

УДК 630\*411:636.087.24

**И. Н. Кузнецов, Н. С. Ручай**

Белорусский государственный технологический университет

**ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА  
ДЛЯ ЗАЩИТЫ ЛЕСА НА ОСНОВЕ ГРИБА *PHLEBIOPSIS GIGANTEA*  
ГЛУБИННЫМ КУЛЬТИВИРОВАНИЕМ НА ПОСЛЕСПИРТОВОЙ БАРДЕ**

В республике Беларусь, также как и в мировой практике, остро стоит проблема защиты леса от болезней и вредителей. Ущерб, наносимый корневыми гнилями, играет существенную роль, поэтому проблема защиты леса представляет собой актуальную задачу. Наибольшие перспективы, в сравнении с традиционными методами борьбы, имеют биопрепараты.

Исследован глубинный метод культивирования гриба *Phlebiopsis gigantea* с использованием питательных сред на основе отхода производства этанола – послеспиртовой барды и ее компонентов (фугата). Показана целесообразность применения послеспиртовой барды в качестве сырья в производстве биопрепарата для защиты леса от корневой гнили. Изучено влияние различных добавок (опилки, кормовые дрожжи) на процесс накопления активных форм биопрепарата – оидий. Было определено, что при глубинном культивировании самый высокий уровень накопления оидий ( $1,5 \cdot 10^6$  шт./мл) был достигнут при использовании древесных опилок. Также было установлено, что барда является лучшей питательной средой для накопления биомассы гриба (7,9–9,8 г/л) в сравнении с фугатом (6,0–6,6 г/л).

На основе проведенных исследований разработана технологическая схема получения биопрепарата.

**Ключевые слова:** поражение леса корневыми гнилями, биопрепарат для защиты леса, *Phlebiopsis gigantea*, глубинное культивирование, оидии, послеспиртовая барда.

**I. N. Kuznetsov, N. S. Ruchay**

Belarusian State Technological University

**TECHNOLOGY OF BIOLOGICS FOR THE PROTECTION OF FORESTS  
ON THE BASIS OF MUSHROOM *PHLEBIOPSIS GIGANTEA* WITH DEEP  
CULTIVATION ON ALCOHOL STILLAGE**

In the Republic of Belarus as well as in the world acute problem of protecting forests from diseases and pests. The damage caused by root rot is essential, therefore, the problem of forest protection is an urgent task. The biologics has the greatest prospects in according with traditional methods of struggle.

Deep method of cultivation of a mushroom *Phlebiopsis gigantea* with use of nutrient mediums on the basis of ethanol stillage and its components (fugat) is researched. Feasibility of use stillage as raw materials in production of a biological product for the wood protection against root decay is shown. The effect of different additives (sawdust, fodder yeast) on the accumulation of reactive biological product – oidy is researched. It was determined that the deep cultivation using sawdust of the highest accumulation oidy ( $1.5 \cdot 10^6$  units / ml) was achieved. It was also found that the stillage is the best breeding ground for fungus biomass accumulation (7.9–9.8 g / l) versus fugat (6.0–6.6 g / l).

On the basis of research work the technological scheme for production of a biological product were developed.

**Key words:** forest loss by root rots, biologics for the forests protection, *Phlebiopsis gigantea*, deep cultivation, oidii, alcohol stillage.

**Введение.** Из всех растительных ресурсов Земли самое важное значение в природе и жизни человека имеют леса. Леса, в том числе посаженные человеком, занимают площадь около 40 млн. км<sup>2</sup>, или около 1/3 поверхности суши и оказывают влияние на все компоненты биосферы.

Леса выполняют ряд важных природных функций: очищают воздух, создают места обитания животных, защищают почву от эрозии, задерживают осадки (уменьшают поверхностный сток), создают благоприятный микроклимат

для сельскохозяйственных растений, закрепляют пески, препятствуют загрязнению водоемов.

Все леса подлежат охране от пожаров, незаконных вырубок, нарушений установленного порядка лесопользования и других действий, причиняющих вред лесу, а также защите от вредных насекомых и болезней [1].

Повреждение и поражение лесов вредными насекомыми и болезнями наносит большой ущерб народному хозяйству страны в виде потерь текущего прироста древесины, усыхания

и деградации древостоев, снижения их природоохранных, водозащитных и агролесомелиоративных функций.

Защита леса – обязательная составная часть лесозащиты, целью которой является поддержание, сохранение и повышение ресурсного потенциала и биологического разнообразия лесов, являющихся не только отечественным, но и мировым богатством [2].

Ущерб, наносимый лесному хозяйству всего мира корневыми гнилями, огромен. Проблеме корневых гнилей посвящено значительное количество научно-исследовательских работ, позволивших получить подробные сведения о биологии, распространенности и вредоносности возбудителей.

В нашей стране и за рубежом остро стоит вопрос разработки эффективных методов и средств защиты лесных насаждений от корневых гнилей [3].

Существует несколько способов борьбы с корневой губкой, таких как обработка химическими агентами, санитарные рубки леса и биологические методы. Наиболее эффективным и экологичным является использование микробных препаратов.

Традиционно биопрепараты для защиты леса от корневых гнилей в мировой практике производят путем периодического поверхностного культивирования. При этом перспективой имеет глубинное культивирование с использованием в качестве сырья дешевых отходов пищевых производств, например послеспиртовой барды.

**Основная часть** Объектом исследования являлся штамм гриба *Phlebiopsis gigantea* из музея культур микроорганизмов кафедры лесозащиты и древесиноведения Белорусского государственного технологического университета.

В экспериментах исследовали рост гриба на жидких питательных средах с различными добавками. Жидкие среды готовили на основе послеспиртовой барды и фугата барды, полученного разделением послеспиртовой барды с ОСП ПЦ «Березинский спиртовой завод» центрифугированием при 5000 г в течение 10 мин. Для обогащения питательных сред использовали сухие кормовые дрожжи, мелассу и опилки – стимуляторы образования оидий [4].

Были использованы следующие среды и реактивы: сусло-агар, NaOH 1M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M.

Исходный посевной материал получали наращиванием биомассы гриба в чашках Петри на сусло-агаре при температуре 22–25°C. На 9–10-е сутки культивирования гриб покрывает всю поверхность питательной среды в чашке Петри. Воздушный мицелий гриба распадается с образованием большого количества вегетативных клеток-оидий.

Глубинное культивирование гриба осуществляли в колбах объемом 250 мл (200 мл жидкой питательной среды) с механическим перемешиванием магнитной мешалкой. Исследуемые жидкие питательные среды засеивали культурой по методу агаровых блоков, вырезанных с поверхности агаризованной среды.

Для обогащения жидких питательных сред использовали сухие кормовые дрожжи, мелассу и опилки (стимуляторы образования оидий).

Величина pH исходных сред 4,2–4,5, температура культивирования 22–25°C продолжительность – до 12 сут.

**Определение количества сухой массы мицелия гриба.** Концентрацию сухой биомассы гриба в культуральной жидкости определяли весовым методом с отделением мицелия фильтрованием с последующим высушиванием до постоянной массы при 105°C.

Количество оидий в культуральной жидкости подсчитывали в камере Горяева.

**Результаты исследований и их обсуждение.** В мировой практике препараты разрушающих грибов для защиты хвойных насаждений от корневой губки получают главным образом поверхностным культивированием грибов на твердых средах, которые обеспечивают образование в поверхностном слое мицелия большого количества жизнеспособных спор – оидий, показанных на рис. 1.



Рис. 1. Оидии *Phlebiopsis gigantea*

Оидии сохраняют свою активность при определенных условиях в течение 5–6 мес.

Производство таких препаратов затруднено сложным составом питательных сред, содержащих древесные опилки, картофельную муку, пептон,

мелассу и другие компоненты, а также трудоемкостью производства и низкой производительностью растительных установок. Более производительным и гораздо менее трудоемким является глубинный метод культивирования грибов. Однако в этом случае необходим подбор состава питательной среды, обеспечивающей достаточно высокий уровень образования оидий.

Эксперименты по глубинному культивированию гриба *Phlebiopsis gigantea* в колбах с жидкой питательной средой на основе послеспиртовой барды показали, что барда является полноценной питательной средой, обеспечивающей высокий уровень накопления биомассы гриба, составляющий 6,0–9,8 г/л среды при продолжительности культивирования 12 сут.

Как свидетельствуют полученные данные, представленные в табл. 1, фугат барды в сравнении с натуральной послеспиртовой бардой обеспечивает меньший уровень накопления биомассы гриба (6,0–6,6 г/л), но при этом существенно возрастает количество оидий в культуральной жидкости (1,12–1,48 млн. на 1 мл).

Из табл. 1 видно, что самым предпочтительным стимулятором роста оидий являются опилки.

Повторный эксперимент в лабораторном ферментаторе с использованием в качестве жидкой питательной среды фугата послеспиртовой барды с добавлением опилок показал результаты, представленные в табл. 2.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что отходы производства этанола – послеспиртовая барда и ее фугат являются благоприятной и недорогой питательной средой для накопления биомассы дереворазрушающего гриба *Phlebiopsis gigantea*, что делает это сырье перспектив-

ным для производства биопрепарата, предотвращающего распространение в лесонасаждениях корневой губки.

По результатам исследований, выполненных на кафедре биотехнологии и биоэкологии БГТУ, разработана технологическая схема (рис. 2) получения биопрепарата для защиты леса путем культивирования гриба *Phlebiopsis gigantea*.

Разработанная технология предусматривает использование в качестве основного компонента питательной среды для культивирования гриба фугата послеспиртовой барды, которая является обременительным отходом в производстве этанола из зернового сырья. Как показали исследования, питательная среда на основе фугата барды обеспечивает высокий уровень накопления биомассы гриба, а присутствие в среде 5% опилок стимулирует увеличение доли оидий в культуральной жидкости.

При культивировании гриба необходимо соблюдать условия асептики, что учтено в технологической схеме (герметичный ферментатор, стерилизация питательной среды, технологического оборудования, коммуникаций и воздуха). Учитывая высокую стоимость энергоносителей, проектом предусматривается получение готового продукта не в сухом виде, а в пастообразной форме, что одновременно облегчает задачу приготовления рабочих суспензий биопрепарата при его применении.

Для улучшения потребительских свойств биопрепарата предусматривается обогащение продукта стабилизирующими добавками, повышающими жизнеспособность клеток, улучшающими прилипаемость препарата к поверхности древесины и обеспечивающими стабильность водной суспензии.

Таблица 1

**Глубинное культивирование гриба *Phlebiopsis gigantea* в качалочных колбах с механическим перемешиванием на жидких питательных средах**

Питательная среда	Количество сухой биомассы гриба, г/л	Количество оидий млн. /мл среды
Продолжительность культивирования 12 сут		
Послеспиртовая барда + 0,5% кормовых дрожжей	8,2	1,16
Фугат барды + 0,5% кормовых дрожжей	6,6	1,38
Послеспиртовая барда + 5% опилок	9,8	1,50
Фугат барды + 5% опилок	6,2	1,48
Послеспиртовая барда + 2% мелассы	7,9	0,84
Фугат барды + 2% мелассы	6,0	1,12

Таблица 2

**Глубинное культивирование гриба *Phlebiopsis gigantea* в лабораторном ферментаторе**

Параметры кульвирования	Сутки			
	3	5	8	10
Количество сухой биомассы гриба, г/л	2,7	4,0	5,1	5,9
Количество оидий, млн. шт./ мл среды	0,23	0,51	0,70	1,22

Технологическая схема получения биопрепарата для защиты леса включает следующие основные стадии: накопление посевного материала в чашках Петри на агаризованной среде, увеличение количества биомассы гриба культивированием в качалочных колбах в жидкой среде, производственная ферментация и получение товарного пастообразного продукта.

Накопление посевного материала производят засеваем оидий гриба *Phlebiopsis gigantea* на агаризованную среду (сусло-агар) с соблюдением правил асептики. Чашки Петри с засеянной средой инкубируют в течение 10 сут при температуре  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Оидии смывают с поверхности агаризованной среды стерильной водой и переносят суспензию в качалочные колбы, содержащие фугат зерновой барды и опилки.

Культивирование проводят в течение 5–6 сут при температуре  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  при механическом перемешивании среды магнитной мешалкой.

Полученным посевным материалом из качалочных колб засевают производственную среду в ферментаторе (поз. 2), оснащенном перемешивающим устройством. Технологическая схема получения биопрепарата для защиты леса путем глубинного культивирования гриба *Phlebiopsis gigantea* представлена на рис. 2.

Питательная среда производственного ферментатора представляет собой фугат после-спиртовой барды, содержащий 5% опилок.

Ферментацию осуществляют в условиях асептики при температуре  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$  и величине pH исходной среды 4,8–5,5.

Стерильный воздух получают очисткой в головном (поз. 1) и индивидуальном (поз. 8) фильтрах.

Продолжительность культивирования 10 сут с достижением концентрации биомассы гриба 1,5–2% при доле оидий 1,0–2,0 млн./мл. Отработанный воздух из ферментатора перед выбросом в атмосферу очищается в системе «циклон + фильтр сетчатый».

Культуральная жидкость из ферментатора поступает в сборник (поз. 3), из которого насосом (поз. 4) передается на рамный фильтр-пресс (поз. 5) для отделения биомассы гриба. Фильтрат культуральной жидкости собирают в сборнике (поз. 9) и используют в качестве компонента питательной среды в производстве кормовых дрожжей.

Для получения готового продукта необходимо внесение ряда добавок, повышающих срок хранения продукта, обеспечивающих защиту биомассы от ультрафиолетовых лучей, а также эффективное распределение оидий в воде и улучшение закрепления биомассы на обрабатываемых поверхностях.

В пастообразный концентрат биомассы гриба в сборнике (поз. 6) вносят при перемешивании стабилизирующие добавки: консервант (NaCl, бензоат натрия), прилипатель (карбоксиметилцеллюлоза), защитные вещества (меласса), ПАВ (сульфанол). После этого пасту направляют на розлив в пятилитровые канистры. Полученный пастообразный продукт имеет следующие характеристики: влажность не выше 75%, pH 5,0–5,5, содержание оидий гриба 1–2 млн./мл.

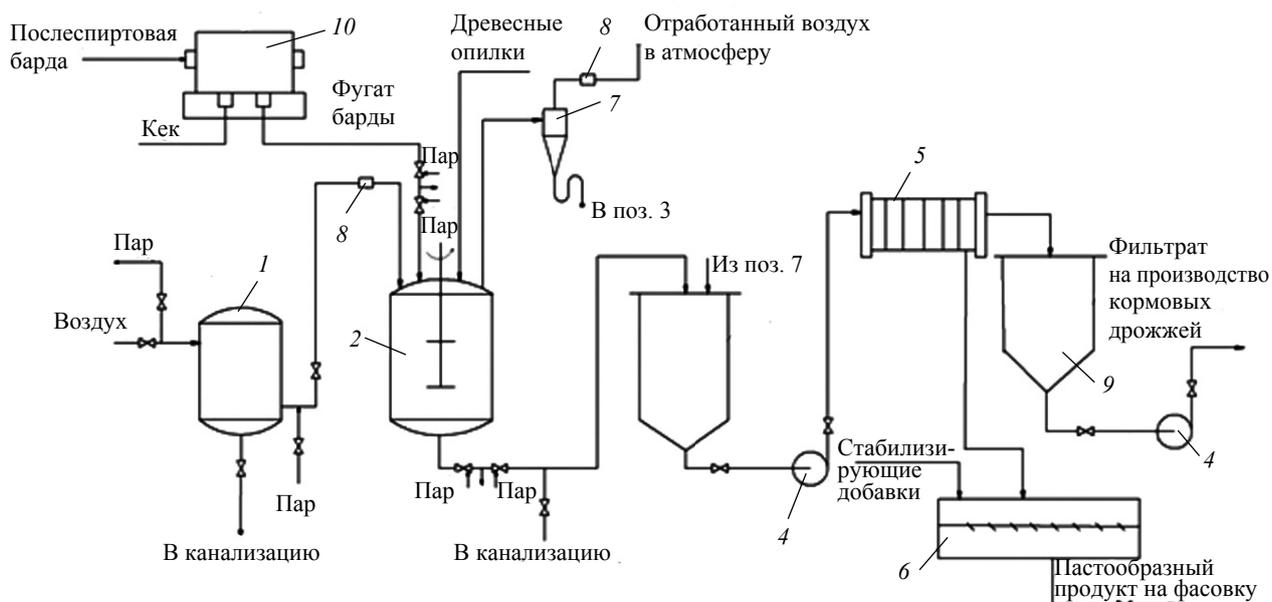


Рис. 2. Технологическая схема получения биопрепарата для защиты леса путем глубинного культивирования гриба *Phlebiopsis gigantea*:

1 – головной фильтр; 2 – ферментатор; 3 – сборник КЖ; 4 – насос; 5 – рамный фильтр-пресс; 6 – сборник; 7 – циклон; 8 – индивидуальный фильтр; 9 – сборник отфильтрованной КЖ; 10 – декантерная центрифуга

**Заключение.** Таким образом, был изучен глубинный способ культивирования гриба *Phlebiopsis gigantea* на отходах производства этанола (послеспиртовая барда, фугат барды) для получения биопрепарата для защиты леса. Глубинное культивирование осуществлялось с добавлением различных стимуляторов роста оидий: меласса, кормовые дрожжи, древесные опилки. Было определено, что при глубинном культивировании самый высокий

уровень накопления оидий ( $1,5 \cdot 10^6$  шт./мл) удалось достичь, используя древесные опилки. Установлено, что барда является лучшей питательной средой для накопления биомассы гриба (7,9–9,8 г/л) в сравнении с фугатом (6,0–6,6 г/л).

На основании проведенных исследований была предложена технологическая схема получения биопрепарата глубинным культивированием гриба *Phlebiopsis gigantea*.

### Литература

1. Семенкова И. Г., Соколова Э. С. Фитопатология. М.: Издательский центр «Академия», 2003. 480 с.
2. Тимченко Г. А., Авраменко И. Д., Прокоменко Н. И. Справочник по защите леса от вредителей и болезней. Киев: Урожай, 1988. 224 с.
3. Негруцкий С. Ф. Корневая губка. М.: Лесная промышленность, 1986. 186 с.
4. Кузнецов И. Н., Ручай Н. С. Исследование роста гриба *Phlebiopsis gigantea* на отходах производства этанола для получения биопрепарата защиты леса: сб. мат. II Междунар. науч.-практ. конф. «Ветеринарная медицина на пути инновационного развития», посвященная 15-летию образования факультета ветеринарной медицины. Гродно, 2015. С. 95–100.

### References

1. Semenkov I. G., Sokolova E. S. *Fitopatologiya* [Phytopathology]. Moscow, Izdatel'skiy tsentr "Akademiy" Publ., 2003. 480 p.
2. Timchenko G. A., Avramenko I. D., Prokopenko N. I. *Spravochnik po zashchite lesa ot vreditel'ey i bolezney* [Guide to forest protection from pests and diseases]. Kiev, Urozhay Publ., 1988. 224 p.
3. Negrutskiy S. F. *Kornevaya gubka* [Root rot]. Moscow, Lesnaya promyshlennost' Publ., 1986. 186 p.
4. Kuznetsov I. N., Ruchay N. S. [A study of growth of the fungus *Phlebiopsis gigantea* on ethanol production waste to produce biological product for forest protection]. *Sbornik materialov II Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. («Veterinarnaya meditsina na puti innovatsionnogo razvitiya», posvyashchennaya 15-letiyu obrazovaniya fakul'teta veterinarnoy meditsiny)* [Collection of materials of the II international scientific-practical conference ("Veterinary medicine in the path of innovative development", dedicated to the 15th anniversary of the Faculty of veterinary medicine)]. Grodno, 2015, pp. 95–100 (In Russian).

### Информация об авторах

**Кузнецов Илья Николаевич** – кандидат технических наук, старший преподаватель кафедры биотехнологии и биоэкологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: i.n.kuznetsov@gmail.com

**Ручай Николай Степанович** – кандидат технических наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии и биоэкологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: ruchai@belstu.by

### Information about the authors

**Kuznetsov Ilya Nikolaevich** – PhD (Engineering), Senior Lecturer, the Department of Biotechnology and Bioecology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: i.n.kuznetsov@gmail.com

**Ruchay Nikolay Stepanovich** – PhD (Engineering), Associate Professor, Assistant Professor, the Department of Biotechnology and Bioecology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ruchai@belstu.by

Поступила 08.12.2016