

## Защита растений и иммунология

УДК 632:576.8:58.08

### ЭЛЕМЕНТЫ ЛАБОРАТОРНОГО РЕГЛАМЕНТА ПРОИЗВОДСТВА МИКРОБИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГРИБНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ В ПРЕПАРАТИВНОЙ ФОРМЕ «СМАЧИВАЮЩИЙСЯ ПОРОШОК»

**Л.В. Маслиенко,**  
доктор биологических наук  
**А.Х. Воронкова,**  
младший научный сотрудник

ФГБНУ ВНИИМК  
Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17  
Тел.: (861) 275-85-19  
E-mail: biometod@yandex.ru

*Для цитирования:* Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х. Элементы лабораторного регламента производства микробиопрепаратов на основе грибных штаммов-продуцентов в препаративной форме «смачивающийся порошок» // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2016. – Вып. 4 (168). – С. 100–107.

**Ключевые слова:** микробиопрепараты, штаммы, антагонисты, препаративные формы, лабораторный регламент.

Разработаны элементы лабораторного регламента производства микробиопрепаратов в препаративной форме «смачивающийся порошок» (СП) при поверхностном культивировании двух перспективных грибных штаммов-продуцентов ВИЗР 24 *Penicillium vermiculatum* Dang. и Pf-1 *Penicillium funiculosum* Thom. на жидких питательных средах. Определены оптимальные сроки поверхностного культивирования на жидкой питательной среде Рудакова: для штамма ВИЗР 24 – 15 суток, для штамма Pf-1 – 20 суток. Оптимальные объёмы посевной культуры по отношению к объёмам питательной среды составили: для штамма ВИЗР 24 – 2,0 %, для штамма Pf-1 – 4,0 %. Основное влияние на сохранение жизнеспособности спор при хранении лабораторных образцов микробиопрепарата на основе гриба ВИЗР 24 в препаративной форме СП имеет температурный фактор. При изначально высокой переменной температуре хранения контрольных образцов микробиопрепа-

рата титр СП через 6 и 12 месяцев снизился по сравнению с исходным на два и шесть порядков и составил  $10^8$ – $10^4$  КОЕ/г соответственно в обеих упаковках (бумажных пакетах и пластиковых банках). При постоянной высокой температуре хранения в термостате (+30 °С) титр в контроле снизился по сравнению с переменной температурой ещё на порядок и составил соответственно  $10^7$ – $10^3$  КОЕ/г в обеих упаковках. При постоянной температуре +25 °С титр СП в пакете сохранился через 6 месяцев высоким –  $10^9$  КОЕ/г. При постоянной низкой температуре (-18 °С) титр СП в пакетах снизился на порядок ( $10^9$  КОЕ/г), а в банках сохранился на исходном уровне ( $10^{10}$  КОЕ/г). Добавление резорцина (0,1 %), гумата натрия (0,5 %), гидрохинона (0,1 %) и угля активированного (0,5 %) сохранило титр СП через 6 и 12 месяцев при изначально высокой переменной температуре соответственно на один и два порядка выше контроля ( $10^9$ – $10^6$  КОЕ/г). При постоянной высокой и низкой температурах титр СП в этих вариантах сохранился на уровне контроля ( $10^7$ – $10^{9-10}$  КОЕ/г).

UDC 632:576.8:58.08

### Elements of laboratory regime of fungal biological preparations production in a form “wetable powder”.

**Maslienko L.V.**, doctor of biology  
**Voronkova A.Kh.**, junior researcher

FGBNU VNIIMK  
17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia  
Tel.: (861) 275-85-19  
E-mail: [biometod@yandex.ru](mailto:biometod@yandex.ru)

**Key words:** micrbiopreparations, strains, antagonists, preparation forms, laboratory regime.

The elements of laboratory regime of microbiopreparation production in a preparation form “wetable powder” at surface cultivation of two perspective fungal strains-producers VIZR 24 *Penicillium vermiculatum* Dang. and Pf-1 *Penicillium funiculosum* Thom. on liquid nutrients were developed. The optimal dates of surface cultivation on a liquid Rudakov’s nutrient were determined: for strain VIZR 24 – 15 days, for strain Pf-1 – 20 days. The optimal volumes of sowing culture in ratio to nutrient were: for strain VIZR 24 – 2.0%, for strain Pf-1 – 4.0%. Temperature is a main factor effecting the preservation of spore vitality at storage of laboratory samples of microbiopreparation on a base of fungus VIZR 24 in a preparation form “wetable powder”. At the initial high varying temperature of storage of the control samples of the microbiopreparation, titer of the wettable powder reduced in six and 12 months,

compared to the initial one, on two and six degrees, respectively, and became  $10^8$ – $10^4$  KFU per g in the both packages (paper bags and plastic jars). At the high temperature of storage in thermostat (+30 °C) the titer in control reduced another degree and became  $10^7$ – $10^3$  KFU per g, respectively, in both packages compared to the varying temperature. At the permanent temperature +25 °C titer of wettable powder in paper bag has kept high in six months –  $10^9$  KFU per g. At the permanent low temperature (-18 °C) titer of wettable powder in paper bags lowered on a degree ( $10^9$  KFU per g), and in jars has kept at the initial level ( $10^{10}$  KFU per g). Addition of resorcline (0.1%), sodium humate (0.5%), hydroquinone (0.1%) and absorbent carbon (0.5%) reserve titer of the wettable powder in six and 12 months at the initially high varying temperature on one and two degrees higher the control, respectively ( $10^9$ – $10^6$  KFU per g). at the permanent high and low temperatures the titer of the wettable powder in these variants has kept at the control level ( $10^7$ – $10^{9-10}$  KFU per g).

**Введение.** В современной экологической ситуации назрела крайняя необходимость биологизации сельскохозяйственного производства. Поэтому разработка биотехнологий получения и применения современных конкурентоспособных микробных препаратов для сельского хозяйства, позволяющих снизить отрицательные последствия применения пестицидов, становится первоочередной задачей социально-экономического развития государств.

Микромицеты, наряду с бактериями и вирусами, являются основной группой микроорганизмов, ограничивающих численность определённых видов растений, насекомых и возбудителей болезней сельскохозяйственных культур. Проблемы, связанные с разработкой коммерчески успешных микопестицидов, в основном биологические и технологические: мицелиальные грибы, как правило, не споруют при глубинном культивировании, плохо переносят процессы стабилизации, патогенность или антагонистические свойства грибов находятся в сильной зависимости от внешних условий. Для грибов-продуцентов более естественной

является твердофазная ферментация, с использованием разнообразных субстратов (органических или неорганических, с добавлением питательных веществ), с последующим высушиванием и размолотом органического субстрата или смывом спор с мицелием с неорганического и органического субстратов, с последующим смешиванием с наполнителем и высушиванием. Полученные этим способом споры грибов более выносливы к высушиванию и дольше сохраняют жизнеспособность [1]. Однако биоматериал, полученный в результате твердофазной ферментации на органическом субстрате с последующим его высушиванием и размолотом (порошок), мало пригоден для опрыскивания вегетирующих растений из-за забивания им отверстий распылителей. А биоматериал, полученный в результате жидкофазной или твердофазной ферментации грибов, с последующим отделением его от культуральной жидкости (паста) и твердого субстрата (жидкая культура), как правило, хранится недолго. Даже при пониженной температуре споры грибов при достаточной влажности способны к прорастанию, что ведет к их гибели при отсутствии питания. Поэтому многие биопестициды, полученные на малотоннажных производствах, применяются не позже нескольких недель после окончания ферментации. В связи с этим поиск препаративных форм микробиопрепаратов, исключающих все перечисленные недостатки является на сегодняшний день актуальным.

В лаборатории биометода ФГБНУ ВНИИМК многие годы ведутся исследования по разработке микробиологических средств защиты масличных и других сельскохозяйственных культур от болезней. Создана уникальная коллекция штаммов грибов и бактерий-продуцентов микробиопрепаратов – биофунгицидов. Разрабатываются технологии производства разных

препаративных форм микробиопрепаратов и технологии их применения [2].

В данной работе приведены результаты исследований по разработке элементов лабораторного регламента производства микробиопрепаратов в препаративной форме «смачивающийся порошок» (СП) при поверхностном культивировании перспективных грибных штаммов-продуцентов на жидких питательных средах.

**Материалы и методы.** Объектом исследований служили: штаммы грибов-антагонистов возбудителей болезней масличных культур из коллекции лаборатории биометода ВНИИМК – ВИЗР-24 *Penicillium vermiculatum* Dang. и Pf-1 *Penicillium funiculosum* Thom., лабораторные образцы микробиопрепаратов, изготовленные на их основе, стабилизаторы и фотопротекторы.

Для отработки элементов лабораторного регламента производства микробиопрепаратов нарабатывались лабораторные образцы в препаративной форме «смачивающийся порошок». Для этого штаммы-продуценты выращивали поверхностным способом на жидкой питательной среде Рудакова [3], в трёхлитровых стеклянных баллонах, с объёмом питательной среды 500 мл, при оптимальной температуре для каждого штамма. К выращенной биомассе гриба добавляли прилипатель, растекагель и наполнитель. Всё перемешивали, высушивали при комнатной температуре и размалывали на мельнице с охлаждением. Титр жизнеспособных единиц определяли микробиологическим способом, используя метод разведения [4]. Определение числа колониеобразующих единиц этим методом включает три этапа: приготовление разведений, посев на питательную среду в ЧП и подсчет выросших колоний. 1,0 г исследуемого порошка переносили в колбу с 99,0 мл стерильной воды и встряхивали на качалке 20 мин. Для приготовления разведений стерильную водопроводную воду разливали по 9,0 мл в стерильные сухие пробирки. Затем отбирали 1,0 мл суспензии и перено-

сили в пробирку с 9,0 мл стерильной воды. Полученное разведение тщательно перемешивали, несколько раз вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную суспензию клеток. Таким же образом готовили все последующие разведения. Высев исследуемой суспензии осуществляли поверхностным способом. Для этого по 0,1 мл из соответствующего разведения переносили в три стерильные ЧП на картофельно-глюкозный агар (КГА) и тщательно растирали шпателем. Колонии антагонистов подсчитывали через пять-семь суток инкубации. Количество колониеобразующих единиц в 1,0 г исследуемого порошка вычисляли по формуле (1):

$$T = \frac{a \cdot \times \cdot 10^n}{V}, \quad (1)$$

где  $T$  – количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1,0 г;

$a$  – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения;

$V$  – объем суспензии, взятый для посева;

$10^n$  – коэффициент разведения.

Для установления оптимальных сроков поверхностного культивирования штаммы выращивали в течение 10, 15 и 20 суток на жидкой среде Рудакова, в трёхлитровых стеклянных баллонах. После каждого срока культивирования определяли вес сырой массы мицелия со спорами, порошка и титр. Повторность 5-кратная.

Для определения оптимального объёма посевной культуры при поверхностном культивировании грибных штаммов к 500 мл питательной среды добавляли 10 и 20 мл (2,0 и 4,0 %) глубинной суточной культуры антагонистов. Повторность 5-кратная.

Дальнейшая отработка элементов технологии производства микробиопрепаратов проводилась на примере одного грибного штамма ВИЗР 24 *Penicillium vermiculatum*. Определяли сроки хранения лабораторных образцов микробиопрепарата в препаративной форме «смачиваю-

щийся порошок» в зависимости от упаковки, температуры хранения, стабилизаторов и фотопротекторов. Для этого грибной штамм поверхностно выращивали в течение 15 суток, изготавливали лабораторные образцы препарата и хранили в двух упаковках (банке с плотно закрытой крышкой и пакете из крафт-бумаги) при разных температурных условиях: переменной температуре в лаборатории (+20 – +31 °С), при постоянных температурах в термостате (+25 и +30 °С) и в холодильнике (-18 °С). Опыт при переменной температуре в лабораторных условиях был заложен в два срока: с изначально более высокой (+27...+31 °С) и более низкой температурой (+20...+31 °С). Опыт при постоянной температуре +25 °С был заложен только в пакете. Испытывали стабилизаторы: резорцин (0,1; 0,2 %), тиомочевину (0,05; 0,1 %), аскорбиновую кислоту (0,5; 1,0 %), бензоат натрия (0,1; 0,5 %), сульфат меди (0,05 %), гентамицин (0,015 %), гумат натрия (0,5; 2,0 %), гидрохинон (0,1; 0,2 %); фотопротекторы: мелассу (0,3; 0,5 %), уголь активированный (0,5; 1,0; 4,0 %), и двуокись титана (1,0; 10,0 %). Через 3, 6 и 12 месяцев хранения лабораторных образцов микробиопрепаратов определяли титр.

**Результаты и обсуждение.** Для грибных штаммов-продуцентов микробиопрепаратов ВИЗР 24 *Penicillium vermiculatum* и Pf-1 *Penicillium funiculosum*. установлен оптимальный срок поверхностного культивирования на жидкой питательной среде и объём посевной суспензии для максимального образования биомассы (табл. 1).

Для штамма ВИЗР 24 *Penicillium vermiculatum* оптимальный срок поверхностного культивирования составил 15 суток. Сырая мицелиальная биомасса через 15 и 20 суток культивирования составила примерно одинаковое количество – 24,9–26,7 и 25,0–25,2 г с одного трёхлитрового баллона (500 мл питательной среды), против 17,6 г при выращивании гриба в течение 10 суток. Масса СП соответствовала сырой мицелиальной биомассе и отмечена при сроках культивирования 15 и 20 суток – 10,3–11,4 и 10,5 г соответ-

ственно против 6,8–7,7 г через 10 суток выращивания гриба. Титр порошка не зависел от сроков культивирования штамма-продуцента и был одного порядка во всех вариантах выращивания ( $2,8 - 3,3 \times 10^{10}$  КОЕ/г).

Таблица 1

**Влияние срока поверхностного культивирования и объёма посевной суспензии грибных штаммов-продуцентов ВИЗР 24 *Penicillium vermiculatum* и Pf-1 *Penicillium funiculosum* на массу сырой мицелиальной биомассы, смачивающегося порошка и титр лабораторных образцов биопрепаратов**

г. Краснодар, ВНИИМК, 2015 г.

Вариант	Объём посевной суспензии, %	Срок культивирования, сутки								
		10			15			20		
		масса, г		Титр, КОЕ/г	масса, г		Титр, КОЕ/г	масса, г		Титр, КОЕ/г
		сырая	СП		сырая	СП		сырая	СП	
ВИЗР 24	2,0	17,6	7,7	$3,0 \times 10^{10}$	26,7	11,4	$2,7 \times 10^{10}$	25,0	10,5	$3,0 \times 10^{10}$
	4,0	17,6	6,8	$2,8 \times 10^{10}$	24,9	10,3	$3,2 \times 10^{10}$	25,2	10,5	$3,3 \times 10^{10}$
Pf-1	2,0	24,1	11,3	$4,8 \times 10^{10}$	24,5	11,5	$2,4 \times 10^{10}$	31,5	13,0	$2,0 \times 10^{10}$
	4,0	27,4	13,1	$2,1 \times 10^{10}$	27,9	12,9	$3,4 \times 10^{10}$	34,7	14,7	$2,7 \times 10^{10}$
НСР <sub>05</sub> */**	0,1/0,5				0,3/0,8			0,2/0,9		

Примечание: \* НСР<sub>05</sub> для штамма ВИЗР 24 *Penicillium vermiculatum*;

\*\* НСР<sub>05</sub> для штамма Pf-1 *Penicillium funiculosum* Thom.

Для медленнорастущего штамма Pf-1 *Penicillium funiculosum* оптимальный срок культивирования составил 20 суток. За этот период мицелиальная биомасса составила 31,5–34,7 г против 24,1–27,4 и 24,5–27,9 г при сроках выращивания 10 и 15 суток соответственно. Масса порошка так же, как и у штамма ВИЗР 24, соответствовала сырой мицелиальной массе и отмечена максимальной при сроке культивирования 20 суток (14,7 г). Титр порошка не зависел от сроков культивирования штамма-продуцента и был одного порядка во всех вариантах выращивания ( $2,0-4,8 \times 10^{10}$  КОЕ/г).

Установлен оптимальный объём посевной культуры грибных штаммов-продуцентов по отношению к объёму питательной среды. Для штамма ВИЗР 24

*Penicillium vermiculatum*, независимо от срока культивирования, сырая мицелиальная биомасса нарастала примерно одинаково, как при добавлении 2,0 %, так и 4,0 % посевной культуры (17,6–17,6 г; 26,7–24,9 г и 25,0–25,2 г – при сроках выращивания 10, 15 и 20 суток соответственно). Для штамма Pf-1 *Penicillium funiculosum* максимальная сырая мицелиальная биомасса нарастала с добавлением 4,0 % глубинной культуры. Так, в оптимальный срок культивирования (20 суток) при добавлении 4,0 % посевной культуры сырая мицелиальная масса составила 34,7 г против 31,5 г при добавлении 2,0 % суспензии антагониста.

Современный биопрепарат, в идеале, должен храниться не менее двух лет при +4 °С, около одного года – при 20–25 °С, три месяца – при 30 °С, несколько суток – при 40–50 °С [5]. Поэтому вопрос хранения биопестицида является первостепенным при разработке лабораторного и технологического регламента производства микробиопрепарата, особенно на основе гриба-продуцента.

Сроки хранения опытных образцов микробиопрепаратов в препаративной форме СП, в зависимости от упаковки, температуры и стабилизаторов, определяли для одного штамма гриба ВИЗР 24 *Penicillium vermiculatum* Dang.

Установлено, что лабораторные образцы грибного препарата на основе штамма ВИЗР 24 *Penicillium vermiculatum* Dang. в препаративной форме СП, полученные при поверхностном культивировании штамма-продуцента на жидкой питательной среде, образовывали в воде стойкую суспензию и имели высокий исходный титр ( $10^{10}$  КОЕ/г).

В первом сроке опыта переменная средняя температура в лабораторных условиях в течение первых двух месяцев (июль и август) была высокой (29,8 °С) и колебалась от 27 до 31 °С, а в третий месяц (сентябрь) температура снизилась и составила в среднем 25,7 °С. Через 3 месяца хранения СП в таких условиях в лаборатории и при постоянной высокой температуре в термостате (+30 °С) титр в контроле без добавок снизился по срав-

нению с исходным на два порядка и составил  $10^8$  КОЕ/г в обеих упаковках. При низкой постоянной температуре (-18 °С) титр СП в пакетах снизился на один порядок ( $10^9$  КОЕ/г), а в банках сохранился на исходном уровне ( $10^{10}$  КОЕ/г) (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние температуры, упаковки и стабилизаторов на титр лабораторных образцов микробиопрепарата на основе грибного штамма-продуцента ВИЗР 24 *Penicillium vermiculatum* через 3 месяца хранения**

г. Краснодар, ВНИИМК, 2015 г.

Вариант	Титр, КОЕ/г					
	+27...+31 °С		+30 °С		-18 °С	
	пакет	банка	пакет	банка	пакет	банка
Контроль	$4,5 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$6,3 \times 10^8$	$8,4 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{10}$
Резорцин, 0,1 %	$1,8 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$1,4 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^{10}$
То же, 0,2 %	$5,7 \times 10^9$	$8,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$	$7,3 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$	$1,1 \times 10^{10}$
Аскорбиновая кислота, 0,5 %	$1,5 \times 10^9$	$4,8 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$5,1 \times 10^8$	$1,9 \times 10^9$	$6,7 \times 10^9$
То же, 1,0 %	$2,1 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$
Тиомочевина, 0,05 %	$2,1 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$4,8 \times 10^7$	$1,5 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$
То же, 0,1 %	$1,1 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$3,1 \times 10^7$	$2,3 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$
Гентамицин, 0,015 %	$2,1 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$4,6 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{10}$
Гумат натрия, 0,5 %	$3,7 \times 10^9$	$3,7 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$4,8 \times 10^9$	$3,8 \times 10^9$	$5,9 \times 10^9$
То же, 2,0 %	$1,6 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$	$1,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^{10}$
Бензоат натрия, 0,1 %	$2,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$2,9 \times 10^9$
То же, 0,5 %	$1,0 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7$
Сульфат меди 0,005 %	$4,1 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$2,6 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$

Из испытанных стабилизаторов по сравнению с контролем добавление резорцина (0,1 %) и гумата натрия (2,0 %) сохранило титр СП в обеих упаковках при низкой температуре на исходном уровне ( $10^{10}$  КОЕ/г), а при переменной и высокой температуре – на порядок ниже ( $10^9$  КОЕ/г). Добавление сульфата меди и гентамицина не увеличивало жизнеспособности спор, титр СП во всех вариантах оставался на уровне контроля. Тогда как добавление бензоата натрия и аскорбиновой кислоты в высоких концентрациях подавляло жизнеспособность спор СП во всех вариантах ниже контроля – до  $10^7$  КОЕ/г. В варианте с тиомочевинной также происходило снижение титра при хранении в банках: при высокой и переменной

температуре – до  $10^7$  КОЕ/г, при низкой – до  $10^9$  КОЕ/г.

Во втором сроке опыта при высокой средней температуре первого месяца (август, 29,8 °С) во второй и третий месяцы хранения температура снизилась и составила в среднем 25,7 и 20,4 °С. Через три месяца хранения в таких условиях в контроле без добавок титр СП снизился на один порядок и составил  $10^9$  КОЕ/г, тогда как в термостате, при постоянной высокой температуре (+30 °С), титр снизился на два порядка и составил  $10^8$  КОЕ/г. При постоянной низкой температуре (-18 °С) титр в контроле сохранился в пакетах на уровне  $10^9$  КОЕ/г, а в банках – на уровне  $10^{10}$  КОЕ/г (табл. 3).

Таблица 3

**Влияние температуры, упаковки, стабилизаторов и фотопротекторов на титр лабораторных образцов микробиопрепарата на основе грибного штамма-продуцента ВИЗР 24 *Penicillium verticillatum* через 3 месяца хранения**

г. Краснодар, ВНИИМК, 2015 г.

Вариант	Титр, КОЕ/г					
	+20...+31 °С		+30 °С		-18 °С	
	пакет	банка	пакет	банка	пакет	банка
Контроль	$1,2 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	$2,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$3,4 \times 10^9$	$1,9 \times 10^{10}$
Гидрохинон, 0,1 %	$1,1 \times 10^9$	$1,0 \times 10^{10}$	$3,7 \times 10^9$	$3,4 \times 10^{10}$	$3,9 \times 10^9$	$1,4 \times 10^{10}$
То же, 0,2 %	$2,1 \times 10^9$	$4,6 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$5,2 \times 10^9$	$3,8 \times 10^9$	$6,6 \times 10^9$
Уголь активированный, 0,5 %	$1,0 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$	$3,2 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^{10}$
То же, 1,0 %	$5,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$5,5 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$
То же, 4,0 %	$3,8 \times 10^9$	$1,7 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^9$	$4,2 \times 10^9$	$4,4 \times 10^9$	$2,0 \times 10^{10}$
Двуокись титана, 1,0 %	$4,0 \times 10^9$	$5,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^9$	$4,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$3,9 \times 10^{10}$
То же, 10,0 %	$1,0 \times 10^9$	$4,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^9$	$2,5 \times 10^8$	$3,8 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^9$

По сравнению с контролем добавление гидрохинона в 0,1 % концентрации сохранило титр СП в банках при переменной температуре выше на порядок, а при постоянной высокой – на два порядка, что и составило  $10^{10}$  КОЕ/г. Тогда как в пакетах в этом варианте титр был выше контроля на порядок только при постоянной высокой температуре ( $10^9$  КОЕ/г). Добавление угля активированного во всех концентрациях сохранило титр СП в обеих упаковках на уровне  $10^{9-10}$  КОЕ/г, что было выше контроля при постоянной высокой температуре на порядок. Добавление

двуокиси титана в концентрациях 1,0 и 10,0 % сохранило титр СП при низкой температуре в обеих упаковках на уровне контроля –  $10^{9-10}$  КОЕ/г, а при переменной и высокой – на уровне  $10^9$  КОЕ/г и только в пакетах.

Через 6 месяцев хранения СП при переменной, изначально высокой (в течение первых двух месяцев) температуре в лабораторных условиях титр в контроле без добавок снизился на два порядка ( $10^8$  КОЕ/г), а при постоянной высокой температуре в термостате – на три порядка ( $10^7$  КОЕ/г). При постоянной низкой температуре титр СП сохранился высоким: в пакетах –  $10^9$  КОЕ/г, в банках –  $10^{10}$  КОЕ/г (табл. 4).

Таблица 4

**Влияние температуры, упаковки и стабилизаторов на титр лабораторных образцов микробиопрепарата на основе грибного штамма-продуцента ВИЗР 24 *Penicillium verticillatum* через 6 месяцев хранения**

г. Краснодар, ВНИИМК, 2015–2016 гг.

Вариант	Титр, КОЕ/г					
	+23...+31 °С		+30 °С		-18 °С	
	пакет	банка	пакет	банка	пакет	банка
Контроль	$1,5 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$	$6,4 \times 10^9$	$1,5 \times 10^{10}$
Резорцин, 0,1 %	$1,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$6,9 \times 10^7$	$8,8 \times 10^7$	$8,4 \times 10^9$	$4,4 \times 10^{10}$
То же, 0,2 %	$3,7 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	$4,3 \times 10^7$	$6,3 \times 10^7$	$4,5 \times 10^9$	$1,1 \times 10^{10}$
Гумат натрия, 0,5 %	$1,8 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$6,4 \times 10^7$	$5,8 \times 10^7$	$6,8 \times 10^9$	$8,9 \times 10^9$
То же, 2,0 %	$1,6 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$	$4,0 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$	$4,1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{10}$

При добавлении резорцина (0,1 %) и гумата натрия (0,5 %) титр СП в условиях переменной температуры через 6 месяцев сохранился на порядок выше контроля ( $10^9$  КОЕ/г), тогда как при постоянной высокой температуре во всех вариантах он снизился до уровня контроля ( $10^7$  КОЕ/г). При постоянной низкой температуре титр СП во всех вариантах и в контроле сохранился высоким: в пакетах –  $10^9$  КОЕ/г с высоким основанием, а в банках –  $10^{9-10}$  КОЕ/г.

Во втором сроке опыта, в более мягких переменных температурных условиях (с изначально высокой температурой в течение первого месяца), через 6 месяцев хранения контрольных образцов титр СП сохранился на уровне контроля более жёсткого первого срока: при переменной температуре –  $10^8$  КОЕ/г, при высокой –  $10^7$  КОЕ/г, при низкой –  $10^{9-10}$  КОЕ/г (табл. 5).

Таблица 5

**Влияние температуры, упаковки, стабилизатора и фотопротектора на титр лабораторных образцов микробиопрепарата на основе грибного штамма-продуцента ВИЗР 24 *Penicillium vermiculatum* через 6 месяцев хранения**

г. Краснодар, ВНИИМК, 2015–2016 гг.

Вариант	Титр, КОЕ/г					
	+17...+31 °С		+30 °С		-18 °С	
	пакет	банка	пакет	банка	пакет	банка
Контроль	$2,2 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$2,4 \times 10^9$	$2,9 \times 10^{10}$
Гидрохинон, 0,1 %	$1,1 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$8,7 \times 10^7$	$8,4 \times 10^7$	$2,8 \times 10^9$	$1,0 \times 10^{10}$
То же, 0,2 %	$6,1 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$	$5,2 \times 10^7$	$3,8 \times 10^9$	$6,6 \times 10^9$
Уголь активированный, 0,5 %	$1,0 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$	$3,2 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{10}$
То же, 1,0 %	$1,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,3 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$5,5 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$
То же, 4,0 %	$1,8 \times 10^9$	$1,7 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$4,4 \times 10^9$	$2,0 \times 10^{10}$

Добавление гидрохинона (0,1 %) и угля активированного во всех концентрациях (0,5; 1,0; 4,0 %) при переменной температуре, не зависимо от упаковки, сохранило титр выше контроля на порядок ( $10^9$  КОЕ/г). При постоянной высокой и низкой температурах титр в этих вариантах сохранился на уровне контроля –  $10^7$  КОЕ/г и  $10^{9-10}$  КОЕ/г соответственно.

Через 12 месяцев хранения контрольного образца при переменной температуре двух сроков опыта (с изначально высокой температурой в течение двух и одного месяцев) титр СП снизился до  $10^4$  КОЕ/г, а при постоянной высокой тем-

пературе в термостате – до  $10^3$  КОЕ/г, в обеих упаковках. При постоянной низкой температуре титр СП в контроле через год сохранился высоким и составил в пакетах –  $10^9$  КОЕ/г с высоким основанием, в банках –  $10^{10}$  КОЕ/г.

При постоянной температуре +25 °С титр СП контрольного образца микробиопрепарата в пакете сохранился через 6 месяцев высоким –  $10^9$  КОЕ/г.

Добавление резорцина (0,1 %), гумата натрия (0,5 %), гидрохинона (0,1 %) и угля активированного (0,5 %) сохранило титр СП через год при изначально высокой переменной температуре на два порядка выше контроля ( $10^6$  КОЕ/г). При постоянной высокой и низкой температурах титр СП в этих вариантах сохранился на уровне контроля.

**Выводы.** 1. Оптимальный срок поверхностного культивирования на жидкой питательной среде Рудакова для штамма ВИЗР 24 *Penicillium vermiculatum* составил 15 суток, а для штамма Pf-1 *Penicillium funiculosum* – 20 суток.

2. Оптимальный объём посевной культуры по отношению к объёму питательной среды при поверхностном культивировании для штамма ВИЗР 24 *Penicillium vermiculatum* составил 2,0 %, а для штамма Pf-1 *Penicillium funiculosum* – 4,0 %.

3. Основное влияние на сохранение жизнеспособности спор при хранении лабораторных образцов микробиопрепарата на основе гриба ВИЗР 24 *Penicillium vermiculatum* в препаративной форме СП имеет температурный фактор.

4. При изначально высокой переменной температуре хранения контрольных образцов микробиопрепарата титр СП через 6 месяцев снизился по сравнению с исходным на два порядка, а через 12 ме-

сяцев – на шесть порядков и составил  $10^8$ – $10^4$  КОЕ/г соответственно в обеих упаковках.

5. При постоянной высокой температуре хранения в термостате (+30 °С) титр СП контрольного образца микробиопрепарата снизился по сравнению с исходным через 6 месяцев на три порядка, а через 12 месяцев – на семь порядков и составил соответственно  $10^7$ – $10^3$  КОЕ/г в обеих упаковках.

6. При постоянной температуре +25 °С титр СП контрольного образца микробиопрепарата в пакете сохранился через 6 месяцев высоким –  $10^9$  КОЕ/г.

7. При постоянной низкой температуре (-18 °С) титр СП контрольного образца микробиопрепарата через 6 и 12 месяцев хранения в пакетах снизился на порядок ( $10^9$  КОЕ/г), а в банках сохранился на исходном уровне ( $10^{10}$  КОЕ/г).

8. Добавление резорцина (0,1 %), гумата натрия (0,5 %), гидрохинона (0,1 %) и угля активированного (0,5 %) сохранило титр СП через 6 и 12 месяцев при переменной, изначально высокой температуре соответственно на один и два порядка выше контроля ( $10^9$ – $10^6$  КОЕ/г соответственно). При постоянной высокой и низкой температурах титр СП в этих вариантах сохранился на уровне контроля ( $10^7$ – $10^{9-10}$  КОЕ/г).

#### Список литературы

1. Берестецкий А.О., Сокорнова С.В. Получение и хранение биопестицидов на основе микромицетов // Микология и фитопатология. – 2009. – Т. 43. – Вып. 6 – С. 473–489.

2. Маслиенко Л.В. Обоснование и разработка микробиологического метода борьбы с болезнями подсолнечника: дис. ... докт. биол. наук / Любовь Васильевна Маслиенко. – Краснодар, 2005. – 377 с.

3. Рудаков О.Л. Микофильные грибы, их биология и практическое значение. – М.: Наука, 1981. – 160 с.

4. Егоров Н.С. Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1957. – 78 с.

5. Wraight S.P., Jackson M.A., S.L. de Kock. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents / Eds.: T.M. Butt [et al.] // Fungi as Biocontrol Agents. – New York: CAB International, 2001. – P. 253–287.

#### References

1. Berestetskiy A.O., Sokornova S.V. Poluchenie i khranenie biopetsitsidov na osnove mikromitsetov // Mikologiya i fitopatologiya. – 2009. – T. 43. – Vyp. 6 – S. 473–489.

2. Maslienko L. V. Obosnovanie i razrabotka mikrobiologicheskogo metoda bor'by s boleznyami podsolnechnika: dis. ... dokt. biol. nauk / Lyubov' Vasil'evna Maslienko. – Krasnodar, 2005. – 377 s.

3. Rudakov O.L. Mikofil'nye griby, ikh biologiya i prakticheskoe znachenie. – M.: Nauka, 1981. – 160 s.

4. Egorov N.S. Vydelenie mikrobov-antagonistov i biologicheskie metody ucheta ikh antibioticheskoy aktivnosti. – M.: Izd-vo Mosk. un-ta, 1957. – 78 s.

5. Wraight S.P., Jackson M.A., S.L. de Kock. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents / Eds.: T.M. Butt [et al.] // Fungi as Biocontrol Agents. – New York: CAB International, 2001. – P. 253–287.