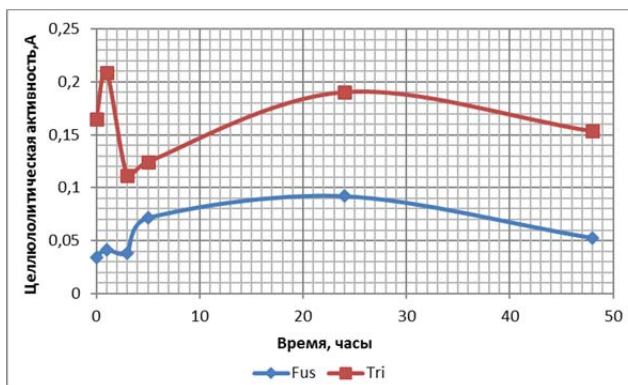


Рисунок 2. Анализ изменения концентрации РВ при периодическом культивировании на бумаге во влажных камерах.

Созданные в этом опыте условия культивирования моделируют колонизацию микромицетами поверхность корневой системы растения. Было показано, что штаммы *Trichoderma viride* и *Fusarium oxysporum* способны выделять экзоферменты целлюлолитического ряда, расщепляющие целлюлозу с образованием редуцирующих веществ. Однако, опираясь на имеющиеся данные, нельзя сказать, как поведут себя микроорганизмы при непрерывном внесении экссудатов в зону развития микроорганизмов.

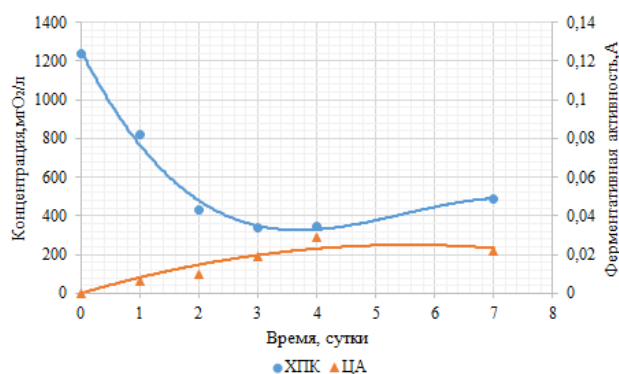
В связи с этим было принято решение о постановке эксперимента по непрерывному культивированию исследуемых микроорганизмов на целлюлозном носителе в стерильной установке, разработанной нами ранее [5]. В качестве субстрата для культивирования была использована питательная среда, моделирующая экссудаты корневой системы огурца. Концентрация экссудатов для проведения процессов культивирования выбиралась близкой к той, которая образуется в прикорневой зоне огурца, выращиваемого на минеральной вате в тепличном комбинате.

Для проведения культивирования была собрана установка, включающая в себя описанный ранее реактор [5]. Стерилизацию всей системы вместе с питательной средой проводили в автоклаве, объем питательной среды рассчитывали на 10-15 дней непрерывного культивирования, расход питательной среды задавали перистальтическим насосом, и он составлял 2,7 мл/час. В качестве инокулята использовали суспензию спор соответствующих клеток в физиологическом растворе, полученную смывом с культуры, выращенной на поверхности агаризованной среды. Суспензия наносилась на поверхность целлюлозной мембраны в стерильных условиях, шприцом, через ватную пробку. Вся установка термостатировалась при 25 °С. В ходе процесса культивирования через равные интервалы времени отбирали пробы выходящей из реактора культуральной жидкости, в которых определяли концентрацию экссудатов и ферментативную активность.

В качестве модели экссудатов корневой системы растения применяли раствор органических кислот (г/л водопроводной воды): янтарная кислота – 0,5, лимонная кислота-0,5. Данный раствор был составлен исходя из анализа литературных данных о качественном и количественном составе экссудатов огурца [6].

Для анализа концентрации экссудатов применяли метод титриметрического определения ХПК. Метод основан на окислении органических веществ избытком  $K_2Cr_2O_7$  в растворе  $H_2SO_4$  при нагревании в присутствии катализатора –  $Ag_2SO_4$ . Остаток бихромата калия находят титрованием соли Мора в присутствии индикатора N-фенилантрапиновой кислоты [7].

Протеолитическую активность (ПА) определяли по методу, который основан на определении



скорости ферментативной реакции гидролиза субстрата под действием исследуемых протеолитических ферментов, содержащихся в материале, взятом на анализ. Скорость реакции определяют по количеству образовавшихся аминокислот – тирозина (α-амино-β-оксибензилпропионовая кислота) и триптофана (α-амино-β-индолилпропионовая кислота), которые устанавливают колориметрической реакцией с реактивом Фолина. Этим методом определяют указанные аминокислоты как в свободном, так и в связанном состоянии [4].

На рисунке 3 представлены изменение ХПК и целлюлолитической активности на выходе из реактора при культивировании грибов *Fusarium oxysporum* (рисунок 3, а) и *Trichoderma viride* (рисунок 3, б).

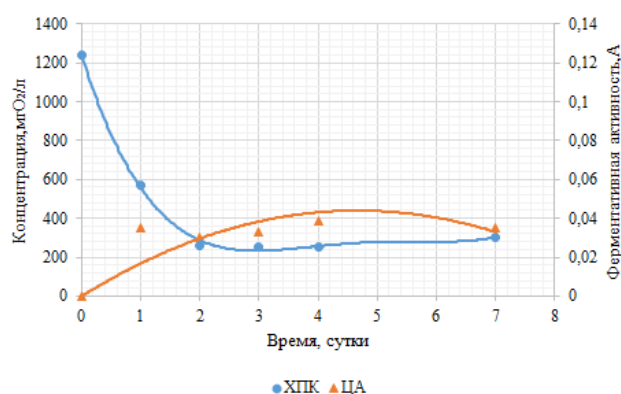


Рисунок 3. а- изменение ХПК и целлюлолитической активности при культивировании грибов *Fusarium oxysporum*, б - изменение ХПК и целлюлолитической активности при культивировании грибов *Trichoderma viride*.

Как видно из рисунка 3, концентрация субстрата, измеренная как ХПК, на выходе из реактора снижается, достигая стационарного состояния на уровне 200-350 мгО<sub>2</sub>/л к 2-3 суткам культивирования. Физиологическое состояние культуры существенно не отличалось от соответствующего состояния, определенного нами для клеток, растущих на агаризованной среде Чапека. Анализ ферментативной активности в выходящем из реактора потоке показал наличие целлюлолитической активности, достигая стационарного состояния на уровне 0,035 ед.А и отсутствие протеолитической активности.

Полученные на данной стадии исследования результаты позволили убедиться в том, что разработанная нами система культивирования микроорганизмов пригодна для поверхностного культивирования грибов рода *Trichoderma* и *Fusarium*. Рост микромицетов осуществляется за счет метаболизма органических компонентов питательной среды и на определенном этапе развития начал происходить метаболизм целлюлозы. Наличие целлюлолитической активности может говорить о том, что данные микроорганизмы способны развиваться в такой системе, используя целлюлозу в качестве источника углерода. Следовательно, дальнейшее изучение этих микроорганизмов и их взаимодействия возможно в предложенной нами системе.

## Список литературы

1. Пеньков Н. В. К кинетике процессов роста, размножения и гибели микроорганизмов //Успехи современного естествознания. – 2011. – №. 1.
2. Багирова С. Ф. и др. Фундаментальная фитопатология //М.: Красанд. – 2012.
3. ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.
4. Белов А.А. Текстильные материалы, содержащие иммобилизованные гидролазы для медицинских и косметологических целей. Получение. Свойства. Применение. //LAP LAMBERT Acad. Pub., GmbH &Co. KG, Germany, 2012.
5. Шагаев А.А. и др. Поверхностное культивирование грибов рода *Fusarium* и *Trichoderma* при непрерывном подводе компонентов питания //Бутлеровские сообщения. -2017. -№11
6. Кравченко Л. В. и др. Видовые особенности состава корневых выделений растений и его изменение в ризосфере под влиянием почвенной микрофлоры //Сельскохозяйственная биология. – 2011. – №. 3. – С. 71-75.
7. РД 52.24.421-2007 Химическое потребление кислорода в водах. Методика выполнения измерений титриметрическим методом.