

## Сравнительная оценка питательных сред для культивирования микромицетов рода *Trichoderma*

© 2022. П. А. Стариков<sup>1</sup>, аспирант,

Л. И. Домрачева<sup>1,2</sup>, д. б. н., профессор, с. н. с.,

С. Г. Скугорева<sup>2</sup>, к. б. н., н. с.,

<sup>1</sup>Вятский государственный агротехнологический университет,  
610017, Россия, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 133,

<sup>2</sup>Институт биологии Коми научного центра

Уральского отделения Российской академии наук,

167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28,

e-mail: ya.starikov-pavel@yandex.ru, dli-alga@mail.ru

Грибы рода *Trichoderma* являются одним из наиболее используемых и перспективных объектов биотехнологии. Поэтому к числу задач в практическом применении данного микромицета в дальнейшем относится выделение из окружающей среды новых активных штаммов и расширение спектра питательных сред, используемых для культивирования триходермы. В данной работе исследовали динамику вегетативного роста грибов рода *Trichoderma*, изолированных из различных экотопов. Использовали изоляты, выделенные с поверхности разлагающейся древесины, плодовых тел трутовиков, а также штамм из урбаноэма, который в течение 10 лет культивировали на среде с полимером сэвиленом. Культивирование проводили на 5 агаризованных питательных средах при температуре 23 °С. Максимальные темпы роста и образования конидий наблюдали при поверхностном культивировании данных микромицетов на бобовом агаре и картофельно-сахарозной среде. На этих же средах *Trichoderma* sp., деструктор сэвилена показал значительное отставание по скорости линейного роста (7,6–8,3 мм/сутки) в сравнении с остальными исследованными штаммами (19,7–24,3 мм/сутки).

**Ключевые слова:** *Trichoderma*, микромицеты, культивирование, питательные среды, скорость роста, спороношение.

## Comparative evaluation of nutrient media for the cultivation of micromycetes of the genus *Trichoderma*

© 2022. P. A. Starikov<sup>1</sup> ORCID: 0000-0002-3205-6696<sup>\*</sup>

L. I. Domracheva<sup>1,2</sup> ORCID: 0000-0002-7104-3337<sup>\*</sup>

S. G. Skugoreva<sup>2</sup> ORCID: 0000-0002-5902-5187<sup>\*</sup>

<sup>1</sup>Vyatka State Agrotechnological University,

133, Oktyabrskiy Prospekt, Kirov, Russia, 610017,

<sup>2</sup>Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Branch  
of the Russian Academy of Sciences,

28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,

e-mail: ya.starikov-pavel@yandex.ru, dli-alga@mail.ru

Fungi of the genus *Trichoderma* are one of the most used and promising objects of biotechnology. Therefore, among the tasks in the practical application of this micromycete in the future is the isolation of new active strains from the environment and the expansion of the range of culture media used for trichoderma. In this work, we studied the dynamics of vegetative growth of fungi of the genus *Trichoderma* from various ecotopes. We used isolates from the surface of decaying wood, fruiting bodies of polypores, as well as a strain from urban soil, which was cultivated for 10 years on a medium with sevilen polymer. Cultivation was carried out at 23 °C on 5 agar nutrient media, namely, on bean agar, potato and potato-sucrose medium (20 g of sucrose per 1 liter), on the classical Czapek medium, and also on decoction of *Fomitopsis pinicola* (200 g of fruiting bodies per 1 liter of broth). The maximum rates of growth and formation of conidia were observed during surface cultivation of these micromycetes on bean agar and potato-sucrose medium. On the same media of *Trichoderma* sp., sevilen destructor showed a significant lag in the rate of linear growth (7.6–8.3 mm/day) in comparison with the other studied strains (19.7–24.3 mm/day) which may be explained by profound metabolic changes during long-term cultivation on media where the only source of carbon is a synthetic polymer. The least suitable substrate

for cultivation of all studied isolates of *Trichoderma* spp. turned out to be an agar decoction of polypore, the growth rate on which was 3.6–12.1 mm/day. In all variants of the cultivation of fungi of the genus *Trichoderma*, the linear growth rate was constant throughout the entire process of cultivation.

**Keywords:** *Trichoderma*, micromycetes, cultivation, culture media, growth rate, sporulation.

Грибы р. *Trichoderma* относятся к числу доминантов в фоновых и антропогенно преобразованных почвах, включая урбаноэмы, загрязнённые тяжёлыми металлами, кислотными осадками, выхлопными газами, антигололёдными смесями, нефтепродуктами, пестицидами и другими поллютантами [1]. При этом доказано, что грибы этого рода обладают значительной экологической пластичностью, различаясь по скорости и оптимальной температуре роста, по способности к синтезу внеклеточных гидролитических ферментов, по составу и биологическому действию других экзометаболитов [2].

Среди многочисленных, биосферно значимых функций триходермы, особенно важной для поддержания баланса почвенных экосистем, является способность к деструкционным процессам благодаря синтезу разнообразных экзоферментов. При этом триходерма как микодеструктор относится к числу неспецифических сапротрофов, обладает полифагией, встречаясь на различных субстратах [3]. Выполняя гидролитическое расщепление этих субстратов, триходерма обеспечивает постоянное вовлечение в биогенный круговорот элементов, необходимых для минерального питания растений [4].

В числе других важнейших функций, выполняемых грибами р. *Trichoderma*, выделяется их способность к обезвреживанию токсикантов, например, таких как пестициды, нефть и нефтепродукты [1, 5]. Доказаны сорбционные способности грибов р. *Trichoderma*, обитающих в загрязнённых почвах, по отношению к тяжёлым металлам [6–8]. Проведены экспериментальные исследования, показывающие способность биоплёнок *T. longibrachiantum* становиться биобарьером для удаления полициклических ароматических углеводородов [9]. В течение 14 дней отмечено удаление 90% фенантрена из водного раствора, а в почве снижение содержания фенантрена достигало 70% через 28 дней.

Проведены многолетние опыты, в ходе которых было показано, что *T. lignorum* способна вызывать деструкцию разнообразных пластмасс (сэвилен, полистирол, полиэтилен, полиамид, поликарбонат, фторопласт-4) [10].

В практике сельского хозяйства наибольший интерес вызывает способность триходермы к синтезу соединений, подавляющих развитие фитопатогенных бактерий и грибов [5, 11]. На этом основано приготовление биопрепаратов, используемых в защите растений от инфекций. Считают, что в данном направлении особенно перспективно использование комбинированных культур микробов-антагонистов, например, с грамположительной бактерией *Bacillus subtilis* [12], микромицетом *Talaromyces* sp. [13], микоризными грибами *Funneliformis mosseae* и *Acaulospora laevis* [15]. Показано, что смешанный инокулюм не только подавляет развитие фитопатогенов, но и увеличивает высоту растений, их биомассу, усиливает фотосинтез, повышает содержание в листьях хлорофилла.

В любом биотехнологическом производстве биомасса, получаемая для создания препаративных форм инокулянтов, должна не только соответствовать показателям качества, но и по возможности быть недорогой. Поэтому одним из ключевых этапов разработки новых микробных биопрепаратов является оптимизация состава питательных сред для культивирования продуцента [15].

Таким образом, для использования грибов р. *Trichoderma* в коммерческих целях необходимо добиться производства максимального количества биомассы с наименьшими экономическими затратами. Поэтому важно заниматься поиском подходящих дешёвых сред для выращивания этих микромицетов [16], учитывая при этом возможность совместного культивирования триходермы с другими партнёрами возможной коллаборации. Например, является достаточно актуальным вопрос совмещения в биопрепаратах триходермы с бактериями р. *Rhizobium*. Это открывает перспективу применения агаризованной бобовой среды для исследования *in vitro* совместимости триходермы и представителей *Rhizobium* spp. с целью поиска наиболее эффективных микробных консорциумов для инокуляции семян бобовых.

Определение показателей линейной скорости роста и продукции конидий на бобовом агаре необходимо для сравнения динамики вегетативного роста *Trichoderma* spp. на этой

среде с традиционными питательными субстратами, например, такими как картофельный агар и среда Чапека.

Цель работы – провести сравнительную оценку показателей линейного роста и характера спороношения грибов рода *Trichoderma* при культивировании на различных питательных средах.

**Объекты и методы исследования**

В качестве объектов исследования выступали три изолята микромицетов, по культурально-морфологическим свойствам соответствующие р. *Trichoderma* [16]. Изолят К-01Т отобран с плодового тела трутовика на территории Кировского дендрологического парка. *Trichoderma* sp. К-01D выделен с коры берёзы на территории Оричевского района Кировской области. Кроме того, изучали динамику роста штамма *Trichoderma* sp., который в течение 10 лет экспонировался в водной среде в замкнутой системе, где единственным источником углерода являлся полимер сэвилен [10]. В качестве эталона сравнения использовали штамм *T. lignorum* T13-82 из

коммерческого биопрепарата «Триходермин-БЛ» (ПК «Биогель»).

Для поверхностного культивирования триходермы использовали среду Чапека, картофельный агар, картофельный агар с добавлением 20 г/л сахарозы и бобовый агар [17]. Также провели попытку культивирования микромицетов на агаризованном отваре трутовика окаймлённого (*Fomitopsis pinicola*) (200 г плодовых тел отварили в 1 л воды). Посев триходермы производили уколом в центр поверхности среды немногочисленным инокулюмом (в 3-х повторностях). Чашки Петри инкубировали при  $t = 23$  °С. В дальнейшем измеряли диаметры колоний микромицетов по внешнему краю через определённые промежутки времени (21, 44, 68 и 92 ч) с момента посева. Определяли показатели динамики роста исследуемых штаммов – скорость вегетативного роста (мм/сутки) и время начала споруляции.

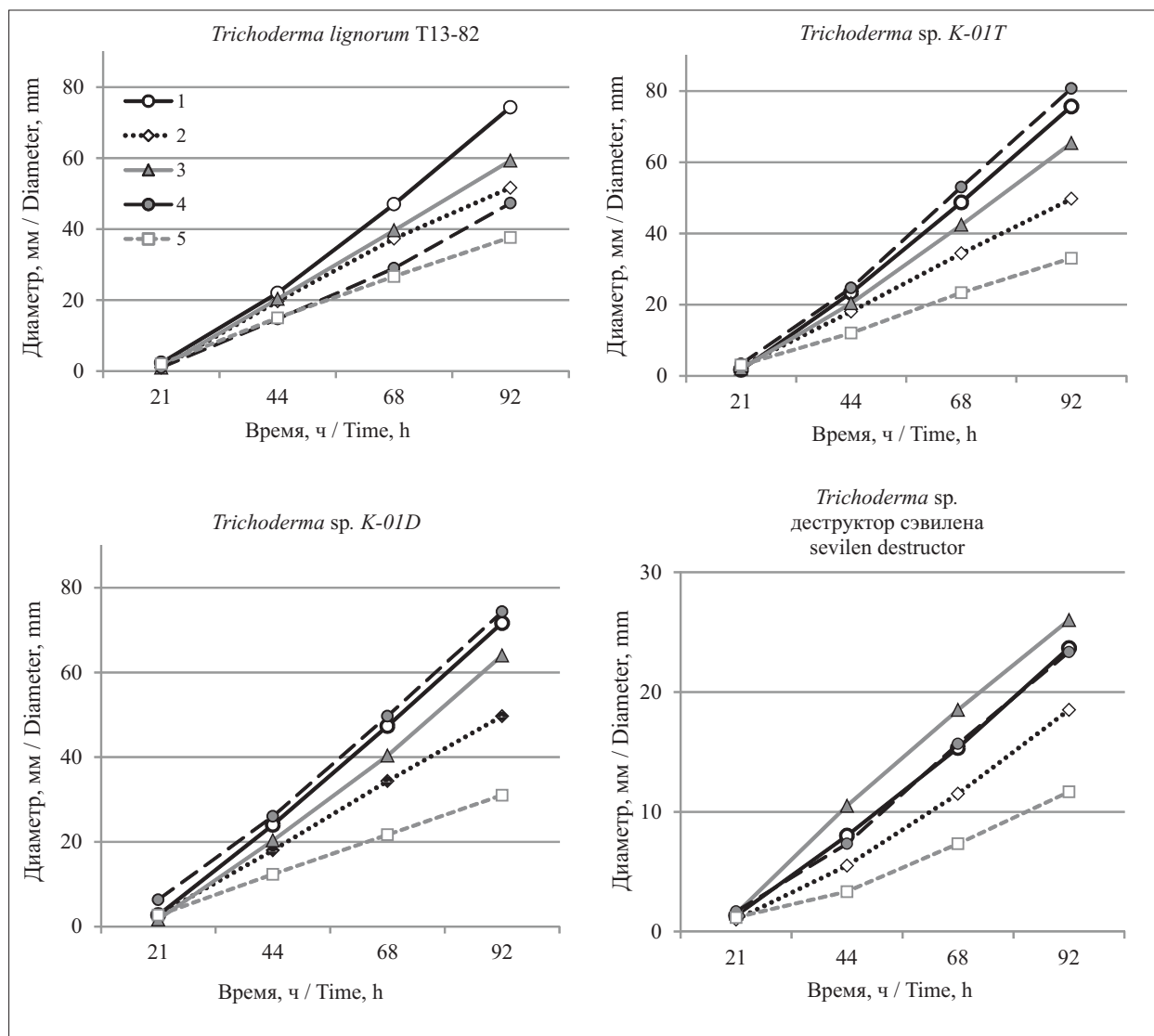
Линейную скорость роста *Trichoderma* spp. вычисляли по формуле:

$$v = \frac{D_2 - D_1}{\Delta T} \cdot 24,$$

**Таблица / Table**

Рост и начало споруляции штаммов *Trichoderma* spp. на различных агаризованных питательных средах (1 – бобовый агар, 2 – картофельный агар, 3 – картофельный агар с сахарозой, 4 – среда Чапека, 5 – агаризованный отвар трутовика)  
 Growth and onset of sporulation of *Trichoderma* spp strains. on various agarized nutrient media (1 – bean agar, 2 – potato agar, 3 is potato agar with sucrose, 4 – Chapek medium, 5 – agarized broth of polypore)

Штамм Strain	Питательная среда Culture medium	Скорость роста, мм/сутки Growth rate, mm/day	Начало споруляции The beginning of sporulation
<i>Trichoderma lignorum</i> T13-82	1	24,3±0,6	на 6-ые сутки / on the 6 <sup>th</sup> day
	2	17,13±0,39	
	3	19,72±0,39	на 5-ые сутки / on the 5 <sup>th</sup> day
	4	15,7±0,7	на 6-ые сутки / on the 6 <sup>th</sup> day
	5	12,06±0,20	
<i>Trichoderma</i> sp. К-01Т	1	24,68±0,34	на 5-ые сутки / on the 5 <sup>th</sup> day
	2	15,9±0,6	на 6-ые сутки / on the 6 <sup>th</sup> day
	3	21,41±0,20	
	4	26,1±0,9	на 5-ые сутки / on the 5 <sup>th</sup> day
	5	10,14±0,34	
<i>Trichoderma</i> sp. К-01D	1	23,3±0,6	на 5-ые сутки / on the 5 <sup>th</sup> day
	2	15,9±0,6	
	3	21,1±1,0	на 6-ые сутки / on the 6 <sup>th</sup> day
	4	23,0±0,6	на 5-ые сутки / on the 5 <sup>th</sup> day
	5	9,58±0,20	
<i>Trichoderma</i> sp., деструктор сэвилен <i>Trichoderma</i> sp., sevilen destructor	1	7,55±0,20	на 5-ые сутки / on the 5 <sup>th</sup> day
	2	5,92±0,24	
	3	8,28±0,24	
	4	7,32±0,10	
	5	3,55±0,17	



**Рис. 1.** Динамика роста *Trichoderma* spp. на различных питательных средах: 1 – бобовый агар, 2 – картофельный агар, 3 – картофельный агар с сахарозой, 4 – среда Чапека, 5 – агаризованный отвар трутовика  
**Fig. 1.** Growth dynamics of *Trichoderma* spp. on various culture media: 1 – bean agar, 2 – potato agar, 3 – potato agar with sucrose, 4 – Chapek medium, 5 – agarized broth of polypore

где  $v$  – линейная скорость роста, мм/сутки;  $D_1$  – диаметр колонии при первом измерении (21 ч с момента посева), мм;  $D_2$  – диаметр колонии при последующем измерении (92 ч с момента посева), мм;  $\Delta T$  – промежуток времени между измерениями  $D_1$  и  $D_2$ , ч.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программы Excel.

### Результаты и обсуждение

Большинство биопрепаратов на основе триходермы содержат продуцент в виде споровой массы, пригодной для длительного хранения. Поэтому, наряду с высокой скоростью роста, немаловажным аспектом процесса культивирования грибов р. *Trichoderma*

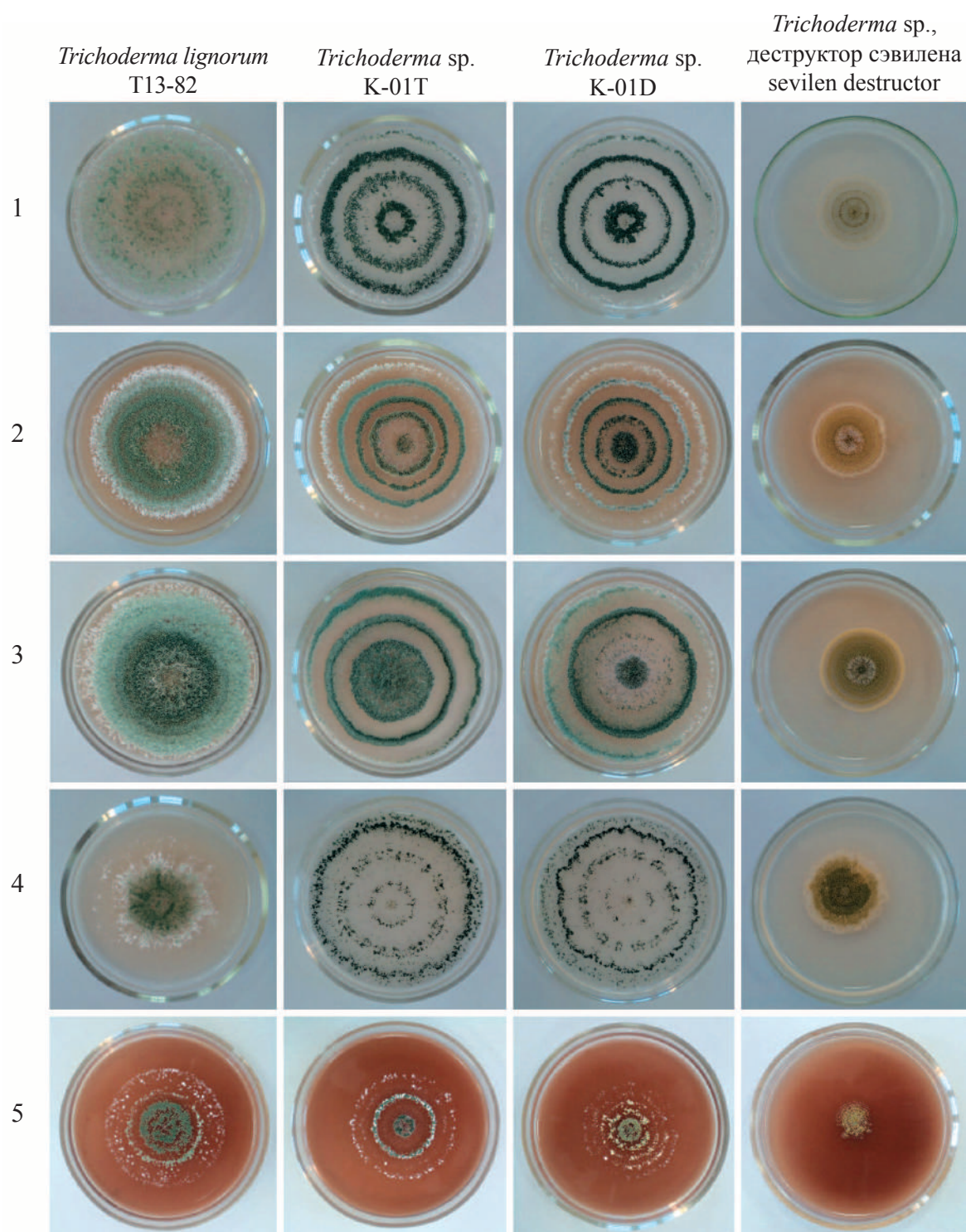
является достижение максимального спорообразования [18].

При поверхностном культивировании триходермы установили, что для всех испытанных штаммов наиболее высокие темпы линейного роста и продукции конидий наблюдаются на бобовом агаре и картофельно-сахарозной среде (табл., рис. 1).

Среда Чапека способствует быстрому вегетативному росту *Trichoderma* spp., но в то же время, обеспечивает слабое образование спор у исследованных штаммов в сравнении с другими субстратами (рис. 2, см. цв. вкладку I).

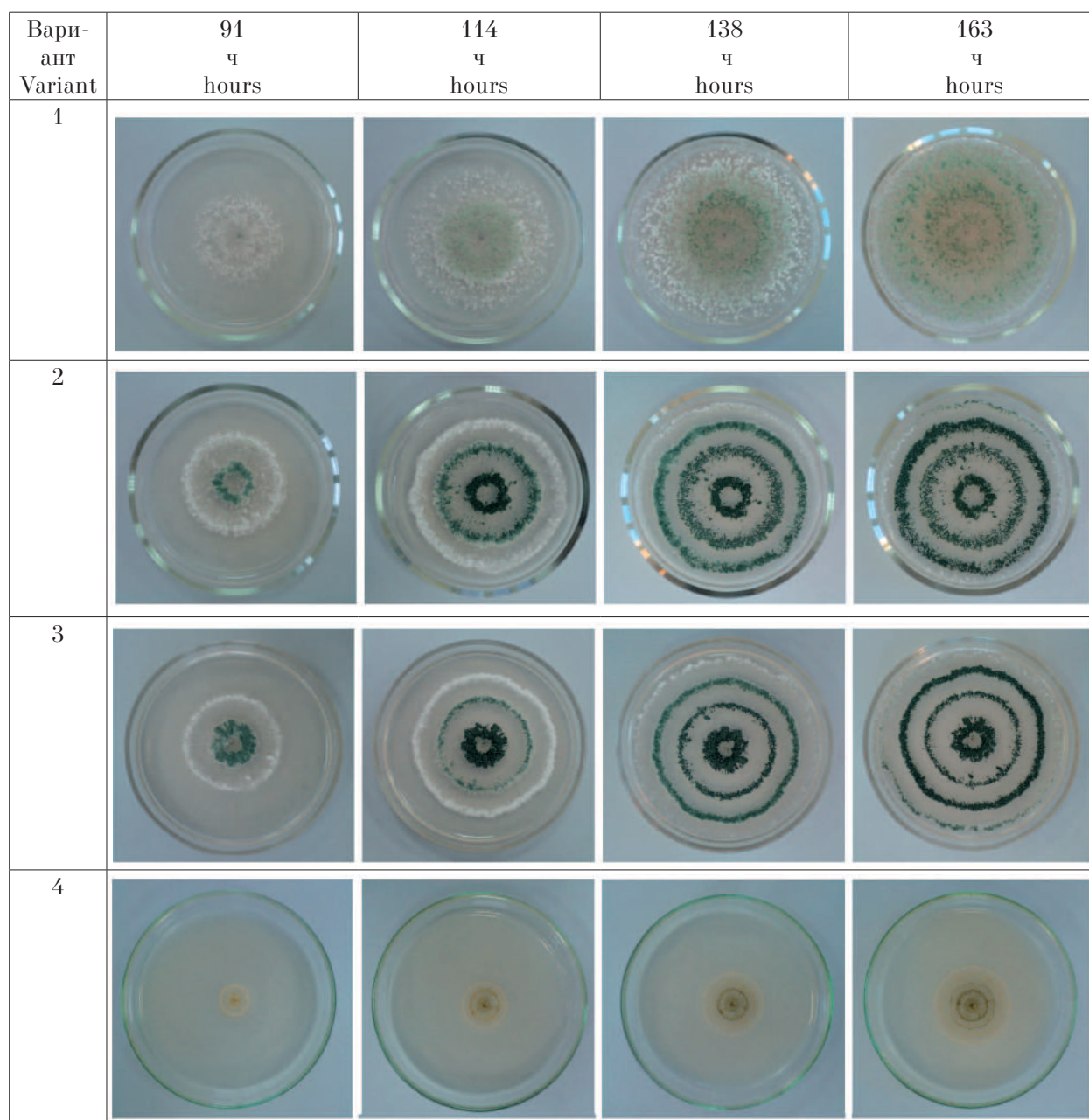
Самую низкую динамику роста все микромицеты показали при выращивании на отваре трутовика окаймленного (табл.).

П. А. Стариков, Л. И. Домрачева, С. Г. Скугорева  
 «Сравнительная оценка питательных сред  
 для культивирования микромицетов рода *Trichoderma*». С. 44.



**Рис. 2.** Рост *Trichoderma* spp. на различных питательных средах спустя 163 ч с момента инокуляции: 1 – бобовый агар, 2 – картофельный агар, 3 – картофельно-сахарозный агар, 4 – среда Чапека, 5 – агаризованный отвар трутовика  
**Fig. 2.** Growth of *Trichoderma* spp. on various nutrient media after 163 hours from the moment of inoculation: 1 – bean agar, 2 – potato agar, 3 – potato-sucrose agar, 4 – Chapek medium, 5 – agarized broth of polypore

**П. А. Стариков, Л. И. Домрачева, С. Г. Скугорева**  
**«Сравнительная оценка питательных сред**  
**для культивирования микромицетов рода *Trichoderma*». С. 44.**



**Рис. 3.** Динамика роста триходеры на бобовом агаре после 3-х суток с момента инокуляции (91, 114, 138 и 163 ч) в различных вариантах: 1) *Trichoderma lignorum* T13-82 из биопрепарата «Триходермин-БЛ»; 2) изолят *Trichoderma* sp. К-01Т; 3) изолят *Trichoderma* sp. К-01Д; 4) *Trichoderma* sp., деструктор сэвилена

**Fig. 3.** *Trichoderma* growth dynamics on bean agar after 3 days from the moment of inoculation (91, 114, 138 and 163 hours) in different variants: 1) *Trichoderma lignorum* T13-82 from the biopreparation “Trichodermin-BL”; 2) isolate *Trichoderma* sp. K-01T; 3) isolate of *Trichoderma* sp. K-01D; 4) *Trichoderma* sp., savilen destructor

Заметное отставание в линейном росте *Trichoderma* sp., вероятно, можно объяснить тем, что при 10-летнем росте на сэвилене произошли глубокие изменения метаболических возможностей этого штамма, связанные с использованием в качестве источника углеродного питания исключительно трудноусвояемого синтетического полимера.

При этом во всех вариантах культивирования грибов р. *Trichoderma* отмечалось постоянство показателя линейной скорости роста на протяжении всего процесса культивирования микромицетов (рис. 3, см. цв. вкладку II).

Полученные экспериментальные данные по скорости роста и моменту начала спороношения для большинства испытанных штаммов согласуются с результатами других исследований [19].

### Заключение

Изучали характер роста на различных питательных средах 4-х штаммов микромицетов р. *Trichoderma*: изолят К-01Т отобран с плодового тела трутовика, *Trichoderma* sp. К-01D выделен с коры берёзы, *Trichoderma* sp., в течение 10 лет экспонировался в водной среде в замкнутой системе, где единственным источником углерода являлся полимер сэвилен, и *T. lignorum* Т13-82 из коммерческого биопрепарата «Триходермин-БЛ». Культивирование данных штаммов проводили на 5 питательных средах: бобовом, картофельном и картофельно-сахарозном агаре, среде Чапека и агаризованном отваре трутовика окаймлённого.

Показано, что для всех штаммов триходермы, кроме растущего на сэвилене, максимальная скорость роста наблюдается на бобовом (в пределах 23–24 мм/сут) и картофельно-сахарозном агаре (20–21 мм/сут). На классической среде Чапека высокая скорость роста отмечена для вновь выделенных штаммов, но минимальна – для эталонного. В то же время на агаризованном отваре трутовика отмечалась минимальная скорость роста всех исследуемых микромицетов (10–12 мм/сут).

Испытание среды бобовый агар показало, что в дальнейшем её можно успешно использовать для культивирования триходермы при изготовлении многокомпонентных биопрепаратов, с партнёрством *Trichoderma* sp. и *Rhizobium* sp.

Особое поведение зарегистрировано у *Trichoderma* sp., деструктора сэвилена, которая существенно отставала в росте на всех питательных средах от остальных штаммов.

Таким образом, используя различные вновь выделенные штаммы микромицетов р. *Trichoderma* и комбинируя питательные среды для её выращивания, в дальнейшем биомассу гриба можно применять в нескольких направлениях. В частности, для создания комбинированных биопрепаратов с бактериями р. *Rhizobium* для предпосевной обработки семян бобовых. Классическое использование – создание новых препаратов с аборигенными штаммами триходермы против фитопатогенов. Возможно испытание триходермы как деструктора пластмасс. Выявление триходермы в числе эпифитной микробиоты на коре берёзы открывает возможность её дальнейшего тестирования в качестве антисептической обработки для защиты древесины от микробного повреждения.

*Работа выполнена в рамках государственного задания ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН по теме «Структура и состояние компонентов техногенных экосистем подзоны южной тайги» рег. № 1021051202042-2-1.6.19.*

### References

1. Kireeva N.A., Kuzyakhmetov G.G., Miphtakova A.M., Vodopyanov V.V. Phytotoxicity of antropogenic polluted soil. Ufa: Publishing house "Hilem", 2003. 266 p. (in Russian).
2. Marphenina O.E. The antropogenic ecology of soil fungi. Moskva: Medicine for everyone, 2005. 196 p. (in Russian).
3. Gromovykh T.I., Sadykova V.S., Alimova F.K. Micromycetes of the genus *Trichoderma* Pers.: Scientific rationale for use in agro-industrial complex technologies. Moskva: MSUFP, 2014. 189 p. (in Russian).
4. Domracheva L.I., Ashikhmina T.Y., Kondakova L.V., Berezin G.I. Reaction of soil microbiota to pesticides (review) // Theoretical and Applied Ecology. 2012. No. 3. P. 4–18 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2012-3-004-018
5. Svistova I.D. Chernozem micromycetes are producers of cellulolytic enzymes. Voronezh: izdatelstvo Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta, 2003. 152 p. (in Russian).
6. Ashikhmina T.Ya., Kolupayev A.V., Shirokikh A.A. Pesticides biotransformation in ground ecosystems (book review) // Theoretical and Applied Ecology. 2010. No. 2. P. 4–12 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2010-2-004-012
7. Domracheva L.I. Territory remediation with the help of organisms and biosystems // Theoretical and Applied Ecology. 2009. No. 4. P. 4–16 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2009-4-004-016

8. Shirokikh A.A., Shirokikh I.G., Ustyuzhanin I.A., Kolupayev A.V. Microscope fungi in city soils polluted with heavy metals // Theoretical and Applied Ecology. 2009. No. 4. P. 39–44 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2009-4-039-044
9. Cobas M., Ferreira L., Tavares T., Sanroman M.A., Pazos M. Development of permeable reactive biobarrier for the removal of PAHs by *Trichoderma longibrachiatum* // Chemosphere. 2013. V. 91. No. 5. P. 711–716. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.028
10. Skugoreva S.G., Gornostaeva E.A., Burkov A.A., Kutuyavina T.I., Yuzhanin K.I., Domracheva L.I., Ashikmina T.Y. Possibility of disposed of plastic waste using micromycetes *Fusarium solani* and *Trichoderma lignorum* // Theoretical and Applied Ecology. 2021. No. 4. P. 193–202 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2021-4-193-202
11. Woo S.L., Ruocco M., Vinale F., Nigro M., Marra R., Lombardi N., Pascale A., Lanzuise S., Manganiello G., Lorigato M. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture // The Open Mycology Journal. 2014. V. 8. No. 18. P. 71–126. doi: 10.2174/1874437001408010071
12. Pavlyushin V.A., Tyuterev S.L., Popova E.V., Novikova I.I., Bykova G.A., Domnina N.S. New complex biopreparations for the protection of vegetable crops from fungal and bacterial diseases // Biotechnology. 2010. No. 4. P. 69–80 (in Russian).
13. Kakvan N., Heydari A., Zamanizadeh H.R., Rezaee S., Naraghi L. Development of new bioformulations using *Trichoderma* and *Talaromyces* fungal for biological control of sugar beet damping-off disease // Crop. Prot. 2013. V. 53. P. 80–84.
14. Tanwar A., Aggarwal A., Panwar V. Arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma viride* mediated *Fusarium* wilt control in tomato // Biocontr. Sci. and Technol. 2013. V. 23. No. 5–6. P. 485–498. doi: 10.1080/09583157.2013.772561
15. Jahan N., Sultana S., Adhikary S.K., Rahman S., Yasmin S. Evaluation of the growth performance of *Trichoderma harzianum* (Rifai.) on different culture media // IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science. 2013. V. 3. No. 4. P. 44–50. doi: 10.9790/2380-0344450
16. Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M. The determinant of pathogenic and conditionally pathogenic fungi. Moskva: Mir, 2001. 468 p. (in Russian).
17. Netrusov A.I., Egorov M.A., Zakharchuk L.M. Workshop on microbiology. Moskva: Academy, 2005. 608 p. (in Russian).
18. Ziganshin D.D., Sirotkin A.S. Features of deep and surface cultivation of *Trichoderma* fungi to obtain biological products based on fungal cells // Bulletin of the Kazan Technological University. 2017. V. 20. No. 10. P. 155–158 (in Russian).
19. Voitka D.V., Yuzefovich E.K. Biotechnological aspects of the development of a microbial preparation based on the antagonist fungus *Trichoderma* sp. IZR D–11 BIM F–457 D // Biotechnology: achievements and development prospects: sbornik materialov I mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii / Eds.: K.K. Shebeko, A.A. Volotov, A.I. Kozlov, O.N. Zhuk, A.G. Chernetskaya, O.V. Nilova, V.O. Lemeshevskiy, E.O. Yurchenko. Pinsk: PolesGU, 2014. P. 114–116 (in Russian).