

ОБЗОРЫ И ДИСКУССИИ

УДК 582.28 : 632.51 : 632.937.14

© *А. О. Берестецкий, С. В. Сокорнова***ПОЛУЧЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ БИОПЕСТИЦИДОВ
НА ОСНОВЕ МИКРОМИЦЕТОВ**BERESTETSKIY A. O., SOKORNOVA S. V. PRODUCTION AND STABILIZATION
OF MYCOPESTICIDES

В настоящее время ведутся фундаментальные, углубленные исследования с целью создания биопестицидов. Поиск и первичная оценка различных антагонистов фитопатогенных микроорганизмов, патогенов сорных растений и насекомых-вредителей давно стали систематическими. За рубежом появляется все большее число публикаций, касающихся разработки новых эффективных микробиологических препаратов для защиты растений. В современной российской научной литературе таких публикаций крайне мало. В статье представлены наиболее значимые, с нашей точки зрения, материалы в области разработки биопестицидов за последние несколько лет.

Микромицеты наряду с бактериями и вирусами являются основной группой микроорганизмов, ограничивающих численность определенных видов растений и насекомых в природе, которые подавляют развитие многих возбудителей заболеваний растений. При этом грибы обладают способностью активно распространяться и проникать в ткани хозяев (Leathers et al., 1993). Проблемы, связанные с разработкой коммерчески успешных микопестицидов, в основном биологические и технологические: мицелиальные грибы, как правило, не спороноят при глубинном культивировании; плохо переносят процессы стабилизации; патогенность или антагонистические свойства грибов находятся в сильной зависимости от внешних условий (Montesinos, 2003). Поэтому в данном обзоре будут рассмотрены различные подходы к решению указанных проблем. Авторы видов микромицетов, использованных в качестве примеров, их хозяева и препараты, созданные на их основе, указаны в таблице.

Особенности получения инфекционного материала грибов-продуцентов биопестицидов. Средняя гектарная норма расхода биопрепаратов, созданных на основе грибов, составляет около 10^{12} — 10^{14} конидий или колониобразующих единиц (пропагул). Одной из исследовательских задач является получение инфекционного биоматериала, стоимость которого может конкурировать с затратами на производство химических пестицидов (Barlett, Jaronski, 1988). С другой стороны, в процессе некоторых технологических операций (например, сушки) или в период хранения биопрепаратов жизнеспособность пропагул грибов может значительно снижаться. В природе относительно редко складывается оптимальное для быстрого прорастания грибных спор сочетание температуры и влажности. Прорастание спор может подавляться также действием солнечной радиации. Таким образом, подбор состава питательных сред, способа и условий культивирования грибов должен быть направлен не только на повышение выхода различных видов инокулюма, но и на повышение качества инфекционного материала — устойчивости к стрессовым воздействиям и эффективности в полевых условиях (Wraight et al., 2001).

**Примеры грибов, используемых для создания биопестицидов,
которые упомянуты в тексте статьи (ссылки в тексте)**

Вид гриба, автор	Целевые объекты	Тип пропагул, препараты
	Биогербициды	
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	Посконник железконосный (<i>Eupatorium adenophora</i> Spreng.)	Мицелий
	Лобелия цейлонская (<i>Sphenoclea zeylanica</i> Gaertn.)	Конидии
<i>A. cassiae</i> Jurair et A. Khan	Резуха канадская (<i>Cassia obtusifolia</i> L.)	»
<i>A. crassa</i> (Sacc.) Rands	Дурман вонючий (<i>Datura stramonium</i> L.)	»
<i>Bipolaris euphorbiae</i> (Hansf.) J. J. Muc-hovej et A. O. Carvalho	Молочай разнолистный (<i>Euphorbia heterophylla</i> L.)	»
<i>B. sorokiniana</i> (Sacc.) Shoemaker	Подмаренник цепкий (<i>Galium aparine</i> L.)	Мицелий
<i>Colletotrichum coccodes</i> (Wallr.) S. Hughes	Канатник Теофраста (<i>Abutilon theophrasti</i> Medik.)	Конидии
<i>C. gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. et Sacc.	Эшиномене виргинская (<i>Aeschynomene virginica</i> L.)	Конидии, Collego™, США
	Просвирник круглолистный (<i>Malva pusilla</i> With.)	Конидии, BioMal™, Канада
	Резуха канадская (<i>Senna obtusifolia</i> L.)	Конидии
<i>C. truncatum</i> (Schwein.) Andrus et W. D. Moore	Сесбания возвышенная (<i>Sesbania exaltata</i> Raf.)	Микросклероции, конидии
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	Канареечник канарский (<i>Phalaris canariensis</i> L.)	Конидии
<i>F. lateritium</i> Nees	Анода хохлатая (<i>Anoda cristata</i> L.), грудника колючая (<i>Sida spinosa</i> L.), канатник Теофраста (<i>Abutilon theophrasti</i> Medik.)	»
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>orthoceras</i> (Appel et Wollenw.) Bilai	Заразиха кумская (<i>Orobanche cumana</i> Wallr.)	»
<i>Gloeocercospora sorghi</i> D. C. Bain et Edgerton ex Deighton	Сорго алеппское (<i>Sorghum halepense</i> L.)	»
<i>Mycleptodiscus terrestris</i> (Gerd.) Ostaz.	Гиацинт водяной (<i>Eichornia crassipes</i> Mart.)	Микросклероции
<i>Phytophthora palmivora</i> (E. J. Butler) E. J. Butler	Лоза млечная (<i>Morrenia odorata</i> L.)	Хламидоспоры, De-Vine™, США
<i>Phomopsis convolvulus</i> Ormeno-Nuñez	Вьюнок полевой (<i>Convolvulus arvensis</i> L.)	
<i>Rhynchosporium alismatis</i> = <i>Plectosporium tabacinum</i> (J. F. H. Beyma) M. E. Palm, W. Gams et Nirenberg	Подмаренник ложный (<i>Galim spurium</i> L.)	Хламидоспоры, конидии
<i>Septoria passiflorae</i> Syd.	Пассифлора трехраздельная (<i>Passiflora tripartita</i> Juss.), пассифлора вонючая (<i>P. foetida</i> L.)	Конидии
<i>S. polygonorum</i> Desm.	Горец развесистый (<i>Polygonum lapathifolium</i> L.)	»
<i>Stagonospora convolvuli</i> Dearn. et House	Вьюнок полевой (<i>Convolvulus arvensis</i> L.)	»
<i>Trematophoma lignicola</i> Petr.	Ширица запрокинутая (<i>Amaranthus retroflexus</i> L.)	»

Вид гриба, автор	Целевые объекты	Тип пропагул, препараты
Биоинсектициды		
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	Долгоносик табачный (<i>Anthonomus eugenii</i> Cano), долгоносик хлопковый (<i>Anthonomus grandis</i> Boheman), белокрылки (Homoptera: Aleyrodidae)	Конидии, Bea-Sin, Мексика
	Жук колорадский (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say), плодовая яблонная (<i>Cydia pomonella</i> Linnaeus)	Конидии и бластоспоры, Боверин, Россия
	Белокрылки, тли (Homoptera: Aphididae), трипсы (Homoptera: Thysanoptera), саранчовые (Arthropoda: Acridoidea), моль капустная (<i>Plutella maculipennis</i> Curt.)	Конидии, Mucotrol/BotaniGard, США
	Белокрылки, тли, трипсы	Конидии, Naturalis, США
	Мотылек кукурузный (<i>Pyrausta nubilalis</i> Hubn.)	Конидии, Ostrinil, Франция
<i>Lagenidium giganteum</i> Couch	Комары кровососущие (Diptera: Culicidae)	Мицелий, Laginex, США
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin	Термиты (Isoptera: Termitidae)	Конидии, Bio-Blast, США
	Тараканы (Blattodea: Blattidae)	Конидии, Bio-Path, США
	Хрущ майский (личинки) (<i>Melolontha melolontha</i> L.)	Конидии, Metarhizium Schweizer, Швейцария
	Долгоносик табачный (<i>Anthonomus eugenii</i> Cano)	Конидии, Meta-Sin, Мексика
<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> Driver et Milner	Саранчовые	Конидии, Green Muscle, ЮАР
<i>M. flavoviride</i> W. Gams et Rozsypal	Саранча пустынная (<i>Schistocerca gregaria</i> Forsk.)	Конидии
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> (Wize) A. H. S. Br. et G. Sm.	Белокрылки	Конидии, Pac-Sin, Мексика Бластоспоры, PreFeral, США
Биофунгициды		
<i>Aspergillus flavus</i> Link, <i>A. parasiticus</i> Speare (атоксигенные штаммы)	Токсигенные штаммы <i>Aspergillus</i> spp.	Конидии
<i>Coniothyrium minitans</i> W. A. Campb.	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	Конидии, Contans®, Германия
<i>Epicoccum nigrum</i> (Link) Schol-Schwarz.	<i>Monilinia laxa</i> (Aderh. et Ruhland) Honey	Конидии
<i>Gliocladium virens</i> J. H. Mill., Giddens et A. A. Foster	<i>Rhizoctonia solani</i> J. G. Kuhn, <i>Pythium</i> spp.	Хламидоспоры, Soil-Gard™, США
<i>Rhodotorula minuta</i> (Saito) F. C. Harrison	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. et Sacc.	Бластоспоры
<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. et Nirenberg	<i>Gibberella fujikuroi</i> (Sawada) Wollenw.	Мицелий, Микол, Россия
<i>T. viride</i> Pers.	Возбудители болезней корневой системы растений	Мицелий
<i>Ulocladium atrum</i> Preuss	<i>S. sclerotiorum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> Pers.	Конидии

Конидии являются наиболее предпочтительным типом инфекционного материала грибов при разработке биопестицидов. Хорошо известно, что мицелий грибов, как правило, менее устойчив к стресс-факторам, чем конидии. Однако такие его образования, как хламидоспоры, микросклероции и склероции, способны к длительному существованию в неблагоприятных условиях и инфицированию организмов-хозяев после прорастания мицелия или образования спороношения (Hoffmann, 2001).

Основным промышленным способом получения конидий грибов является жидко-фазное глубинное культивирование. Однако жидкость — необычная для грибов среда обитания, даже для морских видов. Так, 98 % морских видов грибов выделены из подводных твердых субстратов (Hölker et al., 2004). Конидии грибов, полученные в глубинной культуре, по своим морфологическим и физиологическим свойствам могут значительно отличаться от воздушных, полученных на твердом субстрате. Например, глубинные конидии и бластоспоры *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* отличались пониженной гидрофобностью поверхности (признак, который может отвечать за закрепление спор на кутикуле насекомых), но прорастали быстрее, чем воздушные конидии гриба (Leland et al., 2005). Более того, к спороношению при погруженном культивировании, по-видимому, способны лишь те микромицеты, у которых конидии образуются в результате почкования — при наличии бластического типа конидиогенеза (например, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Septoria*) или при распадения мицелия на фрагменты — артроконидии.

Твердофазная ферментация (ТФ) является более естественной для грибов, поскольку они заселяют преимущественно твердые субстраты. Многочисленные работы показывают, что конидии грибов, полученные при помощи ТФ, обладают повышенной устойчивостью к таким стрессам, как высушивание и перепады температуры (Hölker et al., 2004). Так, конидии *Colletotrichum truncatum*, полученные при помощи ТФ на вермикулите с добавлением различных питательных веществ, были более вирулентными и дольше сохраняли жизнеспособность после сушки, чем конидии гриба, полученные в глубинной культуре на оптимизированной жидкой среде. Авторы связывают это и с тем, что при ТФ конидии гриба обволакиваются внеклеточным матриксом, который может выполнять защитные функции (Silman et al., 1993). Поэтому для определения свойств глубинных конидий их иногда сравнивают с «эталонном» — толерантностью к высушиванию, скоростью прорастания и вирулентностью воздушных конидий.

Когда получение глубинных конидий и бластоспор технологически проблематично (например, для образования спороношения необходимо освещение, споры слишком быстро теряют жизнеспособность), в качестве инокулюма используют мицелий грибов. Так, было показано, что мицелий *Alternaria alternata* значительно эффективнее конидий для борьбы с *Eupatorium adenophora* (Qiang et al., 2006). Разработан микоинсектицид на основе мицелия *Metarhizium anisopliae* против некоторых почвенных вредителей клоувы (Booth et al., 2000).

Многие зарегистрированные и потенциальные биопестициды в качестве активного начала содержат хламидоспоры и микросклероции. Недостатком этого типа пропагул может быть неравномерное прорастание. Однако прорастание глубинных конидий *Rhynchosporium alismatis* было значительно хуже (40 %), чем хламидоспор (90 %) этого гриба, полученных в глубинной культуре (Cliquet et al., 2004). Микроконидии *Fusarium oxysporum* были менее устойчивы к высушиванию, чем хламидоспоры; разработана жидкая питательная среда для получения последних (Müller-Stöver et al., 2001, 2002; Elzein, Kroschel, 2004). При глубинном культивировании *Mycroleptodiscus terrestris* практически не образует конидий, но микросклероции этого гриба после высушивания способны прорасти мицелием и образовывать конидиомы (Shearer, Jackson, 2006). Микросклероции *Colletotrichum truncatum*, полученные в глубинной культуре, лучше переносят сушку, чем конидии (Jackson, Schisler, 1995; Connick et al., 1997).

В надежде предсказать композицию «идеальной клетки» в последнее время стало уделяться внимание изучению свойств клеточной стенки и биохимического состава

пропагул грибов-продуцентов биопестицидов в связи с их устойчивостью к неблагоприятным воздействиям (например, замораживанию или высушиванию) и патогенными свойствами.

Устойчивость грибов к повышенным или пониженным температурам лучше всего изучена на примере дрожжей и некоторых почвенных грибов. Так, по сравнению с мезофильными видами дрожжей клетки ксерофильных и психрофильных грибов более активно накапливают протекторные вещества — полиолы (глицерин, маннитол, арабитол, эритрит и другие) и углеводы (глюкозу, трегалозу и некоторые другие). Эти вещества стабилизируют структуру мембран и конформацию белков при тепловом шоке (Hocking, 1993), замещают воду в мембранах и предотвращают ее кристаллизацию в клетке при пониженных температурах (Smith, 1993). Термофильные грибы содержат заметно больше насыщенных жиров, чем мезофильные (Magan, 2007).

Некоторые из указанных веществ являются резервным питательным материалом клеток грибов и играют определенную роль в цикле их развития. Так, мутантные штаммы фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea* Pers., неспособные к синтезу трегалозы, были менее устойчивы к воздействию теплового шока и прорастали хуже, чем штаммы дикого типа, что, однако, не влияло на их вирулентность (Doehlemann et al., 2006). Мутантные штаммы *Stagonospora nodorum* (Berk.) Berk. — возбудителя пятнистости листьев злаков, неспособные к синтезу маннитола, сохраняли вирулентность, но теряли способность к спороношению *in planta* (Solomon et al., 2006). Содержание нейтральных липидов в мицелии вирулентных и авирулентных штаммов фитопатогенных *Verticillium dahliae* и *V. lateritium* не различалось (Тен и др., 1977). Выявлены значительные различия в содержании липидов и их составе в мицелии и конидиях *Metarhizium anisopliae* (Pupin et al., 2000).

Интересно, что качественный и количественный состав протекторов в искусственно полученных на стандартных богатых питательных средах и природных спорах грибов сильно различается. Последние, как правило, содержат больше протекторов, намного агрессивнее, более толерантны к абиотическим факторам. На примере ряда потенциальных биоинсектицидов и биофунгицидов было показано, что конидии их продуцентов, полученные на питательных средах, которые стимулируют накопление в них протекторных веществ, были эффективнее в полевых условиях, чем инокулюм, полученный на обычных богатых субстратах (Magan, 2001; Shah et al., 2005).

Далее будут рассмотрены некоторые достижения в получении пропагул грибов-продуцентов биопестицидов.

Твердофазное культивирование. В последнее время наблюдается значительный прогресс в конструировании биореакторов для ТФ. Некоторые биотехнологические компании (например, немецкая фирма Prophyta, www.prophyta.com) получают инфекционный материал (конидии) для микопестицидов исключительно при помощи ТФ. Для небольших производств предложены специальные «мини»-биореакторы — полипропиленовые пакеты с перфорацией (Barlett, Jaronski, 1988; de Vrije et al., 2001). Полупромышленная технология получения конидий *M. flavoviride* на рисе в полипропиленовых пакетах позволяет получать примерно 1.5×10^{12} конидий/кг субстрата при рабочем цикле 82 кг, 1.6 циклов в неделю (Jenkins et al., 1998). Разработана технология получения конидий *Coniothyrium minitans* (более 5×10^{14} конидий/м³ ферментера) в промышленных биореакторах для ТФ различного типа на зерне овса (de Vrije et al., 2001; www.prophyta.com). Некоторые виды грибов (например, из родов *Ascochyta*, *Alternaria*) образуют спороношение только при ближайшем ультрафиолетовом облучении культур, что делает практически невозможным получение конидий при помощи глубинной жидкофазной ферментации. При культивировании их в стеклянных биореакторах эту проблему для ТФ можно решить (Peter Lüth, Prophyta, личное сообщение).

При ТФ можно манипулировать такими начальными параметрами культивирования, как субстрат (питательность, размер частиц, водопоглощающая способность), его влажность, рН питательной среды. Однако в биореакторах для ТФ крайне трудно устранить градиент температуры и концентрации кислорода в слое субстрата (Barlett,

Jaronski, 1988; Hölker et al., 2004). Повышение температуры в результате выделения метаболического тепла может приводить к снижению влажности верхних слоев субстрата или его комкованию в нижних слоях, что может замедлять рост гриба и ингибировать спороношение. Образование конидий *Alternaria cassiae* и *A. crassa* на твердых питательных средах подавлялось при повышенной концентрации углекислого газа (Smart et al., 1992). Данную проблему можно решить путем подбора водоудерживающих добавок к субстрату (например, тресты конопли), соответствующим перемешиванием и аэрацией субстрата (de Vrije et al., 2001).

Для ТФ могут быть использованы разнообразные субстраты: органические (зерно, семена, отходы переработки растительного и пищевого сырья) или неорганические (например, перлит, вермикулит), с добавлением питательных веществ. Известна заявка на патент, где зерно ячменя предлагается как универсальный субстрат для получения конидий энтомопатогенных гифомицетов (Bradley et al., 2002). Высокий выход жизнеспособных конидий ($0.8\text{—}1.0 \times 10^9$ конидий/г) *Bipolaris euphorbiae* получен на зернах сорго и кукурузы (попкорне) на 15-е сутки роста (Marchiori et al., 2001). Для *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae* лучшим зерновым субстратом было сорго: на 28-е сутки культивирования в темноте при 28 °С гриб образовывал 2×10^6 конидий/г субстрата, жизнеспособность которых за 12 месяцев хранения при 24 °С снижалась лишь на 10 % (Masangkay et al., 2000). Кокосовые стружки и кукурузная крупа стимулировали спороношение у *Stagonospora convolvuli* LA39 на уровне $3\text{—}5 \times 10^8$ конидий/г субстрата на 15-е сутки инкубации при 20 °С и освещении люминесцентными лампами (Pfirter et al., 1999).

Количество несвязанной воды в субстрате (зерне пшеницы) влияло на выход конидий *Epicoccum nigrum* и содержание в них протекторных веществ — полиолов и сахаров. При поддержании пониженной активности воды в субстрате ($a_w = 0.98$) путем смешивания воды с глицерином споропродуктивность гриба была выше, чем при активности воды в зерновом субстрате, равной 0.996. При пониженной активности воды (0.98) в субстрате конидии *E. nigrum* содержали значительно больше глицерина, чем при повышенной активности воды — 0.996 (Pascual et al., 1999). При хранении в виде пасты при температуре 25 °С конидии *E. nigrum*, полученные на картофельно-глюкозной агаризованной среде с пониженной активностью воды ($a_w = 0.98$), сохраняли более высокий уровень выживаемости, чем конидии, образовавшиеся при высоком содержании несвязанной воды ($a_w = 0.995$) (Pascual et al., 2002). Очень часто приходится искать компромисс между качеством инокулюма (содержанием протекторных веществ) и его выходом, поскольку эти характеристики подчас не совпадают. Так, максимальный выход конидий *Beauveria bassiana* на рисе был получен при $a_w = 0.999$, pH 5.0—6.0, в то время как максимальное накопление полиолов (глицерина и эритрита) в конидиях гриба наблюдалось при $a_w = 0.950$ и pH 4.5 (Tarocco et al., 2005).

Значительное количество протекторных веществ (полиолов, трегалозы) было обнаружено в жидкости, при помощи которой смывали конидии *Epicoccum nigrum* с зернового субстрата (Pascual et al., 1999). Возможно, что частично компенсировать потерю защитных веществ, содержащихся во внеклеточном конидиальном матриксе, может смыв конидий с субстрата физиологическим раствором. Предположительно, это приводит к модификации клеточных мембран и последующей повышенной устойчивости конидий некоторых грибов к высушиванию, что показано на примере *Colletotrichum truncatum* (Montazeri, Greaves, 2002).

Жидкофазное культивирование. Возможность полностью контролировать процесс ферментации и ее сравнительно краткая продолжительность (несколько суток) — несомненное преимущество глубинной жидкофазной ферментации (ГЖФ) перед ТФ. Для многих продуцентов биопестицидов разработан состав жидкой питательной среды и условия глубинного культивирования. Так, среда коммерческого типа для получения конидий *Colletotrichum truncatum* включает глюкозу (20 г/л), дрожжевой экстракт (2.5 г/л), Pharmamedia (7.5 г/л, мука из семян хлопчатника) и различные соли. За 72 ч ферментации образуется более 6×10^7 конидий/мл (Silman, Nel-

sen, 1993). Для получения высокого титра бластоспор *Paecilomyces fumosoroseus*, устойчивых к высушиванию (лиофилизации), была оптимизирована питательная среда, позволяющая получать $1\text{--}2 \times 10^9$ спор/мл за 48 ч ферментации. Решающими факторами являлись: высокая концентрация посевного материала, богатый аминокислотами источник азота и микроэлементы (Jackson et al., 2003). Разработаны состав питательной среды и параметры ферментации (2 % посевного материала, длительность 120—160 ч) для стабильного получения высокого титра (более 1×10^8 КОЕ/мл) зрелых хламидоспор *Gliocladium virens* штамма GL-21 (Eyal et al., 1997).

Для получения необходимого титра инфекционного материала, обладающего высокой жизнеспособностью и патогенностью, а также устойчивостью к стрессовым факторам, состав жидкой питательной среды требует оптимизации. Для этого успешно был реализован следующий алгоритм оптимизации состава питательной среды (Jackson, 1997): 1) подбор базовой среды с набором витаминов и микроэлементов, на которой гриб хорошо растет и/или спороносит; 2) подбор источников углерода и азота и определение их оптимальных концентрации и соотношения; 3) замена искусственных источников углерода и азота на дешевые природные. Для повышения выхода конидий *Gloeocercospora sorghi* и *Septoria polygonorum* достаточно быстрой и успешной была классическая методология факториальных экспериментов в сочетании с компьютерным моделированием поверхности отклика (response surface model) (Mitchell, 2003; Mitchell et al., 2003).

Для получения высоких титров конидий *Colletotrichum coccoides* оптимальная концентрация углерода в среде составляла 20 г/л при соотношении C/N = 10 : 1 (Yu et al., 1998). У *Colletotrichum truncatum* микроциклическое спороношение было индуцировано при концентрации углерода в среде 4—16 г/л и C/N от 10 : 1 до 80 : 1. При концентрации углерода более 25 г/л в глубинной культуре этого гриба образовывались микросклероции. Максимальный выход конидий *C. truncatum* был получен при концентрации углерода 4—8 г/л и C/N = 30 : 1, однако более патогенными и устойчивыми к сушке оказались конидии, выращенные на среде, в которой с C/N = 10 : 1. Такие конидии содержали больше белков, трегалозы и полиолов, но меньше глюкозы и липидов, чем выращенные на средах, в которых C/N = 30 : 1 и 80 : 1 (Jackson, 1997; Wraight et al., 2001; Montazeri, Greaves, 2002; Montazeri et al., 2003). На штаммах энтомопатогенных грибов и антагонистических микромицетов Гао и соавторы показали, что зависимость роста и спорообразования грибов от концентрации и соотношения углерода и азота не только видоспецифическая, но и штаммоспецифическая.

Тоничность жидкой питательной среды, или ее водный потенциал, оказывает заметное влияние на выход и качество пропагул некоторых грибов-продуцентов биопестицидов. Так, впервые было получено спороношение *Ulocladium atrum* в жидкой среде с пониженным водным потенциалом ($\Psi = -2.1$ МПа) в результате добавления в среду глицерина (7.3 % масса/объем) и хлорида кальция (20 мМ). Глубинные конидии гриба, полученные на среде с пониженным водным потенциалом, сохраняли жизнеспособность на уровне воздушных конидий. Содержание полиолов и трегалозы у воздушных конидий и конидий, полученных на жидкой среде с повышенной тоничностью, было примерно одинаковым (Freu, Magan 2001). Повышенная тоничность (осмоляльность 804—1454 мОсм) жидкой питательной среды, созданная 50—150 г/л полиэтиленгликоля PEG 200, повышала выход погруженных конидий *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* примерно на 25 %. Они обладали повышенной патогенностью и толерантностью к высушиванию (Leland et al., 2005).

Другой стресс-фактор — неоптимальный источник углерода (фруктоза, лактоза, галактоза) стимулировал образование конидий *M. anisopliae*, устойчивых к дальнему ультрафиолетовому облучению (< 290 нм) и накапливающих примерно в 2 раза больше маннитола и трегалозы, чем на питательной среде с глюкозой, на которой наблюдали максимальное образование конидий (Rangel et al., 2006). При культивировании *Beauveria bassiana* на среде, содержащей п-гексадекан в качестве единственного источника углерода, состав липидов в мицелии существенно изменился по сравне-

нию с мицелием, полученным на среде с глюкозой, — содержание насыщенных жиров увеличилось примерно в 2 раза. При этом патогенность конидий, полученных на среде с указанным алканом, была примерно в 3 раза выше, чем у конидий, полученных на среде с глюкозой (Crespo et al., 2002).

С т а б и л и з а ц и я п р о п а г у л. Биоматериал, полученный в результате ферментации и отделения его от культуральной жидкости или твердого субстрата, как правило, не подлежит долгому хранению. Даже при пониженной температуре хранения споры грибов, не говоря о мицелии, при достаточной влажности способны к прорастанию, что ведет к их гибели в отсутствие питающего субстрата. Многие биопестициды, полученные на региональных малотоннажных производствах, применяются по этой причине в течение нескольких недель после окончания ферментации, как, например, микрогербицид DeVine™ на основе спор *Phytophthora palmivora* (Wraight et al., 2001; Auld et al., 2003).

На крупных биотехнологических производствах живую основу биопестицидов требуется стабилизировать — на длительное время предотвратить прорастание пропагул (инфекционных единиц). Это достигается в основном концентрированием, сушкой или инкапсуляцией биоматериала в полимерные оболочки и хранением в определенных условиях. Современный биопрепарат в идеале должен храниться не менее 2 лет при 4 °С, около одного года при 20—25°, три месяца при 30°, несколько суток при 40—50 °С (Wraight et al., 2001).

Для некоторых микроорганизмов известны простые и недорогие способы стабилизации и хранения. Например, инфекционный материал антагонистических штаммов *Fusarium oxysporum* получают, сушат и хранят в торфе. Споры гриба не теряют жизнеспособности несколько лет (Alabouvette et al., 2007). Универсальных рецептов, однако, не существует, и для каждого вида гриба, его типа пропагул требуется поиск оптимальных способов стабилизации и условий хранения.

Как известно, рост и развитие грибов сильно зависят от температуры, доступности воды, pH среды и концентрации кислорода. Для стабилизации пропагул грибов манипулируют этими факторами: искусственно понижают pH и активность воды в жидких препаратах, поддерживают низкую температуру, хранят их при пониженном содержании кислорода (Magan, 2007; Teshler et al., 2007).

Споры многих групп микромицетов содержат ингибиторы, предотвращающие их прорастание в плодовых телах, конидиомах и пустулах даже при благоприятных для этого влажности и температуре. Эти ингибиторы, выделенные в чистом виде из спор некоторых ржавчинных грибов и *Colletotrichum* spp., обладали фунгистатическим действием (Macko et al., 1970, 1971; Lax et al., 1985; Inoue et al., 1996; Ley et al., 2003). По мнению специалистов (Sparace et al., 1991), они могут быть использованы как природные консерванты, например для стабилизации глубинных конидий.

Агрегированные в споровместилищах споры многих грибов способны переживать сезон и более длительное время при крайне неблагоприятных переменчивых условиях внешней среды, включая высушивание, солнечную радиацию и низкие зимние температуры. Как правило, такие споры пигментированы, окружены толстой оболочкой (например, пигментированные телеитоспоры ржавчинных и головневых грибов) или заключены во внеклеточный матрикс (например, у целомицетов). Анализ химического состава конидиальной слизи у ряда видов *Ascochyta* и *Phoma* показал, что она содержит пигменты, глюкозу, полисахариды, тирозин и белки. При вымывании слизи конидии хуже прорастают, менее устойчивы к высушиванию и УФ-облучению (Успенская, Решетникова, 1979; Успенская и др., 1980). Аналогичные данные получены при изучении химического состава конидиального матрикса *Phomopsis convolvulus* (Sparace et al., 1991).

Наличие в грибных клетках протекторных веществ (фенольных пигментов, полиолов, сахаров) и толщина клеточной стенки играют важную роль в устойчивости к искусственному высушиванию у мезо- и гигрофильных грибов. Пигменты, особенно фенольные, способны к утилизации свободных кислородных радикалов, образование которых индуцируется в процессе сушки (Hoffmann, 2001; Magan, 2007). Поэтому

при высушивании к биоматериалу добавляют протекторы в концентрации 5—20 %, которые регулируют осмотическое давление и устраняют вредное воздействие кислорода и свободных радикалов. Хранить высушенную биомассу желательно в темноте, при минимальном доступе кислорода. Важным этапом является и обратный процесс — регидратация, которая должна быть постепенной, во влажной атмосфере, в теплой воде, чтобы не повредить клеточные мембраны (Hoffmann, 2001).

Концентрирование и консервация биомассы. Приготовление суспензионных концентратов, концентрат-эмульсий и паст с добавлением консервантов (ингибиторов прорастания, антибиотиков и пр.) — наиболее простые способы стабилизации и хранения пропагул грибов, особенно если инфекционный материал неустойчив к высушиванию.

Концентраты. Разработана жидкая препаративная форма биофунгицида на основе дрожжей *Rhodotorula minuta* для борьбы с антракнозом манго. Добавление глицирина (20 %) и ксантана (0.5 %) к концентрированной суспензии биоматериала (10^9 КОЕ/мл) предотвращало контаминацию препарата и осаждение клеток. При температуре 4 °С количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в препарате снижалось примерно в 100 раз через 6 месяцев хранения (Patiño-Vera et al., 2005). Для хранения биоинсектицида на основе мицелия *Lagenidium giganteum* разработана концентрат-эмульсия, содержащая 40 % рафинированного кукурузного масла с добавлением эмульгатора и аэросила (AEROSIL Fumed Silica, R974). Последний (в концентрации 0.5 %) предотвращал седиментацию мицелия и его агрегацию. Препарат хранился 12 недель при комнатной температуре без потери эффективности против личинок комаров.

Пасты. Мицелий *Trichoderma asperellum* (штамм GSS 03-35), полученный на специально подобранной среде в глубинной культуре, удалось стабилизировать концентрированием (до 6—10 % сухого вещества) в пасту, содержащую кукурузный крахмал (5 %) в качестве загустителя. Мицелий гриба консервировали подкислением пасты до pH 3 и добавлением сульфата меди (20 мг/л). В процессе хранения мицелий гриба постепенно преобразовывался в хламидоспоры и конидии. Препарат хорошо хранился не менее 6 месяцев при 20 °С и был эффективен при защите пшеницы от фузариоза колоса (Коломбет, 2006; Kolombet et al., 2008).

Сушка. Высушивание инфекционного материала является основным методом стабилизации инокулюма. Помимо простой сушки теплым воздухом на поддонах используют распылительную сушку, сушку в псевдокипящем слое и лиофилизацию. Способ сушки выбирают в зависимости от его доступности/стоимости и от чувствительности биологического материала к нему.

Конвекционная сушка. Биоматериал, смешанный с наполнителями и протекторами, раскладывают в поддонах тонким слоем и сушат током воздуха. Таким образом, получают биофунгицид триходермин (Биотехмаш, Украина) в виде смачивающегося порошка (Старчевский, Самойлов, 2002). Этот простой способ сушки может применяться для небольших партий биоматериала и для предварительных экспериментов. Так, при сушке бластоспор *Paecilomyces fumosoroseus* стерильным воздухом при 26—28 °С в качестве наполнителей и протекторов были испытаны кукурузный крахмал, рисовая мука, талк, диатомовая земля (кизельгур) и каолин. Последний (в концентрации 5 % по массе к объему спорового концентрата) позволял сохранить удовлетворительную жизнеспособность конидий (≥ 50 %) более 7 недель при 4 °С. Конидии *Stagonospora convolvuli* (штамм LA39), полученные на агаризованной питательной среде V-8, высушенные с наполнителем (1 г каолина/ 10^9 конидий) током воздуха, сохраняли высокую жизнеспособность (≥ 70 %) и патогенность примерно 5 месяцев при температуре 3 °С. На 17-й месяц жизнеспособность сохранилась лишь у 5 % конидий гриба. При температуре хранения 20 °С жизнеспособность конидий снижалась до 20 % в течение недели (Pfirter et al., 1999).

Способ сушки «Старезе» (Stareze) основан на добавлении стабилизатора мембран (сахарозы) еще в процессе культивирования микроорганизма. Сахарозу (40 г/л) внесли в 96-часовую глубинную культуру *Metarhizium anisopliae*; через 72 ч к фермен-

тационному продукту добавляли диоксид кремния (HiSil®, 35 г/л), перемешивали, отфильтровывали его от культуральной жидкости и сушили в поддонах током воздуха. Полученные таким образом бластоспоры гриба сохраняли высокий уровень жизнеспособности около 6 месяцев при температуре хранения 2—4 °С (Quimbi et al., 2001).

Распылительная сушка. В сушильно-грануляционных установках суспензия биоматериала (с добавкой ПАВ и протекторов) распыляется в нагретом воздухе с последующим быстрым ее высыханием (5—30 с) и формированием гранул сферической формы с гладкой поверхностью диаметром 10—500 мкм. Распыленная суспензия может направляться на «подстилку» из уже высушенного материала, барботируемую воздухом (псевдокипящий слой). Частички материала, образующиеся из распыленного состава, постепенно налипают на частицы подстилки, увеличивая их размер и массу, в результате образуются гранулы (www.niroinc.com — сайт производителя соответствующего оборудования).

Глубинные конидии *M. anisopliae* с добавлением 20 % обезжиренного молока и 2.5 % сахарного сиропа переносили распылительную сушку лучше, чем лиофилизацию. Однако температура «на входе» и «на выходе» оказывала существенное влияние на их жизнеспособность (Stephan, Zimmermann, 2001). Гранулы коммерческого биофунгицида Contans® получают при помощи высушивания конидий *Coniothyrium minitans* в растворе глюкозы в распылительной сушильной установке; конечный препарат содержит приблизительно 95 % глюкозы и 5 % конидий (около 1×10^{13} конидий/кг), хранится без заметной потери жизнеспособности конидий около 2 лет при температуре 4 °С (de Vrije et al., 2001). Однако этот способ сушки в некоторых случаях неэффективен. Конидии эпифитного гриба *Epicoccum nigrum*, полученные при помощи твердофазной ферментации, после высушивания с различными наполнителями при помощи распылительной сушки (при 150 °С на «входе») практически полностью теряли свою жизнеспособность. Однако при высушивании в псевдокипящем слое при температуре 30—40 °С конидии *E. nigrum*, высушенные без протекторов, сохраняли 100%-ю жизнеспособность более 90 суток (Larena et al., 2003).

Лиофильная сушка. При лиофилизации вода под низким давлением удаляется из замороженного материала путем превращения льда в пар, минуя жидкое состояние. Конидии *Septoria passiflorae* хорошо переносили лиофильную сушку при добавлении 10 % обезжиренного молока в качестве протектора; гриб сохранял жизнеспособность при хранении в вакуумной упаковке и температуре 1 °С не менее одного года (Norman, Trujillo, 1995). Бластоспоры *Paecilomyces fumosoroseus* с добавлением протекторов (10 % лактозы + 1 % бычьего альбумина или композиции из крахмала, растительного масла, сахарозы и молока) сохраняли жизнеспособность на уровне 75 % при температуре хранения —20 °С в течение 50 недель, тогда как к этому времени при 4 °С их жизнеспособность снижалась до уровня около 10 %.

И н к а п с у л я ц и я. Концентрированный биоматериал можно заключить в различные полимерные матрицы, которые защищают клетки микроорганизмов от внешних воздействий, прежде всего от контаминации и ультрафиолета. Продукт, полученный в результате процесса инкапсуляции, представляет собой гель, гранулы, капсулы и микрокапсулы. В настоящее время для их получения разработаны промышленные аппараты (Vorlop et al., 2001).

Альгинатные гранулы. Процесс основан на полимеризации альгината натрия в растворе хлорида кальция. Например, суспензию биоматериала (1 часть) перемешивают с альгинатом натрия (1.3%-й раствор, 4 части) и каолином (5 % от общего веса); смесь вносят по каплям в 0.25 М раствор хлорида кальция; полученные гранулы отфильтровывают и сушат. Впервые метод был апробирован для *Alternaria cassiae*. Интенсивность спороношения гриба на гранулах зависела от способа получения инокулюма, наполнителей и питательных добавок, которые входили в состав гранул; например, каолин можно эффективно заменить кукурузной мукой грубого помола (Daigle, Cotty, 1992).

Различные варианты альгинатных гранул были испытаны для множества потенциальных и коммерческих продуцентов биопестицидов. Было показано, что хитин (2 %

от веса гранул) с пшеничными отрубями (2 %) значительно повышали спорообразование *Beauveria bassiana* (Gerding-González et al., 2007). Добавление крахмала (0.5 %) ускорило разрыв гранул и колонизацию торфяного субстрата грибом *Trichoderma viride* (Чекалова, 2007). Для полевых испытаний препарата атоксигенного штамма *Aspergillus flavus* в виде альгинатных капсул были испытаны различные питательные добавки (1 % от веса капсул) и фунгициды (0.5—1.25 мг на 50 г смеси альгината натрия с 2.5 г кукурузной мукой грубого помола). Добавка триптона и глутена значительно стимулировала спороношение гриба на альгинатных гранулах. Фунгициды не подавляли развитие антагониста и предохраняли гранулы от контаминации (Daigle, Cotty, 1995).

Микроинкапсуляция. Запатентован новый метод микроинкапсулирования микроорганизмов (Winder, Wheeler, 2001). Суспензия биоматериала (конидии, мицелий) в растворе альгината натрия или в смеси агар-агара (1 %) с желатином (1 : 1) эмульгируется в кукурузном масле с *n*-гексадеканом (6 : 4) и лецитином в качестве эмульгатора. Если желатин-агаровые глобулы желировались в полученной эмульсии, то альгинатные микрокапсулы полимеризовались при осаждении в раствор хлорида кальция. Размер микрокапсул варьировал от 10 до 400 мкм в зависимости от соотношения указанных компонентов. Микрокапсулы отделяли от жидкости при помощи вакуумной фильтрации и применяли путем опрыскивания. Данный метод создания искусственных спор успешно опробован в модельных опытах с конидиями *Fusarium avenaceum* и мицелием *Bipolaris sorokiniana*, которые сохранили патогенность в отношении целевых сорных растений — канареечника канадского и подмаренника цепкого (Winder, Wheeler, 2001; Winder et al., 2003).

Гранулы «Песта» (Pesta). Базовый процесс получения гранул «Песта» (от итальянского слова *pasta*) основан на технологии получения макаронных изделий: суспензия инокулюма (52 мл), мука из твердых сортов пшеницы (80 г) и каолин (20 г) смешиваются до получения теста; эта смесь пропускается через аппарат для получения макарон, сушится, дробится на гранулы и просеивается. Метод был впервые апробирован для инкапсулирования конидий потенциальных микогербицидов (*Alternaria cassiae*, *A. crassa*, *Colletotrichum truncatum* и *Fusarium lateritium*), а также для хранения энтомопатогенных нематод (Connick, Boyette, 1991; Connick et al., 1991). Он хорошо подходит для инкапсуляции меланизированных грибных структур — хламидоспор, микросклероциев и пигментированных конидий таких грибов, как *Alternaria* spp. Конидии *F. oxysporum*, *C. truncatum*, *Trematophoma lignicola* не перенесли процесс приготовления гранул (Connick et al., 1991, 1997; Müller-Stöver et al., 2001, 2004; Lawrie et al., 2001).

Микросклероции *Colletotrichum truncatum* выживали в гранулах «Песта» более 52 недель при температуре хранения 25 °С и пониженной активности воды ($a_w = 0.18—0.29$), около 10 лет — при 4 °С, сохранив способность вызывать болезнь проростков *Sesbania exaltata* (Connick et al., 1997; Boyette et al., 2007), в то время как конидии этого гриба хранятся не более 32 недель (Connick et al., 1996). Интересно, что на различных этапах процесса приготовления гранул «Песта» на основе конидий *Alternaria alternata* наблюдался рост колониеобразующих единиц за счет разрушения их агрегаций. Патогенность конидий гриба, заключенных в гранулы, сохранялась при пониженной относительной влажности воздуха (12 %) более двух лет (Lawrie et al., 2001).

Состав гранул «Песта» можно легко модифицировать. Так, были опробованы варианты композиций для потенциального биогербицида на основе *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* за счет добавления (примерно 3 % от веса базовой смеси) сахарозы, кукурузной муки, глицерина, крахмала WaterLock B209, целлюлозы, дрожжевого экстракта (Shabana et al., 2003). Последний компонент способствовал лучшей выживаемости не только хламидоспор, но и микроконидий гриба в процессе приготовления гранул и их хранения. Однако у изученных образцов отмечена хорошая выживаемость (60—80 % в течение 12 месяцев) лишь при температуре 3° и относительной влажности воздуха 11—12 %; повышение температуры до 25 °С или влажности до

51—53 % приводило к резкому снижению жизнеспособности гриба уже на 4—8-й месяцы хранения (Shabana et al., 2003).

Для инкапсуляции конидий различных видов грибов-продуцентов биопрепаратов (*Colletotrichum truncatum*, *Alternaria* sp., *Paecilomyces fumosoroseus*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*), полученных при помощи твердофазной и жидкофазной ферментации, в гранулы «Песта» был успешно испытан метод экструзии (twin-screw extrusion). Ингредиенты перемешивали в миксере промышленного аппарата для экструзии, полученные гранулы длиной 1—2 мм высушивали в псевдокипящем слое при 50 °С. Было показано, что на инокулюме, полученном при твердофазной ферментации на рисе, процесс получения гранул проходил намного лучше, чем на биоматериале, полученном в глубинной культуре (Daigle et al., 1998).

Гранулы «Стабилезе» (Stabileze). Основными ингредиентами гранул «Стабилезе» являются: стабилизатор мембран (например, сахароза, 10—65 % от веса гранул), водопоглощающее вещество (крахмал), наполнитель (диатомовая земля, силикагель Hi-Sil® и другие в концентрации 5—20 %). Кроме того, состав гранул может включать растительное масло (около 20 %), УФ-протекторы, консерванты, инертные наполнители и прочее (Quimby et al., 2002). Например, сахарозу (4 части), крахмал (1 часть), нерафинированное растительное масло (1 часть), силикагель (1.5 части) и биосуспензию (4 части) смешивают; полученную пасту высушивают током воздуха, дробят на гранулы или измельчают до порошкообразного состояния. Этот метод в различных модификациях был успешно опробован для потенциальных биогербицидов — *Fusarium oxysporum* (микрoконидии и мицелий) и *Pseudomonas* spp., которые длительное время сохраняли жизнеспособность (Amsellem et al., 1999; Quimby et al., 1999; Zidack, Quimby, 2002). Глубинные конидии штамма *Metarhizium anisopliae* — продуцента микроинсектицида Green Muscle™ плохо переносили процесс инкапсулирования в гранулы «Стабилезе» по сравнению с процессом сушки «Старезе», описанным выше (Quimby et al., 2001).

Таким образом, в последнее время наблюдается значительный прогресс в разработке методов получения и хранения биопестицидов на основе грибных пропагул. Во-первых, большее внимание стало уделяться получению вирулентного и устойчивого к высушиванию инокулюма грибов на основе мицелия и его видоизменений (бластоспор, хламидоспор и микросклероциев) при глубинном культивировании. Во-вторых, значительно улучшена конструкция биореакторов для твердофазного культивирования грибов, что позволяет получать конидии продуцентов биопестицидов, обладающие высокой устойчивостью к внешним воздействиям. В-третьих, на основе изучения выживаемости микромицетов в экстремальных условиях разработаны методы стабилизации пропагул многих видов грибов для длительного хранения биопестицидов. Однако положительно ответить на вопрос: станут ли в ближайшее время микробиологические препараты ощутимой альтернативой химическим пестицидам? — можно будет только при условии стабильно высокой эффективности биопестицидов в полевых условиях в сочетании с их безопасностью для окружающей среды и потребителей.

Благодарим д. б. н. И. И. Новикову (ВНИИ защиты растений) за ценные замечания при подготовке рукописи.

Работа выполнена при поддержке грантов МНТЦ (№ 2939) и Президента РФ (МК-1661.2006.04).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

К о л о м б е т Л. В. Научное обоснование и практическая реализация технологии создания грибных препаратов для защиты растений от болезней: Автореф. дис. ... д. б. н. М., 2006. 47 с.

С т а р ч е в с к и й И., С а м о й л о в Ю. Исследование производства и применения в защите растений биологических препаратов // Информ. бюлл. ВПРС МОББ. 2002. № 33. С. 59—63.

Тен Л. Н., Тыщенко А. А., Степаниенко Н. Н., Гусакова С. Д., Мухамеджанов С. З., Острошенко О. С., Касьяненко А. Г. Метаболиты патогенного гриба *Verticillium dahliae*. VI. Пентакетидные метаболиты и нейтральные липиды вирулентных и авирулентных штаммов // Химия природных соединений. 1977. № 5. С. 632—635.

Успенская Г. Д., Решетникова И. А. Влияние пикнидиальной слизи и некоторых экологических факторов на прорастание конидий грибов родов *Ascochyta* Lib. и *Phoma* Fr. // Микология и фитопатология. 1979. Т. 13, вып. 4. С. 298—301.

Успенская Г. Д., Решетникова И. А., Бабьева Е. Н. Биохимический состав пикнидиальной слизи грибов родов *Ascochyta* Lib. и *Phoma* Fr. // Микология и фитопатология. 1980. Т. 14, вып. 4. С. 334—337.

Чекалова К. В. Разработка новой препаративной формы биологических фунгицидов на основе клеток микроорганизмов *Trichoderma viride* и *Pseudomonas fluorescens*: Автореф. дис. ... к. б. н. М., 2007. 20 с.

Alabouvette C., Olivain C., L'Haridon F., Aime S., Steinberg C. Using strains of *Fusarium oxysporum* to control Fusarium wilts: dream or reality? // Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management / Eds M. Vurro, J. Gressel. Dordrecht: Springer, 2007. P. 157—177.

Amsellem Z., Zidack N. K., Quimby P. C. Jr., Gressel J. Long-term dry preservation of viable mycelia of two mycoherbicidal organisms // Crop Protection. 1999. Vol. 18. P. 643—649.

Auld B. A., Hetherington S. D., Smith H. E. Advances in bioherbicide formulation // Weed Biol. Management. 2003. Vol. 3. P. 61—67.

Barlett M. C., Jaronski S. T. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects // Fungi in biological control systems / Ed. M. N. Burge. New York: Manchester University Press, 1988. P. 61—88.

Boyette C. D., Jackson M. A., Bryson C. T., Hoagland R. E., Connick W. J., Daigle D. J. *Sesbania exaltata* biocontrol with *Colletotrichum truncatum* microsclerotia formulated in «Pesta» granules // BioControl. 2007. Vol. 52. P. 413—426.

Booth S. R., Tanigoshi L., Dewes I. Potential of a dried mycelium formulation of an indigenous strain of *Metarhizium anisopliae* against subterranean pests of cranberry // Biocontrol Sci. Technol. 2000. Vol. 10, N 5. P. 659—668.

Bradley C. A., Wood P. P., Black W. E., Kearns R. D., Britton J. Solid culture substrate including barley: US Patent Application Publication, US Pub. 2002. N 2002/006650 A1.

Cliquet S., Ash G., Cothier E. Production of chlamydo-spores and conidia in submerged culture by *Rhynchosporium alismatis*, a mycoherbicide of Alismataceae in rice crops // Biocontrol Sci. Technol. 2004. Vol. 14, N 8. P. 801—810.

Connick W. J., Boyette C. D. Granular products containing fungi encapsulated in a wheat gluten matrix for biological control of weeds // US Patent. 1991. N 5074902. Dec. 24.

Connick W. J., Boyette C. D., McAlpine J. R. Formulation of mycoherbicides using a pasta-like process // Biol. Control. 1991. Vol. 1. P. 281—287.

Connick W. J., Daigle D. J., Boyette C. D., Williams K. S., Vinyard B. T., Quimby P. C. JR Water activity and other factors that affect the viability of *Colletotrichum truncatum* conidia in wheat flour-kaolin granules («Pesta») // Biocontrol Sci. Technol. 1996. Vol. 6. P. 277—284.

Connick W. J., Jackson M. A., Williams K. S., Boyette C. D. Stability of microsclerotial inoculum of *Colletotrichum truncatum* encapsulated in wheat flour-kaolin granules // World J. Microbiol. Biotechn. 1997. Vol. 13. P. 549—554.

Crespo R., Juárez M. P., Dal Bello G. M., Padín S., Calderón Fernández G., Pedrini N. Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana* // BioControl. 2002. Vol. 47. P. 685—696.

Daigle D. J., Cotty P. J. Production of conidia of *Alternaria cassiae* with alginate pellets // Biol. Control. 1992. Vol. 2. P. 278—281.

Daigle D. J., Cotty P. J. Formulating atoxigenic *Aspergillus flavus* for field release // Biocontrol Sci. Technol. 1995. Vol. 5. P. 175—184.

Daigle D. J., Connick W. J., Boyette C. D., Jackson M. A., Dorner J. W. Solid-state fermentation plus extrusion to make biopesticide granules // *Biotechnol. Techniques*. 1998. Vol. 12, N 10. P. 715—719.

De Vrije T., Antoine N., Buitelaar R. M., Bruckner S., Dissevelt M., Durand A., Gerlagh M., Jones E. E., Lüth P., Oostra J., Ravensberg W. J., Renaud R., Rinzema A., Weber F. J., Whips J. M. The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: production by solid-state fermentation, application and marketing // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. Vol. 56. P. 58—68.

Doehlemann G., Berndt P., Hahn M. Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea* // *Microbiology*. 2006. Vol. 152. P. 2625—2634.

Elzein A., Kroschel J. Influence of agricultural by-products in liquid culture on chlamydospore production by the potential mycoherbicide *Fusarium oxysporum* Foxy 2 // *Biocontrol Sci. Technol.* 2004. Vol. 14, N 8. P. 823—836.

Eyal J., Baker C. P., Reeder J. D., Devane W. E., LumSDen R. D. Large-scale production of chlamydospores of *Gliocladium virens* strain GL-21 in submerged culture // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1997. Vol. 19. P. 163—168.

Frey S., Magan N. Production of the fungal biocontrol agent *Ulocladium atrum* by submerged fermentation: accumulation of endogenous reserves and shelf-life studies // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. Vol. 56. P. 372—377.

Gerding-González M., France A., Sepulveda M., Campos J. Use of chitin to improve a *Beauveria bassiana* alginate-pellet formulation // *Biocontrol Sci. Technol.* 2007. Vol. 17, N 1. P. 105—110.

Hocking A. D. Responses of xerophilic fungi to changes in water activity // *Stress tolerance in fungi* / Ed. D. H. Jennings. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993. P. 233—256.

Hoffmann P. Factors influencing survival of dried organisms / Eds E. Koch, P. Leinonen // *Formulation of microbial inoculants* / Proc. of COST Action 830 Meeting. Braunschweig, Germany, 5—6 February 2001. P. 12—15.

Hölker U., Höfer M., Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. Vol. 64. P. 175—186.

Jackson M. A., Schisler D. A. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules // *Mycol. Res.* 1995. Vol. 99, N 7. P. 879—884.

Jackson M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1997. Vol. 19. P. 180—187.

Jackson M. A., Cliquet S., Iten L. B. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* // *Biocontrol Sci. Technol.* 2003. Vol. 13, N 1. P. 23—33.

Jenkins N. E., Heviefio G., Langewald J., Cherry A. J., Lomer C. J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopenesticides // *Biocontrol News and Information*. 1998. Vol. 19, N 1. P. 21—31.

Inoue M., Mori N., Yamanaka H., Tsurushima T., Miyagawa H., Ueno T. Self-germination inhibitors from *Colletotrichum fragariae* // *J. Chem. Ecol.* 1996. Vol. 22, N 11. P. 2111—2122.

Kolombet L. V., Zhigletsova S. K., Kosareva N. I., Bystrova E. V., Derbyshev V. V., Krasnova S. P., Schisler D. Development of an extended shelf-life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum* // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008. Vol. 24, N 1. P. 123—131.

Larena I., De Cal A., Liñán M., Melgarejo P. Drying of *Epicoccum nigrum* conidia for obtaining a shelf-stable biological product against brown rot disease // *J. Appl. Microbiol.* 2003. Vol. 94. P. 508—514.

Lawrie J., Down V. M., Greaves M. P. Effects of storage on viability and efficacy of granular formulations of the microbial herbicides *Alternaria alternata* and *Trematophoma lignicola* // *Biocontrol Sci. Technol.* 2001. Vol. 11. P. 283—295.

Lax A. R., Templeton G. E., Myer W. L. Isolation, purification, and biological activity of a self-inhibitor from conidia of *Colletotrichum gloeosporioides* // *Phytopathology*. 1985. Vol. 75. P. 386—390.

Leathers T. D., Gupta S. C., Alexander N. J. Mycopesticides: status, challenges and potential // *J. Ind. Microbiol.* 1993. Vol. 12. P. 69—75.

Leland J. E., Mullins D. E., Vaughan L. J., Warren H. L. Effects of media composition on submerged culture spores of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Pt 2: Effects of media osmolality on cell wall characteristics, carbohydrate concentrations, drying stability, and pathogenicity // *Biocontrol Sci. Technol.* 2005. Vol. 15, N 4. P. 393—409.

Ley S. V., Cleator E., Harter J., Hollowood C. J. Synthesis of (-)-Gloeosporone, a fungal autoinhibitor of spore germination using a π -allyltricarboxyliron lactone complex as a templating architecture for 1,7-diol construction // *Org. Biomol. Chem.* 2003. Vol. 1. P. 3263—3264.

Macko V., Staples R. C., Allen P. J., Renwick J. A. A. Identification of the germination serf-inhibitor from wheat stem rust uredospore // *Science*. 1971. Vol. 173. P. 835—836.

Macko V., Staples R. C., Gershon H., Renwick J. A. A. Serf-inhibitor of bean rust uredospores: Methyl 3, 4-dimethoxycinnamate // *Science*. 1970. Vol. 170. P. 539—540.

Magan N. Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents / Eds T. M. Butt et al. // *Fungi as Biocontrol Agents* CAB International, 2001. P. 239—251.

Magan N. *Fungi in Extreme Environments* / Eds C. P. Kubicek, I. S. Druzhinina // *Environmental and Microbial Relationships. The Mycota IV*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. P. 85—103.

Marchiori R., Nachtigal G. F., Coelho L., Yorinori J. T., Pitelli R. A. Comparison of culture media for the mass production of *Bipolaris euphorbiae* and its impact on *Euphorbia heterophylla* dry matter accumulation // *Summa Phytopathologica*. 2001. Vol. 27, N 4. P. 428—432.

Masangkay R. F., Paulitz T. C., Hallet S. G., Watson A. K. Solid substrate production of *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae* conidia // *Biocontrol Sci. Technol.* 2000. Vol. 10. P. 399—409.

Mitchell J. K. Development of a submerged-liquid sporulation medium for the potential smartweed bioherbicide *Septoria polygonorum* // *Biol. Control*. 2003. Vol. 27. P. 293—299.

Mitchell J. K., Njalamba-Bertsch M., Bradford N. R., Birdsong J. A. Development of a submerged-liquid sporulation medium for the johnsongrass bioherbicide *Gloeocercospora sorghi* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2003. Vol. 30. P. 599—605.

Montazeri M., Greaves M. P. Effects of nutrition on desiccation tolerance and virulence of *Colletotrichum truncatum* and *Alternaria alternata* conidia // *Biocontrol Sci. Technol.* 2002. Vol. 12. P. 173—181.

Montazeri M., Greaves M. P., Magan N. Microscopic and cytochemical analysis of extracellular matrices and endogenous reserves of conidia of *Colletotrichum truncatum* harvested from carbon- and nitrogen-limited cultures // *Biocontrol Sci. Technol.* 2003. Vol. 13, N 7. P. 643—653.

Montesinos E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection // *Int. Microbiol.* 2003. Vol. 6. P. 245—252.

Müller-Stöver D., Kroschel J., Sauerborn J. Viability of different propagules of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* during the formulation into wheat flour-kaolin granules / Eds E. Koch, P. Leinonen // *Formulation of microbial inoculants. Proc. Meeting / Braunschweig, Germany, 5 and 6 February 1999*. 2001. P. 83—89.

Müller-Stöver D., Kroschel J., Thomas H., Sauerborn J. Chlamydospores of *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *orthoceras* (Appel et Wollenw.) Bilai as inoculum for wheat flour-kaolin granules to be used for the biological control of *Orobanche cumana* Wallr. // *Europ. J. Plant Pathol.* 2002. Vol. 108. P. 221—228.

Müller-Stöver D., Thomas H., Sauerborn J., Kroschel J. Two granular formulations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* to mitigate sunflower broomrape *Orobanche cumana* // *BioControl*. 2004. Vol. 49. P. 595—602.

Norman D. J., Trujillo E. E. Development of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *clidemiae* and *Septoria passiflorae* into two mycoherbicides with extended viability // *Plant Dis.* 1995. Vol. 79, N 10. P. 1029—1032.

Pascual S., Melgarejo P., Magan N. Production of the fungal biocontrol agent *Epicoccum nigrum* by solid substrate fermentation: effect of water activity on accumulation of compatible solutes // *Mycopathologia*. 1999. Vol. 146. P. 83—89.

Pascual S., Melgarejo P., Magan N. Water availability affects the growth, accumulation of compatible solutes and the viability of the biocontrol agent *Epicoccum nigrum* // *Mycopathologia*. 2002. Vol. 156. P. 93—100.

Patiño-Vera M., Jiménez B., Balderas K., Ortiz M., Allende R., Carrillo A., Galindo E. Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose // *J. Appl. Microbiol.* 2005. Vol. 99. P. 540—550.

Pfirter H. A., Guntli D., Ruess M., Défago G. Preservation, mass production and storage of *Stagonospora convolvuli*, a bioherbicide candidate for field bindweed (*Convolvulus arvensis*) // *BioControl*. 1999. Vol. 44. P. 437—447.

Pupin A. M., Messias C. L., Piedrabuena A. E., Roberts D. W. Total lipids and fatty acids of strains of *Metarhizium anisopliae* // *Brazilian J. Microbiol.* 2000. Vol. 31. P. 121—128.

Qiang S., Zhu Y., Summerell B. A., Li Y. Mycelium of *Alternaria alternata* as a potential biological control agent for *Eupatorium adenophorum* // *Biocontrol Sci. Technol.* 2006. Vol. 16, N 7. P. 653—668.

Quimby P. C. Jr., Zidack N., Boyette C. D., Grey W. E. A simple method for stabilizing and granulating fungi // *Biocontrol Sci. Technol.* 1999. Vol. 9, N 1. P. 5—8.

Quimby P. C. Jr., Mercadier G., Meikle W., Vega F., Fargues J., Zidack N. Enhancing biological control through superior formulations: a worthy goal but still a work in progress / Eds M. Vurro et al. // *Enhancing biocontrol agents and handling risks*. Amsterdam: IOS Press, 2001. P. 86—95.

Quimby P. C. Jr., Caesar A. J., Birdsall J. L., Connick W. J. Jr., Boyette C. D., Zidack N. K., Grey W. E. Granulated formulation and method for stabilizing biocontrol agents // *US Patent*. 2002. N 6455036 B1.

Rangel D. E. N., Anderson A. J., Roberts D. W. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance // *J. Invertebrate Pathol.* 2006. Vol. 93 P. 127—134.

Shah F. A., Wang C. S., Butt T. M. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic *Metarhizium anisopliae* // *FEMS Microbiol. Letters*. 2005. Vol. 251. P. 259—266.

Shabana Y. M., Müller-Stöver D., Sauerborn J. Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life // *Biol. Control*. 2003. Vol. 26. P. 189—201.

Shearer J. F., Jackson M. A. Liquid culturing of microsclerotia of *Mycocleptodiscus terrestris*, a potential biological control agent for the management of hydrilla // *Biol. Control*. 2006. Vol. 38. P. 298—306.

Silman R. W., Bothast R. J., Schisler D. A. Production of *Colletotrichum truncatum* for use as a mycoherbicide: effects of culture, drying and storage on recovery and efficacy // *Biotechn. Adv.* 1993. Vol. 11. P. 561—575.

Silman R. W., Nelsen T. C. Optimization of liquid culture medium for commercial production of *Colletotrichum truncatum* // *FEMS Microbiol. Letters*. 1993. Vol. 107. P. 273—278.

Smart M. G., Howard K. M., Bothast R. J. Effect of carbon dioxide on sporulation of *Alternaria crassa* and *Alternaria cassiae* // *Mycopathologia*. 1992. Vol. 118. P. 167—171.

Smith D. Tolerance to freezing and thawing / Ed. D. H. Jennings // *Stress tolerance in fungi*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993. P. 145—171.

Solomon P. S., Waters O. D. C., Orgens C. I. J., Lowe R. G. T., Rechberger J., Trengove R. D., Oliver R. P. Mannitol is required for asexual sporulation in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* (glume blotch) // *Biochem. J.* 2006. Vol. 399. P. 231—239.

Sparace S. A., Wymore L. A., Menassa R., Watson A. K. Effects of the *Phomopsis convolvulus* conidial matrix on conidia germination and the anthracnose disease of field bindweed (*Convolvulus arvensis*) // *Plant Dis.* 1991. Vol. 75. P. 1175—1179.

Stephan D., Zimmermann G. Locust control with *Metarhizium flavoviride*: drying and formulation of submerged spores / Eds E. Koch, P. Leinonen // Formulation of microbial inoculants. Proc. Meeting. Braunschweig, Germany, 5 and 6 February 1999. 2001. P. 27—34.

Tarocco F., Lecuona R. E., Couto A. S., Arcas J. A. Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. Vol. 68. P. 481—488.

Teshler M. P., Ash G. J., Zolotarov Y., Watson A. K. Increased shelf life of a bioherbicide through combining modified atmosphere packaging and low temperatures // *Biocontrol Sci. Technol.* 2007. Vol. 17, N 4. P. 387—400.

Vorlop K. D., Rose T., Patel A. V. Encapsulation technology / Eds E. Koch, P. Leinonen // Formulation of microbial inoculants / Proc. of COST Action 830 Meeting. Braunschweig, Germany, 5—6 February, 2001. P. 45—50.

Winder R. S., Wheeler J. J. Encapsulation of microparticles in teardrop shaped polymer capsules of cellular size // US Patent. 2001. N 6248321 B1.

Winder R. S., Wheeler J. J., Conder N., Otvos I. S., Nevill R., Duan L. Microencapsulation: a strategy for formulation of inoculum // *Biocontrol Sci. Technol.* 2003. Vol. 13. P. 155—169.

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

Yu X., Hallet S. G., Shepard J., Watson A. K. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccoides* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1998. Vol. 20. P. 333—338.

Zidack N. K., Quimby P. C. Formulation of bacteria for biological weed control using the Stabilize method // *Biocontrol Sci. Technol.* 2002. Vol. 12, N 1. P. 67—74.

ВНИИ защиты растений
Санкт-Петербург
aberestetski@yahoo.com

Поступила 26 V 2008

Р Е З Ю М Е

Обзор литературы посвящен различным аспектам биологии, экологии и биохимии грибов, которые связаны с разработкой эффективных микопестицидов.

Ключевые слова: биопестициды, микромицеты, биология, биохимия, экология, микогербициды, микоинсектициды, микофунгициды, производство, хранение, препараты.

S U M M A R Y

The review is devoted to connections between fungal biology, biochemistry, their ability to survive in extreme environment and development of effective mycopesticides.

Key words: biopesticides, fungi, biology, biochemistry, ecology, stress tolerance, mycoherbicides, mycoinsecticides, mycofungicides, production, stabilization, formulation.