

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И МИКОЛОГИЯ / AGRICULTURAL MICROBIOLOGY AND MYCOLOGY

<https://doi.org/10.30766/2072-9081.2021.22.6.918-927>
УДК 632.937



Влияние состава питательных сред на продуктивность и биологическую активность штамма энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*

© 2021. И. Э. Шарапова ✉

Институт агробиотехнологий им. А. В. Журавского Коми НЦ УрО РАН,
г. Сыктывкар, Российская Федерация

Проведен анализ продуктивности и биологической активности штамма энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* F-145 при жидкофазном культивировании на различных питательных средах для получения биопестицидного препарата в нативной форме (исследования проведены в 2019 году). Для культивирования глубинным способом в качестве компонентов питательной среды использованы отходы молочного и пивного производства (молочная сыворотка и пивная барда) с добавлением дизельного топлива (ДТ) или Твин-80 в качестве индукторов биологической активности. Установлено, что продуктивность штамма на средах с промышленными отходами была выше в 1,5-2,0 раза, чем на среде Чапека. В 5-суточной суспензии на основе смеси сыворотки и барды отмечен высокий выход мицелиальной массы с титром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл. Определена биологическая активность культуральной суспензии штамма. Показано, что нематоцидная активность штамма *B. bassiana* в отношении нематод *Rhabditis* sp. в значительной степени проявлялась в суспензии, полученной на смешанной среде с добавлением индукторов. За 1-2 суток инкубации тест-организма гибель подвижной стадии нематод составила более 90 %. Сложный состав питательной среды, содержащей отходы и индукторы, способствовал сохранности биологической активности штамма. Установлена нематоцидная активность штамма на уровне 67-80 % с титром 10^6 - 10^7 КОЕ/мл при хранении суспензии в течение 67 суток.

Ключевые слова: культивирование, промышленные отходы, продуктивность, нематоцидная активность

Благодарности: работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках Государственного задания АААА-А19-119031390055-1.

Автор благодарит за помощь в работе сотрудника Института биологии Коми НЦ УрО РАН Алексея Александровича Кудрина.

Автор благодарит рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Конфликт интересов: автор подтверждает отсутствие конфликта интересов.

Для цитирования: Шарапова И. Э. Влияние состава питательных сред на продуктивность и биологическую активность штамма энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2021;22(6):918-927. DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2021.22.6.918-927>

Поступила: 06.09.2021 Принята к публикации: 22.11.2021 Опубликована онлайн: 15.12.2021

Influence of the composition of nutrient media on the productivity and biological activity of the strain of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*

© 2021. Irina E. Sharapova ✉

A. V. Zhuravsky Institute of Agro-Biotechnologies of Komi Science Center of the Ural
Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russian Federation

The productivity and biological activity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (F-145) strain during the liquid-phase cultivation on various substrates for developing a biopesticide in its native form was analyzed (the research was carried out in 2019). For submerged cultivation, by-products from dairy and beer production (milk whey and brewing spent grain liquor) were used as components of the nutrient medium with addition of diesel fuel (DF) and Tween-80 as inducers of biological activity. It has been established, that the productivity of the strain on industrial by-product substrates was 1.5-2 times higher than on the Czapek medium. A high yield of a mycelial biomass with a titer of 10^8 - 10^{10} CFU/ml was shown in a 5-day suspension based on a mixture of milk whey and brewing spent grain liquor. The biological activity of the culture suspension of the strain was determined. It was shown that the nematocidal activity of *Beauveria bassiana* strain with regard to nematodes of the *Rhabditis* sp. was largely manifested in a suspension obtained on a mixed medium with the addition of inducers. Ninety per cent death at mobile nematode stages was registered within one or two days of test-organism incubation.

A complex nutrient medium composition containing by-products and inducers contributed to the preservation of the biological activity of the strain. The strain nematicidal activity was established at the level of 67-80 per cent with a titer of 10^6 - 10^7 CFU/ml when the suspension was stored for 67 days.

Keywords: cultivation, industrial by-products, productivity, nematicidal activity

Acknowledgements: the research was carried out under the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the state assignment AAAA-A19-119031390055-1.

The author is grateful to the colleague from the Institute of Biology of Komi Science Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Alexei A. Kudrin, for his assistance.

The author thank the reviewers for their contribution to the expert evaluation of this work.

Conflict of interest: the author declares no conflict of interest.

For citations: Sharapova I. E. Influence of the composition of nutrient media on the productivity and biological activity of the strain of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka* = Agricultural Science Euro-North-East. 2021;22(6):918-927. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2021.22.6.918-927>

Received: 06.09.2021

Accepted for publication: 22.11.2021

Published online: 15.12.2021

Значительные потери производства урожая сельскохозяйственных культур в мире связаны с ущербом, который наносят вредители растений [1]. Использование микроорганизмов в качестве основы биопестицидных препаратов позволяет контролировать численность фитофагов, ограничивая вспышки размножения [2]. Преимуществами таких препаратов является то, что биопестициды оказывают значительно меньшее по сравнению с синтетическими пестицидами воздействие на нецелевые объекты, а также являются экологически безопасными [3, 4].

В число наиболее изучаемых агентов микробиологической борьбы с вредоносными насекомыми входят энтомопатогенные грибы *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. [5]. Инсектицидная активность этих мускардинных грибов действует на представителей отрядов Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Orthoptera и Acarina в различных фазах развития насекомого (личинки и имаго) [6]. Энтомопатогены связаны с насекомыми, как паразиты, за счет синтеза кутикуледеградирующих ферментов (протеазы, липазы, хитиназы), а также токсинов и метаболитов, отвечающих за контактную инсектицидную активность [6, 7]. Эффективность паразитирования характеризуется стратегией поражения насекомых-хозяев, а также разнообразием факторов вирулентности (степень токсигенности и секреции различных гидролитических ферментов) и в значительной степени зависит от видо- и штаммоспецифичности [8, 9]. Подобно большинству мускардинных энтомопатогенов *B. bassiana* инициирует заражение путем прорастания прикрепляющейся к кутикуле насекомого-хозяина споры или конидии, а также действия комплекса ферментов, которые составляют его инфективность [6]. Осуществлять инвазию эти грибы способны не только через кутикулу, но и через пищевой

тракт и дыхательные пути, размножаясь в гемолимфе, продуцируя гифальные тела или бластоспоры, которые приводят к микозу и гибели хозяина [6]. Ускорять гибель насекомого позволяет способность продуцировать вторичные метаболиты, включая токсины: боверицин, боверолиды, бассинолиды и другие [9, 10].

Представители энтомопатогенных грибов, в том числе *Beauveria bassiana*, обладают адаптивной способностью, которая обусловлена возможностью изменять в зависимости от условий среды качественный и количественный состав синтезируемого ими комплекса ферментов [11]. Специфика ферментных систем обеспечивает энтомопатогенным грибам не только паразитическую, но и сапротрофную жизнедеятельность [9, 11]. Для многих видов энтомопатогенных грибов средой обитания служат различные типы почв, а также характерно наличие комплекса лигно-целлюлозолитических ферментов, обеспечивающих деградацию растительных субстратов, что свидетельствует о широкой распространенности и потенциале биохимической активности [11, 12, 13, 14].

Препараты на основе энтомопатогенных грибов предназначены для подавления численности вредоносных насекомых в зависимости от видов используемых микромицетов, целевых объектов и среды их обитания [4]. Но практическое использование энтомопатогенных грибов связано с проблемой их массового размножения. Поэтому необходимо изучение факторов, обеспечивающих продуктивность и биологическую активность культуры на этапах технологического цикла, а также в процессе хранения для последующего применения.

Для наработки грибов в различных препаративных формах применяют методы жидкофазной или твердофазной ферментации. Твердофазный способ пригоден для производ-

ства грибных препаратов, так как хорошее спороношение грибов можно получить за счет увеличения спороносящей поверхности на твердом субстрате, в качестве которого зачастую используется зерно. Так, из микоинсектицидных биопрепаратов известны Вертициллин зерновой и Боверин зерновой-БЛ. Однако недостатком твердофазного способа является длительность процесса ферментации и сушки (до 14 суток). Наиболее распространенным способом массовой наработки энтомопатогенных грибов является жидкофазная ферментация. Жидкофазным способом получают нативную форму биопрепарата, представляющую собой суспензию в жидкой или концентрированной форме (Вертициллин, К, Боверин-концентрат, Ж). Биопрепараты на основе энтомопатогенных грибов в виде суспензии споровомицелиальной массы в культуральной жидкости являются наиболее перспективными для их наработки и последующего применения вследствие того, что на поверхности тела насекомого адгезия капель суспензии с компонентами питательной среды более эффективна, чем адгезия сухих спор [15]. Этот фактор позволяет ускорить прорастание спор (конидий) и развитие патологического процесса.

Одним из условий пригодности технологии получения биопрепарата для масштабирования является наличие доступного сырья. Таким относительно дешевым и доступным источником биологически активных веществ, пригодных в качестве основы питательной среды для культивирования микроорганизмов, является молочная сыворотка – побочный продукт, образующийся при переработке молока [16]. Молочная сыворотка содержит до 7 % сухих веществ (углеводы, белки, жиры, микроэлементы), что является хорошей питательной средой для развития микроорганизмов. Несмотря на питательную ценность, проблема переработки молочной сыворотки в настоящее время не решена, и значительная часть этого отхода производства сливается в канализацию [17]. Другим доступным источником для использования в качестве компонента питательной среды является пивная барда [18]. Барда – это отход, вызывающий загрязнение окружающей среды, но благодаря содержанию клетчатки, белка и микроэлементов, может служить вторичным сырьевым ресурсом. Производственные отходы, сбрасываемые в канализацию, приводят к ухудшению работы сооружений биологической очистки, тем

самым осложняют экологическую обстановку [19]. Возможность использования различных промышленных отходов для наработки биомассы микробной культуры с высокой биологической активностью для последующего применения изучена недостаточно.

Инсектицидные биопрепараты потенциально предназначены для биоконтроля насекомых-вредителей, которые повреждают в основном надземную часть растений. Инсектицидная активность штаммов *Beaveria bassiana* хорошо известна, и их использование в составе биопрепаратов против различных насекомых является доказанной практикой [20, 21]. Однако проведенными ранее исследованиями была обнаружена и нематоцидная активность у некоторых представителей *B. bassiana* [22]. Это подтверждает потенциал штаммов *B. Bassiana* в качестве средств биоконтроля в отношении почвообитающих вредителей растений – фитопаразитических нематод. В дальнейшем представляется интересным оценить биологическую активность нативной-суспензированной формы биопрепарата на основе штамма *B. bassiana* после длительного хранения.

Цель работы – оценить влияние состава питательной среды на продуктивность, а также сохранность биологической активности в образцах суспензированной формы биопрепарата на основе штамма *B. bassiana*.

Новизна исследований – представлен один из возможных способов длительного сохранения вирулентности и биологической активности исследуемого штамма, а также совершенствования технологии выращивания производственно ценных микроорганизмов с использованием различных доступных и дешевых компонентов питательной среды для получения полифункционального биопестицида.

Материал и методы. Исследования проведены в 2019 году. Объект исследований – штамм *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Все-российская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) F-145). Штамм на агаризованных средах Чапека и Сабуро образует выпуклые округлые колонии с хорошо развитым воздушным мицелием белого цвета.

Вид почвообитающих бактериотрофных нематод *Rhabditis sp.* семейства Rhabditidae использовали в качестве тест-организма, выбор которого для исследований обусловлен морфофизиологическими особенностями подвижной стадии развития нематод.

Для глубинного культивирования использовали побочные продукты и отходы пивного и молочного производства: молочную (творожную) сыворотку и пивную барду. Штамм выращивали на жидких питательных средах: среда Чапека, среда на основе молочной сыворотки, среда на основе пивной барды и среда на основе смеси сыворотки и барды (соотношение 1:1). Состав среды Чапека (г/л): NaNO_3 – 3; K_2HPO_4 – 1; MgSO_4 – 0,5; KCl – 0,5; FeSO_4 – 0,01; сахароза – 20. Состав пивной барды (мг/л): взвешенные вещества растительного происхождения (600), жиры (5), концентрация сахаров исходная (следы). Состав молочной сыворотки (ТУ 9229-110-04610209-2002 «Сыворотка молочная пастеризованная») (%): сухие вещества, в том числе остаточный молочный белок (7,2) и жиры (0,4). В составе среды, где в качестве основы была пивная барда, дополнительным компонентом служила сахароза (20 г/л в соответствии с составом среды Чапека). В состав питательных сред, содержащих пивную барду или молочную сыворотку, или их смесь, в качестве индукторов вносили дизельное топливо (ДТ) – 0,05 % или Твин-80 – 0,5 %, а также добавляли (г/л): K_2HPO_4 – 0,2; KNO_3 – 0,2; MgSO_4 – 0,05; CaCO_3 – 0,05; NaCl – 0,05. Исходное значение рН питательных сред – $6,3 \pm 0,2$.

Образцы суспензии штамма *B. bassiana* нарабатывали глубинным культивированием на питательных средах различного состава. Для приготовления посевной культуры штамм выращивали на агаризованной среде Чапека в чашках Петри в течение 8 суток при 24 ± 1 °С. Агаровыми блоками (диаметр 8 мм), вырезанными из зоны роста колонии, осуществляли засев стерильных жидких сред в конических колбах ($n = 3$ по вариантам) объемом 250 мл, объем среды – 100 мл. Культивирование проводили на шейкере (180 об./мин; 25 ± 2 °С) в течение 5 суток. Для определения продуктивности (наличие некоторых ферментов, титр и биомасса) и для исследований биологической активности культуры *B. bassiana* стерильно отбирались пробы.

В образцах суспензии штамма тестированием по реакции на перекись водорода (10 %) определена каталазная активность¹. Определение способности штамма к деградации

целлюлозы проводили путем выращивания на агаризованной минеральной среде с добавлением 0,1 % карбоксиметилцеллюлозы внесением 0,1 мл исследуемого образца суспензии. После инкубирования чашку заливали 0,1%-ным раствором Конго красного, после удаления красителя заливали 1М раствором NaCl . Чашки просматривали и отмечали наличие зон просветления, их диаметр, отношение диаметра зоны просветления к диаметру колонии².

Биологическую активность образцов суспензированной формы препарата оценивали по смертности тест-организма в соответствии с методикой Abbott³.

Нематоцидная активность определена по способности суспензии гриба *B. bassiana* ингибировать подвижность и умерщвлять нематод. Выращивали нематод на газоне бактерий *Escherichia coli* (ВКПМ В-8208). Бактерии предварительно культивировали на среде МПА. Для тестирования использовали нативную культуральную суспензию гриба. Образцы в равном объеме дозатором вносили в ячейки планшета, куда затем помещали определенное количество нематод (не менее 20 особей) в трехкратной повторности и выдерживали при 20 ± 2 °С без освещения. Наблюдения за ингибированием подвижности нематод проводили с помощью стереоскопического микроскопа Olympus SZ51 (увеличение 200x) в течение 2 суток после обработки (18 час, 42 час). В качестве контроля использовали стерильную дистиллированную воду. Для определения эффективности контактного воздействия метаболитов на тест-организм обездвиженных нематод из опытных сред планшета переносили в дистиллированную воду (1 раз в первые сутки). При незначительном токсическом воздействии среды возможно восстановление двигательной активности живых особей нематод. Аналогично проведено определение биологической активности с использованием образцов культуральной суспензии штамма после длительного хранения (67 суток при 2-4 °С).

Количество инфекционных единиц определяли методом Коха по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) посевом на агаризованную среду Чапека. Численность колоний (КОЕ/мл) выражали в десятичных логарифмах

¹Методы экспериментальной микологии. Под ред. В. И. Билай. Киев: Наукова думка, 1982. 550 с.

²Teather R. M., Wood P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. 1982;43 (4):777-780.

³Abbott W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 1925;18 (2):265-267.

для статистической обработки. Содержание биомассы определяли объемно-расчетным методом в пробах ($n = 3$) объемом 5 мл по абсолютно сухой массе (г/л)⁴.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически с использованием пакетов прикладных программ Microsoft Excel и CXSTAT, данные приведены в виде среднего арифметического с доверительным интервалом для $P = 0,95$, рассчитанным по результатам измерения соответствующего параметра в трёх повторах.

Результаты и их обсуждение. Состав питательной среды и условия культивирования влияют на продуктивность, спорообразование, выход биомассы, а также на биосинтез комплекса экзоферментов, включая и те ферменты, которые эволюционно способны синтезировать энтомопатогенные грибы, а также те ферменты, которые не отвечают за инфективность этих грибов. Поэтому было проведено исследование продуктивности штамма *Beauveria bassiana* при культивировании на различных питательных средах (табл. 1).

Таблица 1 – Глубинное культивирование штамма *B. bassiana* на различных средах / Table 1 – Submerged cultivation of the *B. bassiana* strain on different media

Состав среды при культивировании / Substrate content when cultivated	Активность / Activity		Продуктивность штамма / Strain productivity	
	целлюлозная / cellulolytic	каталазная / catalase	биомасса, г/л / biomass, g/l	титр, КОЕ/мл / titre, CFU/ml
Среда Чапека / Czapek's medium	+	+	8,7±0,4	(1,3±0,6) x 10 ⁷
Молочная сыворотка / Milk whey	-	+	10,1±0,5	(3,2±0,3) x 10 ⁸
Пивная барда + ДТ / Brewery spent grain liquor + DF	++	+++	11,3±0,6	(1,5±0,5) x 10 ⁸
Пивная барда + Твин-80 / Brewery spent grain liquor + Tween-80	++	++	12,9±0,6	(4,6±0,4) x 10 ⁸
Молочная сыворотка + пивная барда + Твин-80 / Milk whey + brewery spent grain liquor + Tween-80	+++	+++	14,5±0,7	(5,5±0,5) x 10 ⁹
Молочная сыворотка + пивная барда + ДТ / Milk whey + brewery spent grain liquor + DF	+	+++	18,2±0,5	(7,8±0,7) x 10 ¹⁰
HCP ₀₅ / LSD ₀₅	-	-	1,54	1,18

Примечания: «+» – присутствие ферментативной активности; «-» – отсутствие ферментативной активности; «++» и «+++» – увеличение показателя ферментативной активности (увеличение зоны просветления или газообразных выделений в сравнении с теми же показателями на среде Чапека) /

Notes: "+" is for the presence of enzymatic activity; "-" – for the absence of enzymatic activity; "++" and "+++” – for an increase in the enzymatic activity index (an increase in the regions of enlightenment or gaseous secretions compared to the same indices on the Czapek medium).

Представленные результаты жидкофазного выращивания демонстрируют различную продуктивность штамма. Показано, что количество инфекционных единиц, выход биомассы и ферментативная активность были различными. Полученные суспензии содержали биомассу 8-18 г/л. В образцах суспензии с использованием сыворотки и барды титр был выше на 2-3 порядка, чем на среде Чапека. Каталазная активность штамма отмечена для всех питательных сред.

Однако в значительной степени каталазная и целлюлозолитическая активность проявилась в суспензии, полученной на питательной среде, содержащей смесь сыворотки и барды с добавлением индуктора Твин-80.

Состав сред, которые содержали компоненты молочной сыворотки (лактоза и белок) и компоненты растительного происхождения пивной барды, а также индукторы (Твин-80 или ДТ), способствовал накоплению биомассы и биосинтезу ферментов. Твин-80 и ДТ в составе среды с пивной бардой или среды, включающей

⁴Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. Практикум по микробиологии. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.

смесь пивной барды и сыворотки, возможно выступали индукторами развития спорообразования, так как в данных средах при различном соотношении C:N и содержании питательных компонентов отмечено наибольшее количество инфекционных единиц – КОЕ/мл, которые отражают наличие проросших спор или фрагментов мицелия в образцах исследуемой суспензии. Продуктивность гриба при выращивании на среде Чапека отмечена наименьшими показателями. При глубинном способе культивирования штамма *B. bassiana* питательные среды сложного состава способствовали наиболее высокому выходу мицелиальной массы с содержанием 14-18 г/л и 10^9-10^{10} КОЕ/мл.

Для оценки биологической активности в отношении подвижных стадий нематод использовали образцы суспензии, полученные после глубинного культивирования штамма *B. bassiana* (5 суток), а также образцы суспензии после длительного хранения (67 суток).

Известно, что нематоцидная активность должна проявляться, прежде всего, ингибированием движения нематод вследствие действия токсинов, обеспечивая проникновение гифов с последующей деградацией (перевариванием) организма под действием ферментов [23]. Такая стратегия характерна для нематофаговых грибов, которые синтезируют комплекс соединений (аттрактанты, токсины, ферменты: протеазы, коллагеназы, липазы и хитиназы) против подвижных стадий нематод (личинки и половозрелые особи) [24]. Несмотря на то, что нематоды *Rhabditis sp.* не являются фитофагами, этот вид был использован для тестирования нематоцидной активности энтомопатогенного гриба. Обусловлен выбор тест-организма для исследований тем, что бактериотрофные нематоды семейства Rhabditidae морфологически отличаются только в той части, которая позволяет фитогельминтам паразитировать [25, 26]. Фитогельминты являются высокопатогенными организмами, многие виды которых принадлежат к классу Chromodea, отряду Rhabdihida [25]. В зависимости от систематического положения и образа жизни могут отличаться толщина и ультраструктура отдельных слоев кутикулы нематод. Однако у всех видов нематод строение стенки тела представляет кожно-мускульный мешок, где белки (кератин и коллаген) определяют эластичность и прочность покровов, липопр-

теины обеспечивают их проницаемость [26]. Следовательно, те вещества, которые при контакте с телом нематоды могут вызвать ингибирование подвижности и гибель, обладают токсическим воздействием. Степень такого воздействия характеризует нематоцидную активность и зависит от длительности контакта и концентрации токсичных веществ.

В результате наблюдений отмечена различная нематоцидная активность образцов 5-суточной суспензии штамма *Beauveria bassiana* по отношению к подвижным стадиям нематод (табл. 2). В контрольном варианте инкубация в водной среде привела к гибели особей нематод – потери по естественным причинам (2,5 %). Обнаружено, что наиболее высокой токсичностью к нематодам обладали образцы нативной формы биопрепарата в вариантах с обработкой суспензией, полученной на среде, включающей молочную сыворотку и пивную барду с добавлением индукторов (ДТ или Твин-80) – более 90 % гибель нематод. При обработке суспензией, полученной на среде с молочной сывороткой без индукторов и на среде Чапека, гибель нематод была на уровне 8 и 30 % соответственно. В вариантах с использованием образцов суспензии, полученных на средах с пивной бардой и индукторами (ДТ или Твин-80), нематоцидная активность отмечена на уровне 20 и 40 %. В исследуемых образцах суспензии концентрация биомассы была на уровне 10^7-10^{10} КОЕ/мл. Наличие мицелиальной массы, а также продуктов метаболизма в культуральной суспензии способствовало нематоцидной активности штамма. Можно сделать предположение, что вторичные метаболиты суспензии, прежде всего собственные токсины и ферменты штамма *B. bassiana*, обладают нематоцидной активностью в отношении подвижных стадий нематод, что подтверждено нематостатическим эффектом. Исследуемые образцы жидкой нативной формы препарата в виде суспензии мицелиальной массы гриба содержали остаточные компоненты питательной среды, что возможно также способствовало развитию патологического процесса и гибели тест-организма. Следовательно, различный состав питательных сред в различной степени способствовал синтезу продуктов метаболизма штамма *B. bassiana*, включая биомассу с концентрацией не менее 10^7 КОЕ/мл, которые обладают нематоцидной активностью (табл. 2).

Таблица 2 – Нематоцидная активность образцов суспензии на основе штамма *B. bassiana* / Table 2 – Nematicidal activity of suspension samples based on *B. bassiana* strain

Вариант обработки / Treatment variant	Гибель нематод за период инкубации, % / Nematodes' death during the incubation period, %	
	1-е сутки / 1 st day	2-е сутки / 2 nd day
Контроль (стерильная вода) / Control (sterile water)	2,5±1,5	2,5±1,5
Среда Чапека / Czapek medium-based suspension	2,5±1,5	29,5±2,5
Молочная сыворотка / Milk whey	2,5±1,5	8,5±2,5
Пивная барда + ДТ / Brewery spent grain liquor + DF	2,5±1,5	23,0±12,5
Пивная барда + Твин-80 / Brewery spent grain liquor + Tween-80	37,0±12,5	43,0±12,5
Молочная сыворотка + барда + Твин-80 / Milk whey + brewery spent grain liquor + Tween-80	90,0±5	97,0±2,5
Молочная сыворотка + барда + ДТ / Milk whey + brewery spent grain liquor + DF	80,0±12,5	97,0±2,5
HCP ₀₅ / LSD ₀₅	11,5	13,9

Одним из условий стабильности действия при использовании инсектицидного биопрепарата на основе энтомопатогенного гриба является преобладание спор в культуральной жидкости с содержанием биомассы, так как прорастание спор обеспечивает большую скорость патологического процесса, чем разрастание мицелия [15, 27, 28]. Напротив, на развитие патологического процесса при использовании нематоцидного биопрепарата на основе культуры гриба концентрация спор в суспензии значительного влияния не имеет [23, 24]. Нематоцидная активность биопрепарата на основе энтомопатогенного гриба зависит, прежде всего, от концентрации в суспензии мицелиальной массы и продуктов метаболизма, обеспечивающих ингибирование подвижности и последующую гибель нематод. Однако длительное хранение суспензированной формы биопрепарата может вызвать лизис мицелиальной массы, а также денатурацию вторичных метаболитов

(экзоферментов и токсинов). Поддержание стабильности по основным целевым признакам для перспективных штаммов-продуцентов является важным фактором для биопрепаратов в качестве средств защиты растений.

Анализ нематоцидной активности после длительного хранения глубинной культуры *B. bassiana* был проведен в двух вариантах жидкой суспензии штамма, которые были выделены на предыдущих этапах исследований по показателям продуктивности и токсигенности в отношении тест-организма (табл. 3). Исследование образцов суспензии без разведения показало, что нематоцидная активность была на уровне 60-80 %, в разведенной суспензии она отсутствовала. Образцы суспензии, полученные на питательных средах, в состав которых входили сыворотка и пивная барда с добавлением индукторов (Твин-80 или ДТ) имели титр жизнеспособных инфекционных единиц штамма на уровне 10⁶-10⁷ КОЕ/мл.

Таблица 3 – Нематоцидная активность образцов суспензии на основе штамма *B. bassiana* после длительного хранения (67 суток) / Table 3 – Nematicidal activity of suspension samples based on *B. bassiana* strain when stored for a long time (67 days)

Вариант обработки / Treatment variant	Гибель нематод за период инкубации, % / Nematodes' death during the incubation period, %		Tump, КОЕ/мл / Titre, CFU/ml
	1-е сутки / 1 st day	2-е сутки / 2 nd day	
Контроль (стерильная вода) / Control (sterile water)	3,0-5,0	3,0-5,0	-
Смесь сыворотки и пивной барды + Твин-80 (без разведения) / Milk whey-spent liquor mixture-based suspension + Tween-80 (undiluted)	40,0±12,5	67,0±5,0	(5,3±0,3) x10 ⁷
Смесь сыворотки и пивной барды + ДТ (без разведения) / Milk whey-spent liquor mixture-based suspension + DF (undiluted)	50,0±5,0	80,0±5,0	(8,5±0,6)x10 ⁶
HCP ₀₅ / LSD ₀₅	14,6	9,1	1,4

Из данных таблиц 1-3 следует, что при глубинном культивировании для наработки нативной формы биопрепарата на основе штамма энтомопатогенного гриба наиболее оптимальными являются питательные среды, в состав которых входили молочная сыворотка и пивная барда, так как на данных средах отмечена наибольшая продуктивность с высоким выходом мицелиальной массы в суспензии. Сложный состав питательной среды, содержащей отходы и индукторы, способствовал нематоцидной активности штамма, которая при длительном хранении изменилась незначительно.

Заклучение. В результате проведенных исследований показана перспективность использования штамма энтомопатогенного гриба *B. bassiana* (ВКПМ F-145) для разработки на его основе биопестицидного препарата,

обладающего нематоцидной активностью. Показана перспективность использования отходов пивного и молочного производства для получения нативной формы биопрепарата глубинным культивированием. Предложены условия и состав питательной среды на основе смеси молочной сыворотки и пивной барды с добавлением индукторов Твин-80 или дизельного топлива, которые способствуют высокой продуктивности и биологической активности штамма. Установлено, что мицелиальная масса и метаболиты энтомопатогенного гриба, полученные на данных средах, сохраняют токсигенную активность в отношении подвижных стадий нематод семейства Rhabditidae. Нематоцидная активность штамма *B. bassiana* сохраняется на уровне 67-80 % после длительного хранения жидкой культуры (67 суток).

Список литературы

1. Maxmen A. Crop pests: under attack. Nature. 2013;501:15-17. URL: <https://www.nature.com/articles/501S15a>
2. Eilenberg J., Hajek A., Lomer C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. BioControl. 2001;46 (4):387-400. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1014193329979>
3. Bhattacharjee R., Dey U. An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens/diseases. Afr. J. Microbiol. Res. 2014;8 (17):1749-1762. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6356>
4. Lomer C. J., Bateman R. P., Johnson D. L., Lagewald J., Thomas M. Biological control of locusts and grasshoppers. Annual Review of Entomology. 2001;46:667-702. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.667>
5. Wang C., Leger R. J. S. Genomics of Entomopathogenic Fungi. The Ecological Genomics of Fungi. India, 2013. Part. 4. pp. 243-260. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118735893.ch11>
6. Леднев Г. Р., Борисов Б. А., Митина Г. В. Возбудители микозов насекомых. С-Пб, 2003. 71 с.
7. Butt T. M., Hadj N. B. E., Skrobek A., Ravensberg W. J., Wang Ch., Lange C. M., Vey A., Shah U-K., Dudley E. Mass spectrometry as a tool for the selective profiling of des-truxins; their first identification in *Lecanicillium longisporum*. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2009;23 (10):1426-1434. DOI: <https://doi.org/10.1002/rcm.4018>
8. Cox G. M., McDade H. C., Chen S. C. A., Tucker S. C., Gottfredsson M., Wright L. C., Sorrell T. C., Leidich S. D., Casadevall A., Ghannoum M. A., Perfect J. R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. Mol. Microbiol. 2001;39(1):166-175. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02236.x>
9. Xiao G., Ying S-H., Zheng P., Wang Z.-L., Zhang S., Xie X-Q., Shang Ya., Leger R. J. S., Zhao G.-P., Wang Ch., Feng M.-G. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. Sci. Rep. 2012;(2):483. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep00483>
10. Тутельян В. А., Кравченко Л. В. Микотоксины. М.: Медицина, 1985. 320 с.
11. Беккер З. Э. Физиология и биохимия грибов. М.: МГУ, 1988. 227 с.
12. Hu G., Leger R. J. S. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. Appl. Environ. Microbiol. 2002;68 (12):6383-6387. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6383-6387.2002>
13. Gao Q., Jin K., Ying S. H., Zhang Y., Xiao G., Shang Ya., et al. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. PLoS Genet. 2011;7(1):e1001264. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001264>
14. Шарапова И. Э. Применение биоопалпинга для предварительной обработки древесного сырья в процессе производства биоэтанола. Часть 1. Отбор штаммов базидиальных и микромицелиальных грибов для биоопалпинга древесных субстратов. Бутлеровские сообщения. 2018;56(11):140-145. Режим доступа: <https://butlerov.com/stat/reports/details.asp?lang=ru&id=31054>
15. Секова В. Ю., Корнилова Н. А., Васильева А. В. Глубинное культивирование энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*. Успехи в химии и химической технологии. 2010;24 (11):42-45. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=20293253>
16. Зипаев Д. В., Зимичев А. В. Молочная сыворотка – ценное сырье для вторичной переработки. Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2007;(2):14-16. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=12838876>
17. Макарова Н. В., Зимичев А. В., Зипаев Д. В., Лугова Т. В. Современные тенденции в переработке молочной сыворотки. Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2008;(4):5-7. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=11622868>
18. Колпакчи А. П., Голикова Н. В., Андреева О. П. Вторичные материальные ресурсы пивоварения. М.: Агропромиздат, 1986. 160 с.

19. Эпоян С., Фомин С., Фомина И. Интенсификация сооружений биологической очистки сточных вод молокозаводов. Motrol. Commission of motorization and energetics in agriculture. 2013;15(6):133-140. Режим доступа: <https://journals.pan.pl/Content/91308/mainfile.pdf>
20. Stimac J. L. Biological control of imported fire ants with a fungal pathogen: Пат. № 4925663 (United States). № 140018: заявл. 31.12.1987; опубл. 15.05.1990. 4 с. Режим доступа: <https://patentimages.storage.googleapis.com/cf/ba/d5/2a9e22f50a0687/US4925663.pdf>
21. Райт Д. Е. [US], Чандлер Л. Д. [US], Науф Т. А. [US] Штамм гриба *Beauveria bassiana*, предназначенный для получения энтомопатогенного препарата против хлопкового долгоносика, белянки сладкого картофеля и хлопкового слепняка, композиция для борьбы с насекомыми-вредителями, способ борьбы с насекомыми-вредителями: патент №2103873 (Российская Федерация). №: 93051784/13; заявл. 09.01.1992; опубл. 10.02.1998. Режим доступа: https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&rm=8680&DocNumber=2103873&TypeFile=pdf
22. Sharapova I. E. Prospects of using entomopathogenic fungus in development of a biopesticide product with nematocidal activity. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019;19:1878-8181. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101098>
23. Comans-Pérez R., Aguilar-Marcelino L., Mendoza De Gives P., Sánchez Je., López-Arellano Me. In vitro lethal capability of ten strains of edible mushroom-rooms against *Haemonchus contortus* (Nematoda) infective larvae [conference poster]. In: Proceedings of 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8), New Delhi, India, 19-22 November 2014. ICAR-Directorate of Mushroom Research, 2014. Vol. I & II. pp. 557-562. URL: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153365541>
24. Liu X., Xiang M., Che Y. The living strategy of nematophagous fungi. Mycoscience. 2009;50(1):20-25. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10267-008-0451-3>
25. Chitwood D. J. Biochemistry and function of nematode steroids. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1999;34(4):273-284. DOI: <https://doi.org/10.1080/10409239991209309>
26. Зиновьева С. В., Чижов В. Н., Придаников М. В., Субботин С. А., Рысс А. Ю., Хусаинов Р. В. Фитопаразитические нематоды России: монография. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2012. 385 с.
27. Wraight S. P., Inglis G. D., Goettel M. S. Fungi. In: Lacey L. A., Kaya H. K. (eds). Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Springer, Dordrecht, 2017. pp. 223-248. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5933-9_10
28. Севницкая Н. Л. Продуктивность и вирулентность энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vull. при культивировании на разных питательных средах. Труды БГТУ. 2016;(1):177-181. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=26465032>

References

1. Maxmen A. Crop pests: under attack. Nature. 2013;501:15-17. URL: <https://www.nature.com/articles/501S15a>
2. Eilenberg J., Hajek A., Lomer C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. BioControl. 2001;46(4):387-400. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1014193329979>
3. Bhattacharjee R., Dey U. An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens/diseases. Afr. J. Microbiol. Res. 2014;8(17):1749-1762. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6356>
4. Lomer C. J., Bateman R. P., Johnson D. L., Lagewald J., Thomas M. Biological control of locusts and grasshoppers. Annual Review of Entomology. 2001;46:667-702. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.667>
5. Wang C., Leger R. J. S. Genomics of Entomopathogenic Fungi. The Ecological Genomics of Fungi. India, 2013. Part 4. pp. 243-260. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118735893.ch11>
6. Lednev G. R., Borisov B. A., Mitina G. V. *Vozbuditeli mikozyov nasekomykh*. [Pathogens of insect mycoses: a diagnostic manual]. Saint-Petersburg, 2003. 71 p.
7. Butt T. M., Hadj N. B. E., Skropek A., Ravensberg W. J., Wang Ch., Lange C. M., Vey A., Shah U.-K., Dudley E. Mass spectrometry as a tool for the selective profiling of des-truxins; their first identification in *Lecanicillium longisporum*. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2009;23(10):1426-1434. DOI: <https://doi.org/10.1002/rcm.4018>
8. Cox G. M., McDade H. C., Chen S. C. A., Tucker S. C., Gottfredsson M., Wright L. C., Sorrell T. C., Leidich S. D., Casadevall A., Ghannoum M. A., Perfect J. R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. Mol. Microbiol. 2001;39(1):166-175. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02236.x>
9. Xiao G., Ying S.-H., Zheng P., Wang Z.-L., Zhang S., Xie X.-Q., Shang Ya., Leger R. J. St., Zhao G.-P., Wang Ch., Feng M.-G. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. Sci. Rep. 2012;(2):483. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep00483>
10. Tutelyan V. A., Kravchenko L. V. *Mikotoksiny*. [Mycotoxins]. Moscow: *Meditina*, 1985. 320 p.
11. Bekker Z. E. *Fiziologiya i biokhimiya gribov*. [Physiology and biochemistry of fungi]. Moscow: *MGU*, 1988. 227 p.
12. Hu G., Leger R. J. S. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. Appl. Environ. Microbiol. 2002;68(12):6383-6387. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6383-6387.2002>
13. Gao Q., Jin K., Ying S. H., Zhang Y., Xiao G., Shang Ya., et al. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. PLoS Genet. 2011;7(1):e1001264. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001264>
14. Sharapova I. E. *Primenenie biopalpinga dlya predvaritel'noy obrabotki drevesnogo syr'ya v protsesse proizvodstva bioetanol. Chast' 1. Otbor shtammov bazidial'nykh i mikromitselial'nykh gribov dlya biopalpinga drevesnykh substratov*. [Use of biopulping for pretreatment of wood in bioethanol production. Part 1. Sampling of strains of basidiomycetes and micromycetes for biopulping of wood substrates]. *Butlerovskie soobshcheniya* = Butlerov Communications. 2018;56(11):140-145. (In Russ.). URL: <https://butlerov.com/stat/reports/details.asp?lang=ru&id=31054>

15. Sekova V. Yu., Kornilova N. A., Vasil'eva A. V. *Glubinnoe kul'tivirovanie entomopatogenogo griba Beauveria bassiana*. [Deep cultivation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*]. *Uspekhi v khimii i khimicheskoy tekhnologii*. 2010;24 (11):42-45. (In Russ.). URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=20293253>
16. Zipaev D. V., Zimichev A. V. *Molochnaya syvotka – tsennoe syr'e dlya vtorichnoy pererabotki*. [Whey – a valuable raw material for recycling]. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Pishchevaya tekhnologiya = Food Technology*. 2007;(2):14-16. (In Russ.). URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=12838876>
17. Makarova N. V., Zimichev A. V., Zipaev D. V., Lugova T. V. *Sovremennye tendentsii v pererabotke molochnoy syvotki*. [Modern trends in the milk whey processing]. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Pishchevaya tekhnologiya = Food Technology*. 2008;(4):5-7. (In Russ.). URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=11622868>
18. Kolpakchi A. P., Golikova N. V., Andreeva O. P. *Vtorichnye material'nye resursy pivovareniya*. [Secondary material resources of brewing]. Moscow: *Agropromizdat*, 1986. 160 p.
19. Epoyan S., Fomin S., Fomina I. *Intensifikatsiya sooruzheniy biologicheskoy ochistki stochnykh vod molokozavodov*. [Intensification of biological treatment sewage dairies]. *Motrol. Commission of motorization and energetics in agriculture*. 2013;15(6):133-140. (In Poland). URL: <https://journals.pan.pl/Content/91308/mainfile.pdf>
20. Stimac J. L. Biological control of imported fire ants with a fungal pathogen: pat. US № 4925663. 1990. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/cf/ba/d5/2a9e22f50a0687/US4925663.pdf>
21. Rayt D. E. [US], Chandler L. D. [US], Nauf T. A. [US] Strain of the fungus *Beauveria bassiana*, used to produce an entomopathogenic drug against cotton weevil, sweet potato whitefish and cotton horsefly, a composition for pest control, a method of pest control: pat. No. 2103873 (RF). URL: https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&m=8680&DocNumber=2103873&TypeFile=pdf
22. Sharapova I. E. Prospects of using entomopathogenic fungus in development of a biopesticide product with nematocidal activity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;19:1878-8181. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101098>
23. Comans-Pérez R., Aguilar-Marcelino L., Mendoza De Gives P., Sánchez Je., López-Arellano Me. In vitro lethal capability of ten strains of edible mushrooms against *Haemonchus contortus* (Nematoda) infective larvae [conference poster]. In: *Proceedings of 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8)*, New Delhi, India, 19-22 November 2014. ICAR-Directorate of Mushroom Research, 2014. Vol. I & II. pp. 557-562. URL: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153365541>
24. Liu X., Xiang M., Che Y. The living strategy of nematophagous fungi. *Mycoscience*. 2009;50(1):20-25. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10267-008-0451-3>
25. Chitwood D. J. Biochemistry and function of nematode steroids. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1999;34 (4):273-284. DOI: <https://doi.org/10.1080/10409239991209309>
26. Zinovyeva S. V., Chizhov V. N., Pridannikov M. V., Subbotin S. A., Ryss A. Yu., Khusainov R. V. *Fitoparaziticheskie nematody Rossii: monografiya*. [Plant parasitic nematodes of Russia]. Moscow: *T-vo nauch. izd. KMK*, 2012. 385 p.
27. Wright S. P., Inglis G. D., Goettel M. S. Fungi. In: Lacey L. A., Kaya H. K. (eds). *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Springer, Dordrecht, 2017. pp. 223-248. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5933-9_10
28. Sevnitskaya N. L. *Produktivnost' i virulentnost' entomopatogenogo griba Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. pri kul'tivirovanii na raznykh pitatel'nykh sredakh*. [Productivity and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. at cultivation on different nutrient mediums]. *Trudy BGTU*. = *Proceedings of BSTU*. 2016;(1):177-181. (In Belarus). URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=26465032>

Сведения об авторе

✉ Шарapова Ирина Эдмундовна, кандидат техн. наук, научный сотрудник отдела сельскохозяйственной геномики, Институт агробιοтехнологий им. А. В. Журавского ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, ул. Ручейная, д. 27, г. Сыктывкар, Республика Коми, Российская Федерация, 167023, e-mail: nipti@bk.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1496-0884>, e-mail: i_scharapova@mail.ru

Information about the author

✉ Irina E. Sharapova, PhD in Engineering, researcher, the Department of Agricultural Genomics, A. V. Zhuravsky Institute of Agro-Biotechnologies of Komi Science Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Rucheynaya, 27, Syktyvkar, 167023, Komi Republic, Russian Federation, e-mail: nipti@bk.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1496-0884>, e-mail: i_scharapova@mail.ru

✉ – Для контактов / Corresponding author