РОЛЬ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ИСТОЧИКОВ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ ДЛЯ ГИФОМИЦЕТА *LECANICILLIUM LECANII* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ЖИДКИХ СРЕДАХ ГЛУБИННЫМ МЕТОДОМ

THE ROLE OF INORGANIC NITROGEN SOURCES IN THE NUTRITION OF HYPHOMYCETE *LECANICILLIUM LECANII* DURING SUBMERGED CULTIVATION IN LIQUID MEDIA

CZU: 579.64:632.937 **https://doi.org/10.59295/spd2025e.26**

Татьяна ЩЕРБАКОВА
ORCID: 0000-0002-2632-325X
E-mail: tatiana.scerbacova@sti.usm.md
Молдавский государственный университет, Кишинэу, Республика Молдова

Summary. *The nutrient medium was optimized by the nitrogen source to obtain an effective insecticidal biopreparation for plant protection based on the hyphomycete L. lecanii. The present study used a basic liquid molasses-sucrose nutrient medium with the addition of ammonium nitrate (NH_4NO_3) and sodium nitrate ($NaNO_3$) in an amount of 3 g/L. No inorganic nitrogen source was added to control samples. The hyphomycete was cultured using the submerged method on a shaker at 200 rpm and 24°C for 96 hours. At the end of cultivation, the titer of the obtained suspensions was determined in a Goryaev chamber. Each sample was examined in the field of view of a microscope in a „crushed drop" preparation. As a result, the use of ammonium nitrate yielded a conidial suspension with a high titer of 1,0 × 10⁹ spores/mL, effective for protecting plants from sucking pests under greenhouse conditions. Nitrogen-containing components play a crucial role in enhancing the quality of a liquid biopreparation based on L. lecanii by promoting fungal growth, development, and mycelial maturation, ultimately leading to the production of a high-titer conidial suspension.*

Keywords: *insecticidal activity, Lecanicillium lecanii, nutrient medium, sources of nitrogen nutrition, titer.*

ВВЕДЕНИЕ

Для защиты растений от вредителей и болезней чаще всего используют химические пестициды. Несмотря на высокую эффективность в подавлении численности вредных организмов, химические пестициды одновременно влияют на полезные нецелевые объекты, вызывают развитие резистентности у вредителей и фитопатогенов, что приводит к нежелательному увеличению норм расхода химикатов.

Особенно остро стоит вопрос защиты растений в условиях закрытого грунта, где ассортимент разрешенных к применению пестицидов значительно снижен из-за быстрого загрязнения воздушного пространства теплиц и накопления токсиче-

ских остатков в овощной продукции. Несмотря на то, что количество видов вредителей в теплицах значительно меньше, чем в открытых агроценозах, благоприятные условия для выращивания растений (регулирование температуры, влажности, освещенности, минерального состава субстрата и круглогодичное использование теплиц) дают возможность вредителям воспроизводить потомство со стремительной скоростью и усиливать вредоносность. Комплекс вредителей закрытого грунта во всех тепличных производствах, практически, одинаков. Это паутинный клещ, оранжерейная белокрылка, бахчевая, персиковая, бобовая тля, трипсы, галловые нематоды – потери урожая от них могут достигать от 30-40% до 80% [1, 2].

В последние десятилетия приоритетным направлением защиты растений от вредных организмов является контроль и безопасность применения химических пестицидов, снижение негативного действия на окружающую среду. Сельское хозяйство многих стран изменило концепцию защиты растений с ориентацией на биологизацию и экологизацию фитосанитарных мероприятий в агроценозах [3].

Альтернативой химическим средствам защиты растений являются биопестициды на основе живых микроорганизмов с высокой вирулентностью и продуктов их метаболизма (антибиотики, токсины, ферменты и др.). Интерес к биопестицидам растет из-за их преимуществ, связанных с экологической безопасностью, целевой специфичностью и эффективностью применения в малых количествах для комплексной борьбы с вредителями, и это одна из многообещающих альтернатив для борьбы с загрязнением окружающей среды.

Важным этапом в получении эффективных биопрепаратов является подбор оптимальной питательной среды для культивирования биологических агентов. Модификация основных источников питания (углерод, азот) среды по компонентному и весовому составу способствует образованию биологически активных веществ, оказывающих разное действие (усиление либо ослабление) на вредные организмы, в отношении которых проявляли антагонизм или паразитизм [4].

Цель исследований: определить роль неорганических источников азотного питания нитрата аммония (NH_4NO_3) и нитрата натрия ($NaNO_3$) для гифомицета *Lecanicillium lecanii* при культивировании в жидких средах глубинным методом для получения эффективного биологического инсектицида для защиты тепличных культур от сосущих вредителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в Институте Генетики, Физиологии и Защиты Растений в составе Молдавского государственного университета в 2024 году. Объект исследований: энтомопатогенный гриб *Lecanicillium lecanii* R. Zare & W. Gams (2001), штамм 2T20, коллекционный номер в Национальной коллекции CNMN-FE-03, выделен из природной популяции оранжерейной белокрылки с последующим отбором методом пассажей через тест-насекомое. Проведено три пассажа через

обыкновенного паутинного клеща и три пассажа через бахчевую тлю, штамм проявляет патогенность в отношении оранжерейной белокрылки.

Для определения роли компонентов питательной среды нитрата аммония и нитрата натрия в получении эффективного биопрепарата на основе гифомицета *L. lecanii*, в исследованиях использовали базовую жидкую мелассно-сахарозную питательную среду с добавлением указанных компонентов в количестве 3 г/л. В контроле неорганический источник азота не добавляли. Гифомицет культивировали глубинным методом на шейкере со скоростью вращения 200 об/мин при температуре 24^0C в течение 96 часов. По окончании культивирования у полученных суспензий определяли титр в камере Горяева (рис. 1), каждую пробу просматривали в поле зрения микроскопа - препарат «раздавленная капля» [5].

Для определения титра необходимо приготовить серию разведений полученных суспензий: 1 мл суспензии пипеткой вносили в 99 мл воды, тщательно размешивали. Это разведение 10^{-2}. При необходимости можно делать разведения 10^{-3} и т.д. Покровное стекло помещали на опорные площадки камеры Горяева и притирали до появления радужных «колец Ньютона». Пипеткой вводили разведение суспензии в бороздку камеры под обе площадки, на которые нанесена сетка квадратов. В поле зрения микроскопа подсчитывали количество конидий в 10-ти больших квадратах (несколько повторностей). Титр считали по формуле:

$T = 25\times10^4 \times a \times n$, где
T – титр
a – среднее количество конидий в одном квадрате
n – разведение суспензии (10^{-2})
25×10^4 – постоянный коэффициент

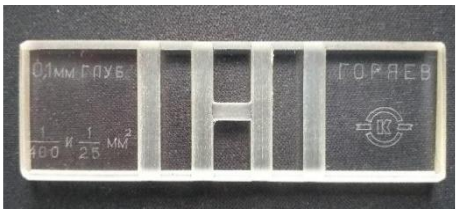


Рис. 1. Камера Горяева

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Энтомопатогенный гифомицет *Lecanicillium lecanii* R. Zare & W. Gams (2001) впервые был описан в 1899 году (Zimmermann) как *Cephalosporium lecanii*, впоследствии был отнесен к роду *Verticillium* (Zimm.) Viegas (1939), в настоящее время утвержденным названием рода является *Lecanicillium*, к которому могут относиться изоляты *L. lecanii, L. attenuatum, L. longisporum, L. muscarium* или *L. nodulosum.* Энтомопатоген является представителем отдела *Ascomycota*, класса *Sordariomycetes*, отряда *Hypocreales*, семейства *Cordycipitaceae* [6].

Гифы гриба тонкие, прозрачные, септированные, конидиеносцы образуются из воздушных гиф, короткие прямостоячие, несут одну или две мутовки фиалид. В стелющихся конидиеносцах число мутовок может быть неограниченно. Фиалиды игловидные, суженные к вершине, расположены под острым углом на главной оси конидиеносца, по 2-5 штук в мутовке. На верхушке фиалид образуются кони-

диальные головки со склеенными в них конидиями. Конидии многочисленные, эллипсоидальные, одноклеточные, 2,5-3,5×1-1,5 μm. Оптимальная температура для роста 21-24ºС, при 33ºС рост гриба отсутствует [6].

На агаризованных питательных средах гифомицет растет медленно. На картофельно-декстрозном и картофельно-сахарозном агарах при посеве блоком образуются колонии белого цвета округлой формы, воздушный мицелий хорошо развит, пышный, пушистый, реверс бежевый. Колония достигает размера 80×80 мм через 4-5 недель. При посеве газоном полное зарастание агаровой пластинки отмечено на 4-5 сутки. На среде солодовый агар штамм образует белые колонии круглой формы, профиль выпуклый, консистенция бархатистая, край реснитчатый, обратная сторона коричневая. На 15-е сутки роста при температуре 24ºС диаметр колонии достигает 35-45 мм, среду колонии не окрашивают, иногда выделяют экссудат, радиальная складчатость и зональность не выражена. Начало спороношения отмечено на 5-е сутки, обильное – на 10-15-е сутки. На среде Чапека штамм образует белые колонии правильной округлой формы, мицелий белый, тонкий, ползучий, развит слабо [7].

Гифомицет *L. lecanii* 2Т20 является возбудителем микозов тлей, белокрылок, клещей. При попадании гриба на тело вредителя происходит прорастание конидий и ростовая трубка внедряется в хитиновый покров насекомого, образуя апрессории. В полости тела образуются гифальные тела – бластоспоры, которые разносятся по телу вредителя, гриб продуцирует токсины, приводящие хозяина к гибели, после чего происходит колонизация грибом внутренних органов. После гибели насекомого гифы энтомопатогена прорастают на поверхность кутикулы и труп обрастает белым мицелием гриба *L. lecanii* [6].

Для получения эффективного инсектицидного биопрепарата для защиты растений на основе гифомицета *L. lecanii*, необходимо оптимизировать питательную среду по основным критериям: полноценный компонентный состав, доступность и невысокая стоимость питательного субстрата. Основными факторами для оптимизации среды являются концентрация источников азота и углерода, температура, кислотность (pH), способ и продолжительность культивирования. Показателем качества является титр готового препарата, т. е. количество живых конидий (спор) в 1 мл [8] и инсектицидная активность.

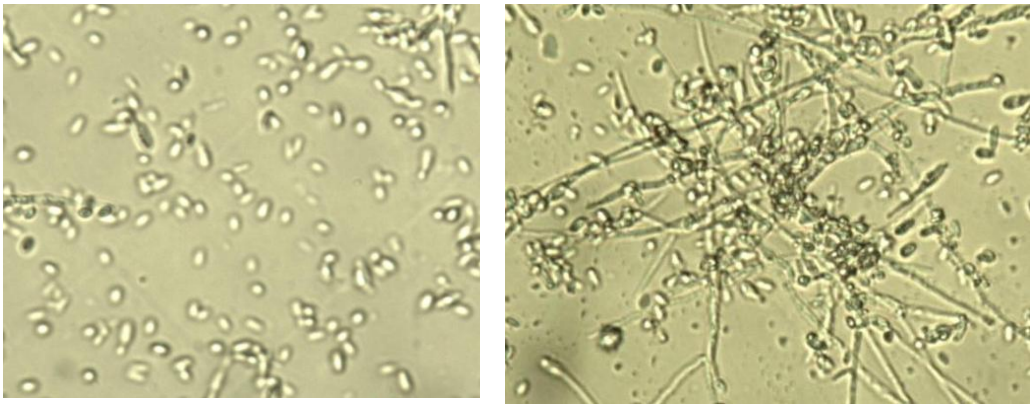
В нашей работе нерешенным остался вопрос определения наиболее эффективного неорганического источника азотного питания для гифомицета *L. lecanii* при культивировании в жидких средах и его роли для получения качественного биопрепарата с высоким титром.

Согласно результатам определения титра после завершения процесса культивирования *L. lecanii*, более высокий титр отмечен в суспензии с компонентом NH_4NO_3 и составил $1,0\times10^9$ спор/мл. Титр суспензии с содержанием $NaNO_3$ составил $0,7\times10^9$ спор/мл. Титр суспензии без неорганического азота составил $0,4\times10^9$ спор/мл, табл. 1.

Таблица 1. Определение титра суспензий в камере Горяева

№	**Число спор в 1-м квадрате камеры Горяева в суспензии с содержанием**								
	NH_4NO_3			**$NaNO_3$**			**Контроль, без азота**		
	повторности								
	1	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**
1	40	44	39	20	37	33	16	19	17
2	37	42	37	33	32	26	10	13	16
3	36	39	47	37	24	32	16	31	14
4	43	40	42	27	29	26	21	21	20
5	39	44	38	26	24	34	16	17	17
6	41	41	40	22	31	23	23	11	22
7	43	39	34	29	26	27	17	14	19
8	38	42	40	25	23	37	12	25	16
9	37	40	42	33	28	24	21	20	20
10	40	40	43	32	27	35	12	17	15
Ср.	39,4	41,1	40,2	28,4	28,1	29,7	16,4	18,8	17,6
Среднее в пробе 40,2				28,7			17,6		
Титр, спор/мл $1,0\times10^9$				$0,7\times10^9$			$0,4\times10^9$		

При просмотре в микроскоп препаратов «раздавленная капля», суспензия без содержания азота состояла из большого количества мицелия, который не успел за 96 часов при непрерывном вращении на шейкере со скоростью 200 об/мин и постоянной температуре 24^0C максимально развиться из посевного материала, созреть и рассыпаться на конидии, что отмечено у суспензии с использованием нитрата аммония NH_4NO_3. В суспензии с нитратом натрия $NaNO_3$ также наблюдался мицелий, но в меньшем количестве, рис. 2.



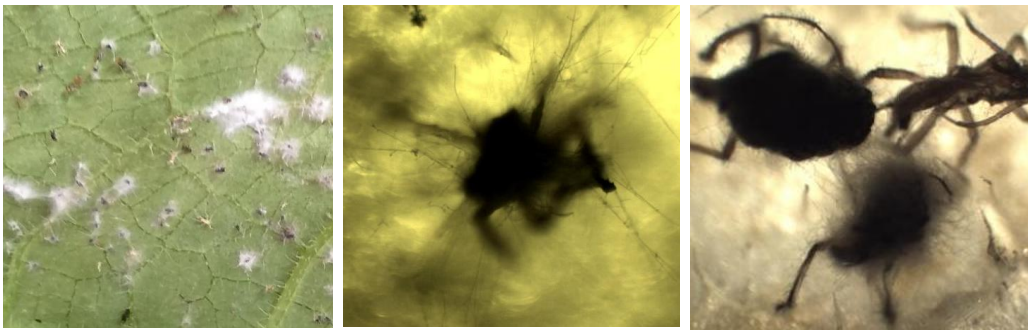
a) b)

Рисунок 2. Суспензия *L.lecanii* после культивирования на шейкере в течение 96 часов: a) с содержанием NH_4NO3, b) – без содержания азота

Суть применения конидиального препарата с минимальным количеством несозревшего мицелия продуцента *L.lecanii* состоит в механизме действия после попадания препарата на вредителя: более быстрое прорастание отдельных конидий в тело вредителя. Конидиальный препарат может обеспечить мелкокапельный распыл, равномерное покрытие и распределение на обрабатываемых поверхностях, в том числе попадание в труднодоступные места. Мелкие капли лучше смачивают листья и стебли растений, что способствует лучшему проникновению препарата в растения и целевые объекты. При мелкокапельном распыле на единицу площади попадает больше частиц препарата, что повышает вероятность контакта с вредными организмами и повышает эффективность защитных мероприятий, особенно с мелкими вредителями, такими как паутинный клещ. Мелкие капли менее подвержены стеканию с поверхности листьев, при этом уменьшаются потери препарата. Важным моментом является сохранность оборудования в рабочем состоянии от попадания мицелиальных сгустков.

Таким образом, из двух неорганических источников азотного питания для гифомицета *L. lecanii* при культивировании в жидких средах для получения качественного биологического препарата, выбран нитрат аммония NH_4NO_3 – с высоким титром $1{,}0\times10^9$ спор/мл, доступный и недорогой компонент питательного субстрата.

Инсектицидную активность суспензии с содержанием NH_4NO_3 определяли в отношении бахчевой тли и обыкновенного паутинного клеща на растениях огурца гибрида *Mirebelle* в условиях теплицы. Применяли методом опрыскивания, исходную суспензию разбавляли водой до получения титра 10^6 - 10^7 спор/мл, или 3,5% -я концентрация *L. lecanii.* Спустя 14 дней на вредителях отмечен выросший гриб *L. lecanii,* при просмотре в микроскоп на особях клеща и тли отмечен разрастающийся мицелий гриба, рис. 3.



a) b) c)

Рисунок 3. Поражение вредителей гифомицетом *L. lecanii.* a) – бахчевая тля, обросшая мицелием гриба на листе огурца, b) – паутинный клещ, ×100 и c) бахчевая тля, ×40, в поле зрения микроскопа, развитие мицелия на телах вредителей

ВЫВОДЫ

Из проведенных исследований следует, что роль азотосодержащих компонентов для качества жидкого биопрепарата на основе гриба *L.lecanii* состоит в ускорении роста, развития и созревания мицелия и получения конидиального препарата с высоким титром и однородной консистенцией. Ускоренное развития мицелия в питательной среде оказывает влияние на общую стоимость препарата – уменьшение периода культивирования и снижение затрат на энергоресурсы.

БИБЛИОГРАФИЯ:

1. ГОРЯНИКОВ, Ю.В. *Вредители и болезни закрытого грунта*. Учебное пособие. Черкесск, 2022, 180 с.
2. BARATHI S., SABAPATHI N., KANDASAMY S., LEE J. Present status of insecticide impacts and eco-friendly approaches for remediation-a review. In: J. Environmentaln Research, 2024, v. 240, Part 1, p. 117432.
3. ДОЛЖЕНКО, Т.В. Биологизация и экологическая оптимизация средств защиты сельскохозяйственных культур от вредителей. Дисс. на соискание уч. степени доктора биол. наук. Санкт-Петербург, 2017, с. 301.
4. ШТЕРНШИС, М.В. Тенденции развития биотехнологии микробных средств защиты растений в России. Вестник Томского государственного университета. Биология. 2012. № 2 (18). С. 92–100. ISSN 2311-2077.
5. БЕХТЕР, И., ВЕТЦЕЛЬ, Т., ДРЕВС, Ф.В. и др. Методы определения болезней и вредителей сельско-хозяйственных растений. Москва: Агропромиздат, 1987, 224 с.
6. ZARE R. and GAMS W. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. In: Nova Hedwigia. 2001. v. 73 (1), p. 1-50.7. ЩЕРБАКОВА, Т. Гифомицет *Lecanicillium lecanii* для защиты растений от сосущих вредителей и фитопатогенов в условиях теплицы. In: J. Studia Universitatis Moldaviae, seria Științe reale și ale naturii, nr. 6(176), 2024, p. 19-27. ISSN 1814-3237. (Cat. B).
7. ЕГОРОВ, Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: МГУ, 1995, 224 с.

N.B. *Исследования проведены в рамках проекта Подпрограммы 011103 «Elaborarea mijloacelor ecologic inofensive de reducere a impactului organismelor dăunătoare ale culturilor agricole pe fondalul schimbărilor climatice».*