

ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛОНИЗАЦИИ ТОРФОСУБСТРАТОВ ГРИБОМ *TRICHODERMA VIRIDE* ПРИ ВНЕСЕНИИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПРЕПАРАТИВНЫХ ФОРМ

К.В. ЧЕКАЛОВА, Н.С. МАРКВИЧЁВ, Е.В. ПОДШИВАЛОВА, Е.С. ИГНАТЬЕВА

(Кафедра биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева)

Проанализирована способность гриба *Trichoderma viride* в иммобилизованном состоянии колонизировать торфяные субстраты, а также рассмотрены преимущества при иммобилизации данного гриба в Са-альгинатном геле совместно с субстратом внутри гранулы.

Споры и вегетативные клетки грибов р. *Trichoderma* широко используются в технологиях защиты растений в открытом и защищённом грунте как средства борьбы и профилактики с грибными заболеваниями [3, 6, 11]. Препаративные формы на основе данных грибов имеют один существенный недостаток, а именно — низкий уровень стабильности при хранении, вследствие чего возникает необходимость в повышении дозы вносимого препарата либо увеличении кратности его внесения [4]. Рядом авторов показано, что применение методов механической иммобилизации в полисахаридных матрицах разной природы приводит к резкой стабилизации вегетативных клеток грибов при их хранении [2, 10]. Применение иммобилизованных клеток в качестве препаративной формы в технологиях защиты растений малоэффективно, так как выход клеток и колонизация торфов происходят крайне медленно (3—4 мес), что резко снижает технологичность и результативность их применения. Несмотря на то, что грибы р. *Trichoderma* являются сапрофитными микроорганизмами, скорость их роста на торфах крайне низка. Поэтому целью наших исследований была разработка новой препаративной формы на основе иммобилизованных клеток грибов *Trichoderma viride*, которая позволила бы улучшить качество работы данного микроорганизма в условиях за-

щищённого грунта. Для этого нами изучался процесс одновременной иммобилизации клеток *T. viride* и доступных для их роста и метаболизма субстратов в Са-альгинатных гранулах. Критерием оценки эффективности введения субстратов на стадии иммобилизации для данного вида препаратов мы приняли время начала выхода клеток из гранул, а также скорость колонизации сыпучих субстратов на основе верхового торфа с фракцией 1 мм.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования был выбран штамм *T. viride Pers ex F Gray* № 501, обладающий ярко выраженной фунгицидной активностью. Штамм поддерживали на агаризованной среде Чапека в пробирках в скошенном состоянии, пересев культуры осуществляли раз в 3 мес. Глубинное культивирование проводили в круглодонных колбах 250–750 мл с объемом питательной среды 50–100 мл на качалке (220 об/мин) при 28°C на средах Чапека. Иммобилизацию проводили в Са-альгинатном геле по стандартной методике [8], при этом добивались однородного размера гранул диаметром около 3 мм. На всех стадиях экспериментов осуществлялся микробиологический контроль с использованием препарата «раздавленная капля». Концентрацию крахмала в водных растворах определяли по стандартной методике [9].

Результаты и их обсуждение

При разработке метода одновременной иммобилизации микроорганизмов и субстрата нами была поставлена задача, которая, на первый взгляд, противоречит самому смыслу метода иммобилизации, а именно — удержанию клеток в объеме гранул. Внесение субстрата в гранулу позволяет интенсифицировать выход клеток из иммобилизованного состояния при внесении их в экосистему. Поэтому на первом этапе исследований нами был осуществлен подбор возможных субстратов, которые отвечали бы ряду требований, поставленных при исследовании: внесение субстрата на стадии иммобилизации не должно изменять физико-химических свойств гранулы, в первую очередь — механической прочности; субстрат не должен диффундировать из гранулы по градиенту концентрации, тем самым не способствовать развитию посторонней микрофлоры; субстрат должен быть метаболизируемым клетками *T. viride* внутри гранул.

Анализ возможных субстратов, метаболизируемых клетками *T. viride*, показал, что низкомолекулярные субстраты — сахара и спирты невозможно использовать в выбранной нами системе иммобилизации, так как скорость их диффузии из гранул в водных растворах будет достаточно высока. Среди высокомолекулярных субстратов можно выделить субстраты углеводной и белковой природы — различные полисахариды и белки. Наиболее оптимальным субстратом, который можно было бы использовать в данных целях, на наш взгляд, являлись крахмал и желатин или их сочетание в различных концентрациях. На первом этапе исследования мы изучали возможность одновременной иммобилизации *T. viride* и картофельного крахмала, который отвечал всем сформулированным нами требованиям. Для этого мы осуществили иммобилизацию крахмала в Са-альгинатном геле и проверили диффузию крахмала из гранул в

водных растворах. Полученные по стандартной методике гранулы с концентрацией крахмала 1% помещали в физиологический раствор концентрации 10 мг гранул на 100 мл физиологического раствора и перемешивали в магнитной мешалке в течение 4—5 ч. Через каждые 30 мин отбирали пробы физиологического раствора и анализировали в нем концентрацию крахмала (рис. 1).

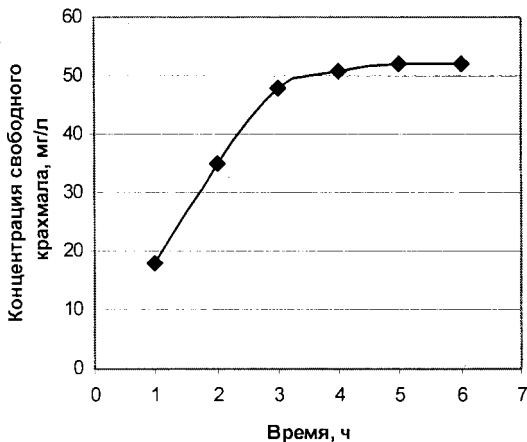


Рис. 1. Изменение концентрации крахмала во времени

Как видно из рис. 1, часть крахмала, находящегося первоначально в гранулах, выходит из них, достигая максимальной концентрации к 3-му часу. Дальнейшее изменение концентрации не наблюдалось. Расчет количества крахмала, вышедшего в свободное состояние, произведенный на основе концентрации крахмала и объема физиологического раствора показал, что лишь 5-7% крахмала от внесенного в гранулы переходит в водный раствор. Следовательно, остальной крахмал, иммобилизованный в Са-альгинатном геле, находится внутри гранул и не диффундирует из них. Таким образом, было доказано, что диффузия крахмала после его иммобилизации в Са-альгинатном геле, крайне затруднена и по всей видимости, обусловлена только тем количеством крахмала, находящегося в приграничном слое.

Отсутствие диффузии крахмала по альгинатной матрице поставило перед нами еще одну задачу: способны ли клетки *T. viride* метаболизировать крахмал, локализованный внутри альгинатной матрицы. Для проверки этого нами были поставлены эксперименты по одновременной иммобилизации крахмала и клеток *T. viride*, взятых из экспоненциальной фазы культивирования. Концентрация крахмала — 1%, концентрация клеток — 0,2%. В качестве метода оценки способности иммобилизованных клеток *T. viride* к росту использовали метод поверхностного культивирования на голодном агаре. Гранулы с иммобилизованными в них одновременно клетками и субстратом помещали на голодный агар и визуально контролировали рост колонии *T. viride* вокруг гранулы. В качестве контроля одновременно оценивали рост колонии вокруг гранул, полученных в аналогичных условиях, но не содержащих в гранулах крахмала. Результаты данного эксперимента следующие: вокруг гранулы, содержащей крахмал, начался рост колонии *T. viride* на 2-3-е сут и продолжался 7 сут, при этом колония занимала 40-50% чашки Петри, достигая диаметра 50 мм. Вокруг гранулы с клетками *T. viride*, не содержащими субстрат, рост начинался на 2-3-е сут и размер колонии не превышал 3-4 мм в диаметре. Данные результаты указывают на то, что клетки метаболизуют крахмал, находящийся внутри гранулы, за счет которого и осуществляется рост. Незначительный рост вокруг гранул, в которых отсутствовал крахмал, можно объяснить тем, что во время иммобилизации часть компонентов питательной среды переносится в гранулу вместе с клетками и метаболируются ими. Данный эксперимент не дает однозначного ответа на вопрос: за счет какого крахмала происходит рост клеток? В выбранном нами методе роста на агаризованных средах гранулы контактируют с поверхностью агара, а из агара в гранулу диффундируют мине-

ральные компоненты по градиенту концентрации, а крахмал, в свою очередь, может диффундировать в агар. Скорость диффузии крахмала при одновременной иммобилизации с клетками может отличаться от скорости диффузии, исследуемой нами ранее и рассмотренной выше, так как, безусловно, при росте клеток альгинатная матрица может частично разрушаться, меняя свои свойства. Это делает невозможным однозначную оценку того, какой именно крахмал метаболируется клетками: в гранулах или диффундировавший из гранул в агар. Несмотря на это, проведенные нами эксперименты показали, что клетки *T. viride* могут расти за счет субстрата, помещенного в гранулы.

Для более полной оценки способности клеток к выходу из иммобилизованного состояния и образованию колонии внутри гранулы нами был разработан метод оценки скорости роста клеток *T. viride* на сыпучих материалах с пониженным содержанием влаги. Для создания сыпучих сред использовали верховой торф Пельгорского месторождения, измельченный и фракционированный до размера 1 мм. Торф подвергали 2-кратной стерилизации и доводили до постоянной массы и влажности 13-18%. Стерильный торф с известной влажностью помещали в стерильные чашки Петри слоем 2 мм и насыщали стерильной водопроводной водой до влажности 50%. На подготовленный таким образом субстрат помещали исследуемые гранулы с иммобилизованными в них клетками и крахмалом и одновременно с иммобилизованными клетками без крахмала. В качестве контроля оценки роста использовали суспензию клеток *T. viride*, выращенную глубинным способом и взятую в середине экспоненциальной фазы развития. Количество клеток суспензии соответствовало расчетному количеству клеток, находящихся в гранулах. Чашки с испытуемыми образцами и контролем помещали в термостат при температуре 28°C и каж-

дые сутки проводили визуальный анализ роста. Визуальный анализ показал, что вокруг гранул с иммобилизованными клетками, а также вокруг лунки с суспензией клеток через несколько суток начинают образовываться четко различимые колонии правильной округлой формы с четко выраженным краем. Колонии имели белый цвет на фоне торфа. Скорость роста колоний во всех 3 случаях была различна. В литературе существует несколько методов оценки роста клеток в приповерхностном культивировании. Ряд авторов полагают, что линейная скорость роста колонии может считаться физиологической характеристикой данного микроорганизма. [1]. Однако линейная скорость роста не показывает увеличения концентрации клеток во времени. Мы считаем более правильным оценивать рост колонии по увеличению площади, занимаемой данной колонией. На наш взгляд, это возможно по двум причинам: в экспериментах во всех исследуемых вариантах колонии имели правильную округлую форму, что позволяло легко рассчитать их площади по диаметру колонии. Для доказательства равномерности распределения концентрации клеток по диаметру колонии нами проведены дополнительные исследования, суть которых заключалась в следующем: на разном удалении от центра колонии были отобраны пробы торфа, измерены влажная и сухая масса торфа и методом Коха с добавлением ПАВ определена концентрация клеток в отобранных образцах. Концентрация клеток, проанализированная нами по радиусу колонии, была приблизительно на одном уровне — 5×10^6 клеток/г торфа. Это позволило нам использовать в дальнейшем метод расчета удельной скорости роста колонии по изменению площади колонии (при постоянной толщине торфа). Данный метод оценки роста микроорганизмов наиболее широко используется в биотехнологии. На рис. 2 представлены графики изменения площади колонии *T. viride* при росте ее на торфах для

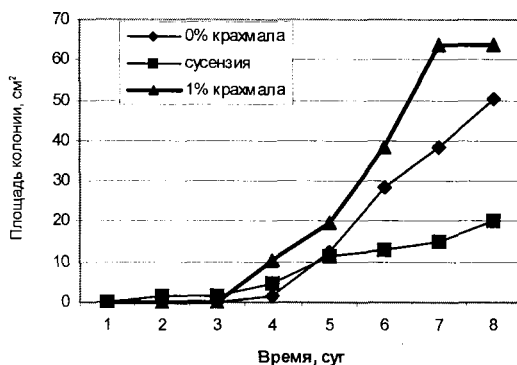


Рис. 2. Рост клеток *Trichoderma viride* из гранул с разной начальной концентрацией крахмала и из суспензии

клеток, иммобилизованных с крахмалом, клеток без крахмала и суспензии клеток.

Как видно из рис. 2, суспензия клеток, нанесенная на торф, способна образовывать колонию. Образование колонии также наблюдается и вокруг гранулы, не содержащей крахмал в качестве субстрата. Два этих факта позволяют предположить, что рост клеток из гранул, содержащих крахмал, обусловлен как за счет субстрата, локализованного в гранулах, так и за счет субстрата, находящегося в торфе. Кривые изменения площади колонии во времени, особенно в случае с клетками, вышедшими из гранулы с иммобилизованным крахмалом, имеют ярко выраженную s-образную форму. Такая форма кривой роста площади колонии позволяет рассчитать удельную скорость роста колонии. В таблице представлены расчетные скорости роста колоний для всех 3 исследуемых образцов и значения времени начала колонизации для разных вариантов.

Как видно из таблицы, удельная скорость роста клеток *Trichoderma viride* при применении иммобилизованных клеток с крахмалом максимальная. Важным показателем, отличающимся во всех трех экспериментах, является время начала колонизации торфов, т. е. время начала образования колонии. Для расчета времени на-

Скорость роста колоний *T. viride*

Форма	Скорость колонизации, сут ⁻¹ *	Время начала колонизации, сут	Максимальная поверхность колонизации на 8-е сут, %
Суспензия клеток	0,3 ± 0,06	0,5 ± 0,08	40 ± 10
Иммобилизованные клетки без субстрата	0,42 ± 0,08	3,5 ± 0,08	100 ± 10
Иммобилизованные клетки с субстратом	0,75 ± 0,08	2 ± 0,08	65 ± 10

* Доверительный интервал равен 95%.

чала колонизации мы использовали метод, применяемый для определения продолжительности лаг-фазы [7]. Как показывают данные таблицы, время начала колонизации для гранул с иммобилизованным внутри крахмалом меньше, чем время начала колонизации для гранул, не содержащих субстрат. Важным отличием, обнаруженным нами, является также максимальная степень колонизации, т. е. степень колонизации, при которой начинается образование спор. В данном случае следует понимать степень колонизации на 8-е сут проведения эксперимента. К данному моменту клетки, вышедшие из гранулы с крахмалом, полностью колонизировали все свободное пространство, а клетки, вышедшие из гранул без крахмала и из суспензии, колонизировали соответственно столько же (см. таблицу). Полученные нами результаты однозначно свидетельствуют о том, что крахмал, иммобилизованный одновременно с клетками в Са-альгинатном геле, придает данной системе новые свойства, не характерные для иммобилизованных систем.

Внесение метаболизируемого клетками субстрата на стадии иммобилизации позволяет рассматривать гранулу как источник клеток, выходящих в свободное состояние и колонизирующих вокруг себя пространство как за счет субстрата, локализованного в гранулах, так и за счет свободного суб-

страта, находящегося в колонизируемом пространстве. Таким образом, разработанная нами новая система иммобилизации клеток и субстрата для их роста в Са-альгинатном геле позволяет использовать гранулы в качестве постоянного источника образования новых клеток и поддержания стабильности при длительном сроке хранения [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Алимova Ф.К. *Trichoderma* / Нирогреа таксономия и распространение, Казань, Казанский государственный Университет, 2005. — 2. Бодей С.П., Броделиус П., Кабрал И.М. и др. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы. М.: Мир, 1988. — 3. ВНИИБЗР «Культивирование и применение грибов против вредителей», 1985. С. 48-56. — 4. Красноштанова А.А., Крылов И.А. и др. Основы биотехнологии. Учеб. пособие / Рос. хим.-техн. ун-т им. Д.И. Менделеева. М., 2001. — 5. Марквичев Н.С., Чекалова К.В., Алексеева. Возможность продления срока хранения и периода активности биопрепаратов. О.Б. Гавриш, 2006. — 6. Павлюшин В.А., Новикова Н.Н., Бойкова И.В. и др. Новые препараты для комплексной защиты растений от болезней разной этиологии // Докл. Российской Академии с.-х. наук, 2004. № 6. С. 17-21. — 7. Перт. С. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. — 8. Скрябин Г.К., Коцеевко К.А. Иммобилизованные клетки микроорганизмов // Биотехнология. М.: Наука, 1984. — 9. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. М.: Мир, 1991. — 10. Jirko V., Vojtisek V. et al. // Biotechnological letters. Vol. 6. № 6. P. 363-368. — 11. Compant S., Brion Duffy et al. // Applied and environmental Microbiology. Sept, 2005. P. 4951-4959.

SUMMARY

The ability of various preparative forms of bio-preparations based on fungi — *Trichoderma viride* — to colonize peat substratum has been analyzed. Advantages of immobilization of the fungi in Ca-alginate gels with substratum inside the granule were considered.