

# БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

УДК 632.937.14:631.86

<https://doi.org/10.47612/0135-3705-2022-46-241-248>

**Д.В. Войтка<sup>1</sup>, М.В. Федорович<sup>1</sup>, И.И. Вага<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>РУП «Институт защиты растений», аг. Прилуки, Минский р-н

<sup>2</sup>ГНУ «Институт жилищно-коммунального хозяйства Национальной академии наук Беларуси», Минск

## ОТБОР ШТАММОВ ГРИБОВ РОДА *TRICHODERMA* ДЛЯ ИНТЕНСИФИКАЦИИ БИОКОНВЕРСИИ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ОРГАНИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ

Дата поступления статьи в редакцию: 13.05.2022

Рецензент: канд. с.-х. наук Бречко Е.В.

**Аннотация.** Проведен отбор штаммов сапротрофных грибов-антагонистов р. *Trichoderma* по показателям целлюлозолитической и антагонистической активности для отбора перспективных в качестве деструкторов при компостировании твердых целлюлозосодержащих коммунальных отходов для получения органического удобрения. Высокая целлюлозолитическая активность (64,89–68,98 %) установлена для штаммов *Trichoderma asperellum* D-11 (основа препарата биологического Фунгилекс, Ж) и *Trichoderma* sp. L-3 (компонент инокулянта микробиологического Ресойлер, Ж). Показатель ингибирования роста фитопатогенных и плесневых микромицетов достигал 92,5 %.

**Ключевые слова:** *Trichoderma*, штаммы, целлюлозолитическая активность, антагонистическая активность, биоконверсия, компостирование, целлюлозосодержащие субстраты.

**Введение.** Для решения проблемы переработки твердых коммунальных отходов и улучшения экологической обстановки в настоящее время во многих странах (Германия, Швейцария, Великобритания и др.) начали использовать такой метод переработки органических отходов как компостирование – биологическое обезвреживание сырой органической части отходов под действием аэробных микроорганизмов [9]. Так, в Великобритании тестируют «горячие» контейнеры для компостирования пищевых отходов, особенностью которых является

переработка практически любых пищевых отходов с образованием качественного компоста всего за 90 суток [10]. В России применяется метод компостирования с применением биопрепарата «Байкал ЭМ-1», содержащий консорциум микроорганизмов и позволяющий получить компост за 3 месяца [11].

В природе существует огромное количество микроорганизмов, активно разлагающих целлюлозу до более низкомолекулярных соединений. Представители целлюлолитических видов встречаются среди бактерий и микромицетов. Бактерии выполняют первичное разрушение органических веществ, и их обычно не добавляют в компост, учитывая их наличие практически во всех формах органического вещества и быстрое размножение при определенных условиях [12].

Способность многих грибов разлагать клетчатку и лигнин определяет их активное участие в разложении растительного опада. В данном аспекте более изучены представители грибов родов *Aspergillus*, *Coriolus*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Cladosporium*, *Alternaria* [13, 14]. Плесневые грибы, особенно представители рр. *Trichoderma*, развиваются в широком температурном диапазоне. Являясь индукторами окислительного брожения в ходе данного биохимического процесса, они образуют органические кислоты, способствующие разрушению древесины.

Управление процессом биоферментации отходов позволяет интенсифицировать минерализацию исходного субстрата, активизировать биосинтез новых соединений и улучшить питательные свойства конечных целевых продуктов. Отмечено, что добавление грибов рода *Trichoderma* ускоряет процесс разложения и улучшает качество биокомпоста [15].

Установлено, что инокуляция грибами *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, *T. spirale* и др., а затем проведенное в течение 30 суток вермикомпостирование, способствует значительному снижению содержания целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина в растительных отходах при биоконверсии компоста [16].

Проведены исследования по биodeградации пергаментных отходов с помощью штаммов грибов р. *Trichoderma*. При воздействии выделяемых данными грибами ферментов пергаментные отходы расщеплялись до глюкозы [17].

Таким образом, результаты научных исследований подтверждают внутривидовую гетерогенность, присущую большей части изучаемых грибов-деструкторов и обуславливают необходимость скрининга микроорганизмов по целевым свойствам. Учитывая передовой научно-технический опыт в технологиях биоконверсии непищевых целлюлозосодержащих отходов для получения высококачественного компоста, наиболее эффективным и перспективным приемом является инокуляция отходов микробиологическими агентами, в частности, грибами рода *Trichoderma*.

В связи с этим, целью работы являлся скрининг штаммов грибов р. *Trichoderma* для отбора перспективных в качестве деструкторов при компостировании твердых целлюлозосодержащих коммунальных отходов для получения органического удобрения.

**Материалы и методы проведения исследований.** Исследования проводили путем постановки специальных экспериментов в лаборатории микробиологического метода защиты растений от вредителей и болезней РУП «Институт защиты растений».

В работе использовали штаммы грибов рода *Trichoderma*: *T. sp.* L-3 и *T. sp.* L-6 (основа инокулянта микробиологического Ресойлер, Ж), *T. longibrachiatum* L-7, *T. asperellum* D-11 (основа препарата биологического Фунгилекс, Ж), *T. lignorum (viride)* T 13-82 (основа биопрепарата Триходермин-БЛ).

Для выявления наиболее активного штамма с целлюлозолитической активностью экспериментальные исследования проводили *in vitro*, используя методики Билай В.И. (1982) и Звягинцева Д.Г. (1991) [3, 4].

Оценку интенсивности процесса разрушения клетчатки осуществляли по убыли массы фильтра в процентах по формуле 1 и интерпретировали согласно шкале 1.

$$I = \frac{M_1 - M_2}{M_2} \times 100, \quad (1)$$

где  $I$  – интенсивность процесса разрушения клетчатки, %;  $M_1$  – масса фильтра до начала опыта, г;  $M_2$  – масса фильтра через 2 недели от начала опыта, после высушивания, г.

#### Оценочная шкала интенсивности разрушения клетчатки [4]

Убыль массы, (%)	Интенсивность разрушения клетчатки
Менее 10	Очень слабая
10–30	Слабая
30–50	Средняя
50–80	Сильная
Более 80	Очень сильная

Изучение антагонистического действия проводили в условиях *in vitro* методом встречных культур [5]. В качестве тест-культур использовали штаммы фитопатогенных и плесневых микроорганизмов pp. *Fusarium* Link, *Botrytis* P. Micheli ex Pers., *Penicillium* Link., *Aspergillus* P. Micheli ex Haller из коллекционного фонда и изолированные из целлюлозосодержащих твердых коммунальных отходов.

В качестве контроля использовали чистую культуру тест-объекта. Измеряли диаметр колоний тест-объекта в направлении, перпендикулярном черте, делящей чашку на две равные половины, высоту колонии

(в мм), плотность колонии по 3-балльной системе (1 – редкая, 2 – средняя, 3 – плотная), описывали морфологию колоний, окраску колоний и субстрата [6].

Для оценки антагонистической активности грибов рода *Trichoderma* по отношению к тест-объектам рассчитывали ростовой коэффициент (РК) и процент ингибирования роста [6–8].

Ростовой коэффициент (РК) вычисляли по формуле 2:

$$PK = \frac{d \times h \times g}{t}, \quad (2)$$

где РК – ростовой коэффициент;  $d$  – диаметр колонии, мм;  $h$  – высота колонии, мм;  $g$  – плотность колонии, балл;  $t$  – возраст колонии, сутки.

Ингибирование роста фитопатогена на учетные сутки культивирования определяли по формуле 3:

$$P = \frac{K - A}{K} \times 100, \quad (3)$$

где  $P$  – показатель ингибирования, %;  $K$  – диаметр колонии гриба в контроле, мм;  $A$  – диаметр колонии гриба в варианте, мм.

**Результаты исследований.** В результате сравнительной оценки целлюлозолитической активности штаммов *Trichoderma* sp. L-3, *Trichoderma* sp. L-6, *Trichoderma longibrachiatum* L-7, *Trichoderma asperellum* D-11, *T. lignorum (viride)* T 13-82 при их инокуляции в условиях *in vitro* на обеззоленном бумажном фильтре установлено, что изученные штаммы разлагали целлюлозосодержащий субстрат на 40,8 до 69,0 % (таблица 1).

**Таблица 1 – Влияние штаммов грибов рода *Trichoderma* на деструкцию целлюлозосодержащего субстрата (*in vitro*)**

Штаммы	Убыль массы, г	Убыль массы, %	Интенсивность разрушения клетчатки
<i>Trichoderma</i> sp. L-3	0,69	69,0	Сильная
<i>T. sp.</i> L-6	0,54	54,4	Сильная
<i>T. longibrachiatum</i> L-7	0,45	44,8	Средняя
<i>T. asperellum</i> D-11	0,65	64,9	Сильная
<i>T. lignorum (viride)</i> T 13-82	0,41	40,8	Средняя
Контроль	0,00	0,00	–
НСР <sub>05</sub>	0,028	–	–

Штаммы *T. longibrachiatum* L-7 и *T. viride* T 13-82 характеризовались средним уровнем разложения клетчатки – 44,8 и 40,8 % соответственно. Остальные штаммы обладали сильной интенсивностью разложения целлюлозы. Как наиболее активные целлюлозолитики из изученных отмечены штаммы *T. sp.* L-3 и *T. asperellum* D-11, которые разлагали до 69,0 % и 64,9 % целлюлозы соответственно.

Дальнейшие исследования подтвердили обоснованность выбора штаммов *T. sp. L-3* и *T. asperellum D-11* как оптимальных для разложения целлюлозосодержащих субстратов. Наибольшая убыль массы фильтра при культивировании в течение 96 часов в жидкой культуре штаммов грибов составила 60,8 % для штамма *T. sp. L-3* и 58,8 % для штамма *T. asperellum D-11* (таблица 2).

**Таблица 2 – Влияние штаммов грибов рода *Trichoderma* на деструкцию целлюлозосодержащего субстрата (культивирование в культуральной жидкости)**

Штаммы	Убыль массы, г	Убыль массы, %	Интенсивность разрушения клетчатки
<i>T. sp. L-3</i>	0,61	60,8	Сильная
<i>T. sp. L-6</i>	0,55	55,0	Сильная
<i>T. longibrachiatum L-7</i>	0,44	43,8	Средняя
<i>T. asperellum D-11</i>	0,59	58,8	Сильная
<i>T. viride</i> T 13-82	0,41	41,2	Средняя
НСП <sub>05</sub>	0,088	–	

Штамм *T. sp. L-6* разлагал целлюлозосодержащий субстрат с активностью 55,0 %.

Для исследований антагонистической активности штаммов-продуцентов биологических препаратов, перспективных для биоконерсии целлюлозосодержащих материалов, были отобраны микромицеты, являющиеся широко специализированными патогенами растений, а также наиболее часто встречающиеся при компостировании плесневые грибы, способные к синтезу токсинов, угнетающих рост растений. Элиминирование их в процессе компостирования является предпочтительным для повышения в процессе биодеструкции непищевых целлюлозосодержащих субстратов качества целевого продукта – органического удобрения.

На основании проведенной оценки антагонистической активности штаммов-продуцентов микробиологических препаратов по отношению к фитопатогенным и плесневым грибам установлено, что все микробиологические агенты сдерживали рост и развитие целевых объектов. В отношении *F. oxysporum* высоким ингибирующим эффектом обладали штаммы *T. viride* T 13-82, *T. sp. L-3*, *T. asperellum D-11* – ингибирование роста на 7-е сутки совместного культивирования составило 50,9–59,6 % (таблица 3).

В отношении возбудителя серой гнили – гриба *Botrytis cinerea* – и плесневого гриба р. *Penicillium* активное ингибирование роста (91,5–92,5 % и 30,0–42,2 % соответственно) было также характерно для штаммов *T. viride* T 13-82, *T. sp. L-3*, *T. asperellum D-11*. Рост плесневого гриба *A. niger* активнее сдерживал штамм *T. asperellum D-11* – ингибирование роста достигало 50,6 %.

Таким образом, на основании комплексной оценки целлюлозолитической и антагонистической активности в качестве перспективных микробиологических компонентов для включения в технологию биоконверсии непищевых целлюлозосодержащих отходов для получения органического удобрения перспективными являются штаммы грибов-антагонистов *T. sp. L-3* (компонент инокулянта микробиологического Ресойлер, Ж) и *T. asperellum D-11* (основа препарата биологического Фунгилекс, Ж).

**Таблица 3 – Антагонистическая активность штаммов грибов р. *Trichoderma* по отношению к фитопатогенным и плесневым грибам**

Вариант	Диаметр колонии на сутки, мм		Ингибирование роста на сутки, %		Ростовой коэффициент на 7-е сутки
	3-и	7-е	3-и	7-е	
<i>Fusarium oxysporum</i>					
Контроль	20,2	66,8	–	–	57,3
+ <i>T. sp. L-3</i>	19,7	29,2	2,5	56,4	16,7
+ <i>T. sp. L-6</i>	19,2	38,3	5,0	42,6	25,7
+ <i>T. asperellum D-11</i>	17,5	32,8	13,2	50,9	13,3
+ <i>T. viride</i> Т 13-82	18,5	27,0	8,3	59,6	7,7
HCP <sub>05</sub>	5,26	7,34	–	–	–
<i>Botrytis cinerea</i>					
Контроль	0	35,5	–	–	32,3
+ <i>T. sp. L-3</i>	0	3,0	0	91,5	0,4
+ <i>T. sp. L-6</i>	0	4,0	0	88,7	0,6
+ <i>T. asperellum D-11</i>	0	2,7	0	92,5	0,4
+ <i>T. viride</i> Т 13-82	0	2,7	0	92,5	0,4
HCP <sub>05</sub>	–	2,68	–	–	–
<i>Aspergillus niger</i>					
Контроль	38,2	90,0	–	–	77,1
+ <i>T. sp. L-3</i>	31,0	46,0	18,8	48,9	30,6
+ <i>T. sp. L-6</i>	34,7	47,3	9,2	47,4	40,6
+ <i>T. asperellum D-11</i>	34,0	44,5	10,9	50,6	25,4
+ <i>T. viride</i> Т 13-82	29,3	49,0	23,1	45,6	42,0
HCP <sub>05</sub>	3,66	9,04	–	–	–
<i>Penicillium sp.</i>					
Контроль	10,5	15,0	–	–	19,3
+ <i>T.sp. L-3</i>	6,7	8,7	36,5	42,2	7,4
+ <i>T. sp. L-6</i>	7,7	12,2	27,0	18,9	10,4
+ <i>T. asperellum D-11</i>	7,7	10,3	27,0	31,1	8,9
+ <i>T. viride</i> Т 13-82	7,0	10,5	33,3	30,0	9,0
HCP <sub>05</sub>	2,11	3,59	–	–	–

Работа выполнена в рамках мероприятия 7 «Разработать и внедрить технологию производства органического удобрения на основе органической части твердых коммунальных отходов и целлюлозосодержащих материалов» подпрограммы 4 «Обеспечение инновационного развития отрасли жилищно-коммунального хозяйства» Государственной программы «Научно-инновационная деятельность Национальной академии наук Беларуси».

**Заключение.** В результате исследований установлено, что изученные штаммы грибов рода *Trichoderma* обладают средней и сильной степенью интенсивности разложения целлюлозосодержащих субстратов. Наибольшая степень целлюлозолитической активности была характерна для штаммов *Trichoderma* sp. L-3 и *Trichoderma asperellum* D-11 – 68,98 и 64,89 % соответственно.

Все изученные антагонисты оказывают высокий ингибирующий эффект по отношению к фитопатогенным и плесневым микромицетам. Показатель ингибирования роста достигал 92,5 %.

Для включения в технологию биоконверсии непищевых целлюлозосодержащих отходов для получения органического удобрения отобраны штаммы грибов-антагонистов *Trichoderma* sp. L-3 (компонент инокулянта микробиологического Ресойлер, Ж) и *Trichoderma asperellum* D-11 (основа препарата биологического Фунгилекс, Ж).

#### Список литературы

1. Об изменении постановлений Совета Министров Республики Беларусь [Электронный ресурс]: постановление Совета Министров Респ. Беларусь, 28 июля 2017 г. № 567 // Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь. – Режим доступа: <https://pravo.by/document/?guid=3961&p0=C22000373>. – Дата доступа: 22.12.2020.
2. Сидоренко, О.Д. Биологические технологии утилизации отходов животноводства / О.Д. Сидоренко, Е.В. Черданцев. – М.: Изд-во МСХА, 2001. – 74 с.
3. Методы экспериментальной микологии: справочник / И. А. Дудка [и др.]; отв. ред. В. И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1982. – 429 с.
4. Звягинцев, Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Д. Г. Звягинцев. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. – 303 с.
5. Егоров, Н.С. Практикум по микробиологии / Н.С. Егоров. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 307 с.
6. Бухало, А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре: монография / А. С. Бухало; Акад. наук Укр. ССР, Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного. – Киев: Наук. думка, 1988. – 144 с.
7. Муромцев, Г.С. Метод наблюдения антагонистических (конкурентных) взаимоотношений микроорганизмов в почве / Г. С. Муромцев, Г. А. Глобус // Докл. ВАСХНИЛ. – 1980. – № 6. – С. 3–5.
8. Тарунина, Т.А. Методы оценки антагонистической активности штаммов *Trichoderma lignorum* Harz./ Т.А. Тарунина, Т.Ю. Маслова // Микология и фитопатология. – 1979. – Т. 13, № 6. – С. 511–516.
9. Хайдаршин, А.А. Создание вермиферм на базе студенческого городка уфимского государственного авиационного технического университета / А.А. Хайдаршин, А.А. Исмагилов, Э.В. Нафикова // Наука, образование, производство в решении экологических проблем (Экология-2020). – 2012. – С. 165.

10. Андриевская, А.В. Великобритании испытывают «горячий контейнер» для компостирования пищевых отходов. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://recyclemag.ru/news/velikobritanii-ispitivayut-goryachii-konteiner-kompostirovaniya-pischevih-othodov> – Дата доступа: 01.09.2020.
11. Зверева, А.С. Разработка рекомендаций по утилизации органических отходов в городских условиях с помощью ЭМ-технологий на примере северного района г.о. Электросталь / А.С. Зверева, О.В. Сидоренко // IV конкурс иссл. и проектных работ «Мегаполис XXI века – город для жизни». – Москва, 2020. – 26 с.
12. Сидоренко, О.Д. Переработка отходов целлюлозно-бумажной промышленности в органические удобрения / О. Д. Сидоренко // Материалы 3-го междунар. конгресса по управлению отходами. – М., 2003. – 142 с.
13. Lynd, L. R. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology / L. R. Lynd [et al.] // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2002. – Vol. 66, № 3. – P. 506–577.
14. Исследование роста микромицетов на различных источниках углеродного питания [Электронный ресурс]. – 2010. – Режим доступа: <https://topref.ru/referat/11547/7.html> – Дата доступа: 22.04.2022.
15. Yadava, S. Ecotechnology of compost from biodegradables inoculated by *Trichoderma* and its effects on growth of medicinal plant *Ocimum gratissimum* L. / S. Yadava, P. K. Sarangi, M. Das // *Annals of Plant Sciences*. – 2014. – Vol. 03 (2). – P. 610–613.
16. Singh, A. Composting of a crop residue through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting / A. Singh, S. Sharma // *Bioresource Technology*. – 2002. – P. 107–111.
17. Co-composting of organic fraction of municipal solid waste mixed with different bulking waste: Characterization of physicochemical parameters and microbial enzymatic dynamic / M. K. Awasthi [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2015. – Vol. 182. – P. 200–207.
18. Переработка целлюлозосодержащих отходов производства [Электронный ресурс]. – 2011. – Режим доступа: [https://otherreferats.allbest.ru/manufacture/00144394\\_0.html](https://otherreferats.allbest.ru/manufacture/00144394_0.html). Дата доступа: 29.04.2022.

**D.V. Voitka<sup>1</sup>, M.V. Fedorovich<sup>1</sup>, I.I. Vaga<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>RUE «Institute of plant protection», Priluki, Belarus

<sup>2</sup>SSI “Institute of housing and communal services of the National Academy of Sciences of Belarus” Minsk, Belarus

## SELECTION OF TRICHODERMA GENUS FUNGI STRAINS FOR INTENSIFICATION OF CELLULOSE-CONTAINING SUBSTRATES FOR ORGANIC FERTILIZER OBTAINING

**Annotation.** The selection of saprotrophic antagonist fungi strains of the *Trichoderma* genus by indicators of cellulolytic and antagonistic activity for the selection of promising destructors in the composting of solid cellulose-containing municipal waste to obtain organic fertilizer was carried out. High cellulolytic activity (64,89–68,98 %) was established for strains of *Trichoderma asperellum* D-11 (the basis of the biological preparation Fungilex, L) and *Trichoderma* sp. L-3 (the component of the microbiological inoculant Resoiler, L). The index of growth inhibition of phytopathogenic and mold micromycetes reached 92,5 %.

**Key words:** *Trichoderma*, strains, cellulolytic activity, antagonistic activity, bio-conversion, composting, cellulose-containing substrates.