

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ВСЕРОССИЙСКИЙ ИНСТИТУТ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

ISSN 1727-1320

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

3

Санкт-Петербург - Пушкин
2012

УДК 632.937.14/.15

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АРАБИНОГАЛАКТАНА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВЫСШИХ ГРИБОВ И МИКРООРГАНИЗМОВ - ПРОДУЦЕНТОВ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Г.В. Митина*, С.В. Сокорнова*, Л.Г. Махотина**, А.Г. Кузнецов**, Э.Л. Аким**

*Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург,

**Санкт-Петербургский государственный технологический университет
растительных полимеров

Показана перспективность использования арабиногалактана (АГ) в качестве источника углерода при выращивании микромицетов и инокулюма высших грибов на агаризованных средах. Скорость роста фитопатогенных микромицетов на среде с АГ была на уровне и выше скорости роста этих грибов на стандартных средах. Использование АГ в качестве источника углерода в два раза увеличивало скорость роста мицелия вешенки. Добавка АГ стимулировала рост бактерий-антагонистов *Bacillus subtilis* при культивировании на агаризованной среде.

Ключевые слова: арабиногалактан, микробиологический метод защиты растений, биоконверсия, культивирование мицелиальных грибов и бактерий.

Интерес к биологическим средствам защиты растений, направленным на контроль численности насекомых вредителей, сорных растений и болезней, как к наиболее экологически безопасным, неизменно растет. Уже в начале 1990-х гг. препараты на основе бактерий *B. thuringiensis* занимали 1-2% от мирового производства инсектицидов (Baum et al., 1999). Результатом активных исследований последних десятилетий стали препараты на основе микроскопических грибов: 107 наименований микоинсектицидов и микоакарицидов, 79 микофунгицидов и миконематицидов и 15 микогербицидов (Faria, Wraight, 2007; Jackson et al., 2010).

В то же время успешное использование микробиологических средств защиты растений требует поиска новых недорогих субстратов для культивирования микроорганизмов. Известно, что мицелиальные грибы и бактерии способны к усвоению сложных источников углеводов, содержащихся в растительных остатках, участвуя в их биоконверсии. С другой стороны, использование отходов переработки древесины приобретает важное экономическое и экологическое значение. Лиственница является самой распространенной древесной породой в лесосырьевой базе Российской Федерации. На ее долю приходится 51,2% площади хвойных лесов и около 43% всех

запасов хвойной древесины (Лисицкий, 1967). В то же время древесина лиственницы отличается от других хвойных пород высоким содержанием водорастворимых веществ, что ограничивает ее использование в целлюлозно-бумажной промышленности. Среди них около 10-12% от веса древесины, а в некоторых образцах до 30%, составляет гидрофильный полисахарид арабиногалактан (АГ) (Антоновский, 1971), обладающий клеящими и другими ценными свойствами, позволяющими использовать АГ в пищевой промышленности и в медицине. Для комплексного использования лиственницы необходимо всестороннее изучение свойств арабиногалактана и других водорастворимых веществ.

Способность высших грибов к активному разложению лигноцеллюлозного комплекса недостаточно широко используется в биоконверсии растительных отходов. Так, в роде *Pleurotus* имеются виды, активно разрушающие древесину хвойных пород, что особенно ценно для утилизации отходов лесного хозяйства и деревообрабатывающей промышленности, а также термофильные виды. Вешенка устричная (*Pleurotus ostreatus*) является одним из самых удобных для выращивания грибом, широко культивируемым во многих странах на растительных остатках (Билай и др., 1991). В последнее

время благодаря уникальным целебным свойствам возрос интерес к культивированию другого съедобного гриба - шиитаке (*Lentinus edodes*) (Гарибова и др., 1999).

Поэтому целью данной работы стало изучение возможности использования АГ

в качестве источника углерода в питательных средах для культивирования микроорганизмов (фито- и энтомопатогенные мицелиальные грибы и бактерии) и инокуляма высших съедобных грибов (шиитаке, вешенка).

Методика исследований

В работе использованы типовые культуры микроскопических грибов, патогенов насекомых (*Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Metharizium anisopliae*, *Isaria farinose*), патогенов сорных растений (*Phomopsis* sp., *Phoma* sp., *Sclerotinium sclerotiorum*, *Fusarium* sp.), антагонистов возбудителей болезней растений (*Trichoderma viride*), бактерий-антагонистов (*B. subtilis*) и бактерий, патогенов насекомых (*B. thuringiensis*) из Государственной коллекции микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей (ВИЗР).

Культивирование микроскопических грибов проводилось на стандартной агаризованной среде Чапека, а также на среде Чапека с АГ, которая вместо сахарозы содержала АГ в концентрации 20 г/л. Стерилизация при 0.5 атм 30 мин. Гифомицеты выращивали в чашках Петри в течение 7-14 дней при температуре 24±2°C. Посев проводили блоком в центр чашки Петри 7-дневной посевной культуры диаметром 5 мм.

Бактерии *B. thuringiensis* и *B. subtilis* выращи-

вали на питательной среде следующего состава: пептон 20 г, хлорид натрия 4 г, агар 12 г. В качестве добавки вносили 15 г АГ, pH 7.3. Стерилизация при 0.5 атм 30 мин. Посев бактериальной суспензией с титром 5×10^6 спор/мл осуществляли в лунку диаметром 5 мм в центр чашки Петри с питательной средой. Бактерии выращивали в течение 7 дней при 26±2°C.

Высшие грибы *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (шиитаке) и *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P.Kumm. (вешенка) культивировали на агаризованной среде Чапека и среде Чапека с АГ. Скорость роста мицелия макромицетов на агаризованных средах определяли в течение 10 дней при 24±2°C. Посев проводили блоком в центр чашки Петри 7-дневной посевной культуры диаметром 5 мм.

Скорость роста на агаризованных питательных средах во всех случаях определяли по изменению диаметра колоний. Измерение проводили ежедневно, начиная с 3-х суток культивирования грибов.

Результаты исследований

Культивирование фитопатогенных грибов и гриба-антагониста *Trichoderma viride* на стандартной среде Чапека и среде Чапека, в которой сахароза заменена на АГ, показало, что все грибы проявили способность к росту и усвоению АГ (рис. 1).

Фитопатоген *Phomopsis* sp. достоверно лучше рос на среде с АГ по сравнению со стандартной средой. Скорость роста на среде с АГ составила 6.1 мм/сут, в то время как на стандартной среде - 3.0 мм/сут. Для видов *Fusarium* sp., *T. viride* и *S. sclerotiorum* не было выявлено достоверных различий между ростом на двух средах. Максимальная скорость радиального роста отмечена для *Fusarium* sp. - 7.5 мм/сут на обеих средах (рис. 2). При длительном выращивании *Phomopsis* sp. (более 9 суток) колонии достигали одного размера на обеих средах, что объясняется замедлением роста в связи с уменьшением питательных веществ в среде.

S. sclerotiorum рос медленнее на АГ,

мицелий был менее обильный (рис. 1). На двух типах сред склероции образовывались одновременно на 6-е сутки. Но на стандартной среде кольцевая зона мицелия и склероции на ней образовывались при достижении мицелием края чашки Петри. При выращивании на твердой среде Чапека с АГ склероции образовывались на расстоянии 3-4 см от центра колонии и по периферии чашки. Обычно размеры и форма склероциев варьируют в зависимости от условий культивирования (Aytkhozhnina, Kolokolova, 2001) и начало их образования может инициироваться контактом с механическим барьером (Willets, Wong, 1980). Возможно, добавка АГ и недостаток сахара стимулировали образование склероциев.

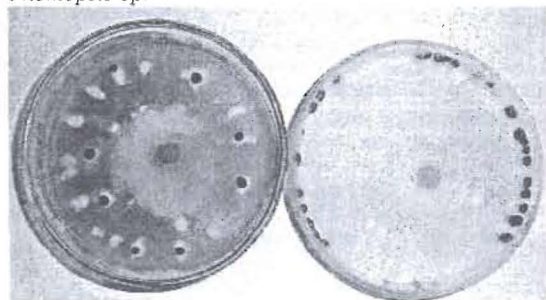
Предварительное изучение роста (посев штрихом) энтомопатогенных грибов на агаризованных средах показало, что они очень плохо растут на среде Чапека, в которой сахароза заменена на АГ, за исключением вида

Isaria farinosa, показавшего слабый рост на среде с АГ. Несмотря на то что энтомопатогенные грибы способны к усвоению хитина и сложных источников

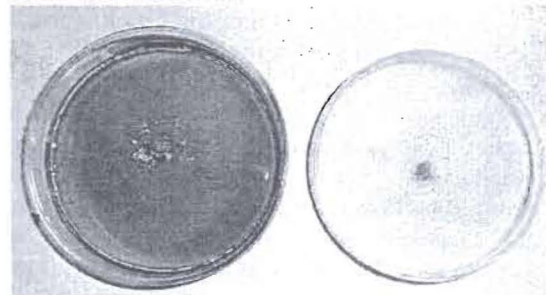
углерода, возможно, они требуют присутствия дополнительных источников для инициации роста или более высокой концентрации АГ.



Phomopsis sp.



Sclerotinia sclerotiorum



Trichoderma viride

Рис. 1. Рост микромицетов на агаризованных средах с АГ (слева) и сахарозой (справа) в качестве источника углерода

Высшие грибы на агаризованных средах выращивали в тех же условиях, что и микромицеты. С первых суток культивирования вешенка росла значительно быстрее на среде с АГ. Диаметр колоний был больше почти в 2 раза. Шии-также вначале рос немного медленнее на среде с АГ, а начиная с 7 суток скорость роста на АГ стала

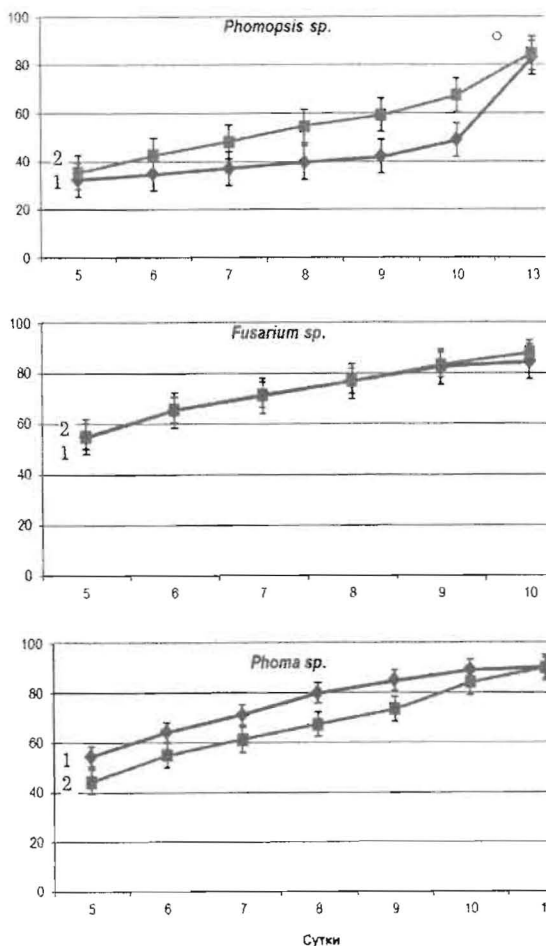


Рис. 2. Скорость радиального роста микромицетов на агаризованных средах, диаметр колонии, мм. 1 - Чапек, 2 - Чапек+АГ

выше, чем на стандартной среде (рис. 3, 4).

Развитие воздушного мицелия макромицетов было более обильным на среде с АГ по сравнению со стандартной средой (рис. 3, сверху). В процессе дальнейшего культивирования наблюдалось образование плодовых тел грибов на обеих средах.

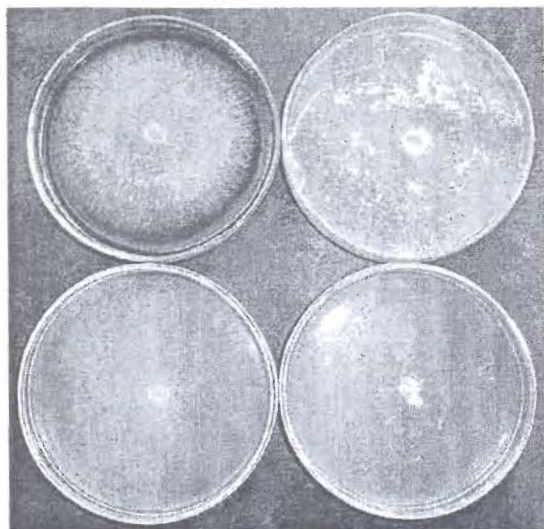


Рис. 3. Вид колоний макромицетов на агаризованных средах шии-таке *L.edodes* (слева) и вешенка *P. ostreatus* (справа) (среда Чапека с сахарозой снизу, Чапека с АГ сверху)

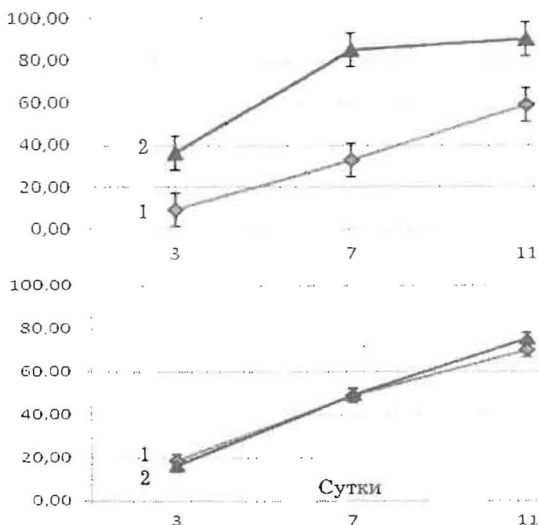


Рис. 4. Скорость радиального роста макромицетов на агаризованных средах вешенка *P. ostreatus* (сверху) и шии-таке *L.edodes* (снизу)

Отмечен более быстрый рост бактерий *B. subtilis* на среде с АГ по сравнению со стандартной средой с пептоном на 3-и, 5-е

и 7-е сутки. Для *B. thuringiensis* достоверных различий в росте не обнаружено (рис. 5, 6).

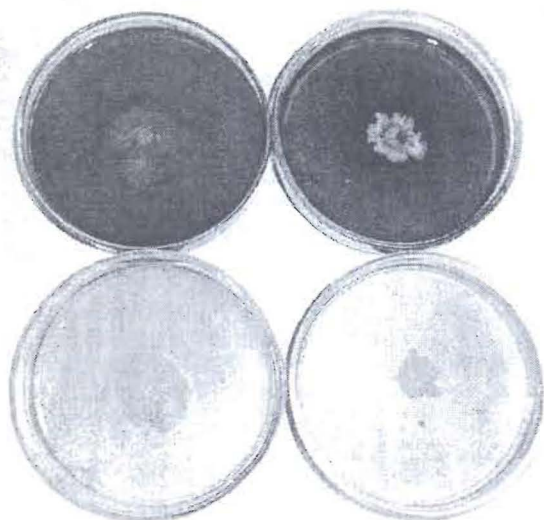


Рис. 5. Вид колоний бактерий *B. thuringiensis* (слева) и *B. subtilis* (справа) на агаризованных средах (среда с АГ наверху, среда без АГ внизу) на 3-и и 5-е

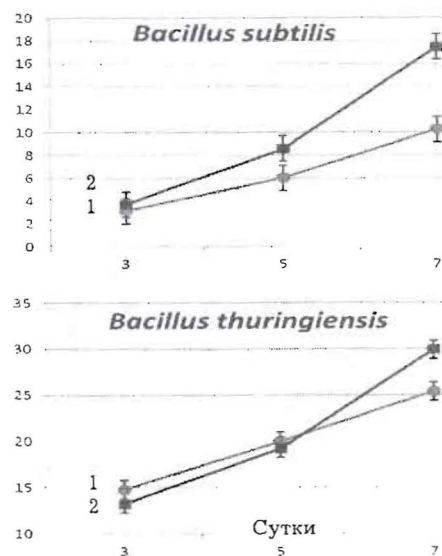


Рис. 6. Скорость радиального роста бактерий (прирост, мм) на среде 1- без АГ и 2- с АГ

В результате работы было установлено, что арабиногалактан используется фитопатогенными грибами (*Phomopsis* sp., *Fusarium* sp., *Trihoderma viride*, *Phoma* sp. и *Sclerotinia sclerotiorum*) в качестве единственного источника углерода на агаризованных средах.

АГ может быть использован высшими грибами (шии-таке, вешенка) при получении посевного материала. Добавка АГ стимулировала рост мицелия

вешенки на агаризованной среде Чапека и не оказывала существенного влияния на рост мицелия шии-таке, причем начиная с 7 суток скорость роста на АГ была выше, чем на стандартной среде. Кроме того, внесение в среду АГ стимулировало рост бактерий-антагонистов *B. subtilis* при культивировании на агаризованной среде.

В дальнейшем необходимо изучить возможность использования арабиногалактана в промышленных субстратах.

Литература

- Антоновский С.Д., Кулакова В.Н., Чочиева А.Ф. Получение и переработка водорастворимых гемицеллюлоз древесины лиственницы // Химия древесины, 1971, 8, с.147-153.
- Лисицкий К.Б. Лес - национальное богатство советского народа. М., 1967, с. 30.
- Гарибова Л.В., Завьялова Л.А., Александрова Е.А., Никитина В.Е. Биология *Lentinus edodes*. 1. Морфолого-культуральные и физиолого-биохимические особенности // Микология и фитопатология, 1999, 33, 2, с. 107-110.
- Билай В.Т., Бисько Н.А., Володина Е.П., Дудка И.А. Разработка научных основ поверхностного культивирования грибов рода вешенка // Проблемы культивирования съедобных грибов в СССР. Пушино, 1991, с. 34-35.
- Aytkhozhnina N.A., Kolokolova N.K. Characteristics of Kazakhstan isolate of *Sclerotinium sclerotiorum*. Proc. of *Sclerotinia* // The XI Int. *Sclerotinia* workshop, 2001, p. 21- 22.
- Baum J.A., Johnson T.B., Carlton B.C. *B. thuringiensis*. Natural and recombinant bioinsecticide products // Biopesticides. Use and Delivery, Hall F.R. and Menn J.J., Eds., Humana Press, Totowa, NJ, 1999, p. 189-209.
- Faria M., Wraight S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types // Biological Control, 2007, 43, p. 237-256.
- Jackson M.A., Dunlap C.A., Jaronski S. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol // Biological Control. 2010, 55, 1, p. 129-145.
- Willetts H.J., Wong J.A.L. The biology of *Sclerotinium sclerotiorum*. *S.trifoliorum* and *S.minor* with emphasis on specific nomenclature // The Botanical review. 1980, 46, 2, p. 165.

Работа проводилась в рамках выполнения комплексного проекта "Разработка инновационной технологии комплексной переработки древесины лиственницы (с выводом на мировые рынки нового вида товарной целлюлозы)". Инициатором проекта «Лиственница» выступило ОАО «Группа «Илим» совместно с Санкт-Петербургским государственным технологическим университетом растительных полимеров. Проект осуществляется при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

THE PERSPECTIVES OF ARABINO GALAKTAN FOR CULTIVATION MICROBIOLOGICAL CONTROL AGENTS AND MUSHROOMS

G.V.Mitina, S.V.Sokornova, L.G.Mahotina, A.G.Kuznetsov, E.L.Akim

The possibility of using of arabinogalaktan (AG) as a carbon source for cultivation of microorganisms and inoculum of mushrooms on agar media is shown. The rate of growth of phytopathogenic micromycetes was equal or higher on the AG-media in comparing with the growth on the standard media. The rate of growth of mycelium of *Pleurotus ostreatus* was higher in two times on the AG-media. The growth of antagonists *Bacillus subtilis* was stimulated too by adding AG into agar media.

Keywords: arabinogalaktan, microbiological control, bioconversion, cultivation of micromycetes and bacteria.

Г.В.Митина, к.б.н., galmit@rambler.ru
С.В.Сокорнова, к.б.н., mymryk@gmail.com
Л.Г.Махотина, д.т.н., профессор, lusi_mahotina@mail.ru
А.Г.Кузнецов, аспирант, anton.kuznetsov@hotmail.com
Э.Л.Аким, д.т.н., профессор, akim-ed@mail.ru