

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ПОИСК БАКТЕРИЙ-АНТАГОНИСТОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
БОЛЕЗНЕЙ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) В
САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 422 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета
Курочкиной Юлии
Александровны

Научный руководитель
к.б.н., доцент


А.М. Петерсон
08.06.2023

Зав. кафедрой
д.б.н., профессор


С.А. Степанов
08.06.2023

Введение

Актуальность темы. Овощи составляют неотъемлемую часть рациона человека из-за содержания в них важных питательных веществ. Одним из наиболее часто употребляемых свежих овощей является томат. Плоды этого растения являются богатыми источниками ликопина, способствующего профилактике онкологических заболеваний и атеросклероза [1].

Томаты чаще всего употребляют без какой-либо обработки. Но из-за того, что плоды содержат много жидкости, они наиболее восприимчивы к порче, вызываемой микроорганизмами. При хранении потери плодов томатов составляют около 25% от всего собранного урожая, поэтому крайне важно найти такой способ хранения, чтобы они долго оставались свежими и не подвергались действию различных патогенных микроорганизмов.

В последнее время для защиты растений все чаще используются биопрепараты. Они обладают более выраженной избирательностью действия, безвредны для человека и быстро разлагаются в почве. Наиболее часто используются биопрепараты на основе бактерий *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas*, грибов рода *Trichoderma* [2].

Для увеличения эффективности биоконтроля требуется создание новых препаратов и расширение их ассортимента.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы стал поиск бактерий-антагонистов, эффективных против большинства фитопатогенов, вызывающих порчу томатов при хранении в Саратовской области. Для достижения указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Установить способность штаммов грибов, изолированных с различных поражённых органов растений томата, вызывать патологии плодов этой культуры.

2. Изучить влияние бактерий-антагонистов из музея кафедры микробиологии и физиологии растений СГУ имени Н.Г. Чернышевского на фитопатогены, вызывающие патологии плодов томата. Определить наиболее эффективных антагонистов.

3. Доказать безопасность отобранных штаммов бактерий-антагонистов для растений томата в условиях *in vitro*.

4. Изучить влияние наиболее эффективных антагонистов на продолжительность хранения плодов томата.

Материал и методы исследования. Материалом послужили плоды и листья томатов сортов Валентина (частное приусадебное хозяйство г. Энгельса), Сливка (ЗАО «Энгельское»), Пилигрим (ЗАО «Покровск Агро»). Также использовались штаммы, выделенные в ходе предыдущих исследований с растений томатов, имеющих различные патологии: *Alternaria alternata* 5, *A. solani* 102, *Apophysomyces jiangsuensis* 8, *Cladosporium lycopersicum* 76, *Colletotrichum gloeosporoides* 97, *Penicillium lanosum* 71, *Rhizopus* sp. 34, *R. stolonifer* 7. В работе были использованы штаммы бактерий из музея кафедры микробиологии и физиологии растений СГУ имени Н.Г. Чернышевского, выделенные с различных растений и обладающие антагонистической активностью по отношению к различным фитопатогенам: *Bacillus cereus* A52, *B. circulans* A46, *B. clausii* A39, *B. firmus* A29, *B. halodurans* A30, *B. pumilis* 171, *B. soli* 9, *Curtobacterium flaccumfaciens* 1, *Microbacterium lacticum* 4, *Pseudomonas alcaligenes* 3.

Для инфицирования фитопатогенными грибами использовали плоды томатов сорта Валентина. Подготавливали фрагменты плодов с цельной поверхностью и с надрезом. 5-суточную культуру каждого гриба наносили на фрагменты плодов. Контролем служили части томата с надрезом сверху и без. Чашки помещали во влажные камеры. Учет результатов проводили на 3, 7 и 11 сутки. Для оценки степени поражения была использована 3-х бальная шкала, где 1 балл – поражено менее 50 % образца, 2 балла – от 50 до 90%, 3 балла – от 90 до 100%.

Для определения влияния антагонистов использовали плоды и листья томатов сорта Валентина. Подготавливали по 2 фрагмента плодов и листьев: с цельной поверхностью и с надрезом. Исследование проводилось аналогично предыдущему опыту в течение 7 суток.

Для изучения спектра используемых антагонистами источников углерода и азота были проведены следующие тесты: гидролиз желатины (МПЖ), образование сероводорода из пептона (МПБ), образование кислоты из глюкозы, сахарозы, лактозы, маннита, арабинозы и мальтозы (среды Гисса), гидролиз крахмала (ГРМ-агар + 1% крахмала), липолитическая, целлюлолитическая и пектолитическая активность, способность использовать пептон (МПБ), способность использовать белок (МПЖ), редукция нитратов (нитратный бульон), фиксация азота (среда Эшби), ассимиляция азота минеральных солей. Постановку тестов проводили по общепринятым методикам [3].

Антагонистическую активность бактерий по отношению к фитопатогенам определяли с помощью метода блоков. Грибы газоном засеивали на среду PDA, затем накладывали блоки с трёхсуточными культурами антагонистов. Инкубацию проводили в течение 5 суток. Эффективность действия антагонистов определяли по диаметру зон подавления роста фитопатогенов.

Определение влияния бактерий на фитопатогенные грибы в условиях *in vitro* проводили на плодах и листьях томатов сорта Валентина. Для исследования использовали 3 наиболее эффективных штамма. В пробирки с физиологическим раствором вносили культуру одного из штаммов бактерий и культуру одного из грибов. 0,1 мл взвеси наносили на фрагменты плодов и листьев. Учет результатов проводили на 7 сутки. Результат оценивали по 3-х бальной шкале.

Для исследования влияния бактерий-антагонистов на хранение плодов использовали томаты сортов Сливка и Пилигрим. Обработку проводили тремя самыми эффективными штаммами бактерий. Готовили бактериальную взвесь концентрацией 10^6 КОЕ/мл. Взвесь наносили на плоды, которые помещали в пластиковые контейнеры, в каждом по 5 плодов. Контейнеры хранили при температуре +2 °С. Учет проводили через 1, 2 и 3 недели. Результаты оценивали по 3-х бальной шкале.

Выделение микроорганизмов с пораженных плодов производили методом высева на среду PDA с дальнейшей идентификацией по определителям грибов

Д. Саттон [4] и Ф. Б. Ганнибала [5].

Для обработки результатов исследования антагонистической активности бактерий рассчитывали среднее арифметическое и ошибку среднего арифметического для определения пределов колебания средних значений. Для определения наиболее эффективного штамма антагониста использовали анализ Крускала-Уоллиса [6]. При изучении влияния антагонистов на хранение плодов томата для выявления достоверных отличий контрольных образцов от обработанных использовали тест Манна-Уитни [7].

Структура и объем работы. Работа изложена на 55 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы и список использованных источников. Работа проиллюстрирована 13 таблицами и 8 рисунками. Список использованных источников включает в себя 54 наименования.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлена информация о ботанической характеристике *Solanum Lycopersicum*, о нормальной микробиоте растений томата, о влиянии условий хранения на изменение микробиоты плодов томатов, об основных возбудителях порчи плодов томата при хранении, об использовании бактерий-антагонистов при хранении овощной продукции.

В главе «Результаты исследования» представлены результаты экспериментов по выявлению способности микроорганизмов, изолированных с пораженных растений томата, вызывать патологии плодов, а также по изучению влияния бактерий-антагонистов на растения томата.

На первом этапе работы была подтверждена способность полученных штаммов грибов вызывать какие-либо патологии плодов томатов. На инфицированных плодах уже через 3 суток наблюдался рост грибов. Патологии были отмечены лишь на плодах с надрезом, что показывает защитную функцию покровных тканей плодов и более быстрое развитие фитопатогенов на томатах с поврежденной поверхностью. Рост грибов усиливался к 7 суткам, а к 11 суткам большая часть образцов была полностью покрыта грибами.

Все исследуемые штаммы фитопатогенных микроорганизмов оказались

способны вызывать патологии плодов томатов. К концу эксперимента 42% грибов давали поражение в 2 балла, 50% – в 3 балла. Большая степень поражения наблюдалась на поврежденных образцах, что объясняется проникновением фитопатогенов внутрь плода и быстрым развитием за счет питательных веществ.

Наиболее сильные поражения вызывали фитопатогенные грибы *Alternaria alternata* 5, *A. solani* 102, *Apophysomyces jiangsuensis* 8. Грибы рода *Alternaria* являются возбудителями альтернариоза различных растений [8].

Для того чтобы использовать бактерий-антагонистов для защиты плодов томатов от порчи, нужно убедиться, что они не являются фитопатогенными. Для этого было проведено исследование их влияния на плоды и листья томатов. Ни один штамм бактерий не вырос на исследуемых объектах и не вызвал патологий, что доказывает их безопасность для растений.

Для того чтобы применять бактерий-антагонистов в составе биопрепаратов, нужно знать, какие источники азота и углерода они могут использовать, ведь на поверхности плодов микроорганизмы могут получить и белки, и липиды, и углеводы.

Наиболее востребованным источником углерода оказался крахмал. Это можно объяснить тем, что крахмал может образовываться в результате распада растительных клеток. 70% штаммов оказались способны использовать глюкозу, 60% – мальтозу, 40% – сахарозу и маннит, 30% – лактозу и арабинозу. Целлюлолитической активностью обладали 30% штаммов. Разложение целлюлозы может быть фактором фитопатогенности. Поэтому были также проведены тесты на пектолитическую активность, которой не обладал ни один исследуемый штамм. Большая часть исследуемых штаммов не обладает липолитической активностью. В среде выделения данных бактерий низкое содержание липидов, поэтому большинство штаммов не могут использовать жиры в качестве источника углерода.

Среди источников азота все штаммы способны использовать соли аммония, нитраты и нитриты. 60% исследуемых штаммов способны

использовать атмосферный азот. Способность к азотфиксации распространена среди бактерий рода *Bacillus*, для которых это соединение может служить резервным источником азота при отсутствии более доступных вариантов.

Была исследована способность антагонистов подавлять рост грибов, изолированных при патологиях томатов. Оказалось, что многие использованные штаммы подавляют их рост в лабораторных условиях. Наибольший антагонистический эффект показали *B. pumilus* 171, *B. soli* 9 и *B. firmus* A29. Это может быть связано с их способностью к продукции различных биологически активных веществ. Среди фитопатогенов наиболее эффективно были подавлены штаммы *A. alternata* 5 и *A. solani* 102. Это имеет важное значение, так как альтернариоз распространен в Саратовской области и часто вызывает патологии растений томатов.

На следующем этапе была проверена их способность подавлять рост фитопатогенов на поверхности листовых пластинок и плодов томатов. На листьях рост фитопатогенов полностью отсутствовал как в опыте, так и в контроле, поэтому можно сделать вывод, что данные грибы вызывают патологии только плодов томатов. Контрольные образцы плодов были полностью поражены фитопатогенными грибами. На обработанных плодах более слабый рост по сравнению с контролем был отмечен у *A. solani* 102 и *A. alternata* 5.

Обработка плодов *B. firmus* A29 существенно снижала развитие фитопатогенов в сравнении с контрольными образцами. Данный штамм полностью подавил рост *Rhizopus* sp. 34 и *P. lanosum* 71.

Далее было исследовано влияние бактерий-антагонистов на хранение плодов томата. В первые 2 недели исследования фитопатогены практически не вызывали порчу томатов. Отмечено большее поражение томатов сорта Пилигрим. Через 3 недели после начала эксперимента обработанные штаммом *B. firmus* A29 плоды сорта Сливка имели патологии, оцениваемые в 1 (60% плодов) и 2 балла (40% плодов). На одном из образцов сорта Пилигрим рост фитопатогенов достиг 3-х баллов. *B. soli* 9 повлиял на хранение плодов томатов

следующим образом: среди образцов сорта Сливка появились те, степень поражения которых достигла 1 (40%) и 2 (20%) баллов, а среди образцов сорта Пилигрим 40% имели патологии в 2 балла и так же 40% – в 3 балла. Поражение обработанных *V. pumilus* 171 плодов достигло 3-х баллов.

К концу эксперимента многие образцы сорта Пилигрим были покрыты фитопатогенными микроорганизмами. На поверхности плодов был отмечен рост грибов. Среди плодов сорта Сливка были образцы без патологий. Была отмечена сортоспецифичность действия исследованных штаммов. К концу эксперимента томаты сорта Пилигрим были поражены фитопатогенами больше, чем томаты сорта Сливка.

Тест Манна-Уитни доказал отсутствие достоверных отличий между обработанными и контрольными образцами. Используемые штаммы бактерий не смогли продлить срок хранения плодов томатов.

В ходе микробиологических исследований было выяснено, что порча была вызвана несколькими видами фитопатогенных микроорганизмов, среди которых были обнаружены преимущественно грибы.

Среди грибов с поверхности плодов томатов с патологиями были выделены следующие виды: *Alternaria japonica*, *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. chlamydosporum*, *Stemphylium lycopersici*.

Таким образом, использованные штаммы бактерий-антагонистов не смогли увеличить продолжительность хранения плодов томатов и не защитили их от порчи, так как она была вызвана комплексом фитопатогенов, среди которых оказались те, против которых антагонисты были не эффективны. Поэтому необходимо продолжать поиск такого вида микроорганизмов, эффективного против всего комплекса фитопатогенов.

Выводы

1. Штаммы грибов (*Alternaria alternata* 5, *A. solani* 102, *Apophysomyces jiangsuensis* 8, *Cladosporium lycopersicum* 76, *Colletotrichum gloeosporoides* 97, *Penicillium lanosum* 71, *Rhizopus* sp. 34, *R. stolonifer* 7), изолированные с

различных поражённых органов растений томата, оказались способны вызывать патологии плодов этой культуры.

2. Исследованные штаммы бактерий-антагонистов (*Bacillus cereus* A52, *B. circulans* A46, *B. clausii* A39, *B. firmus* A29, *B. halodurans* A30, *B. pumilus* 171, *B. soli* 9, *Curtobacterium flaccumfaciens* 1, *Microbacterium lacticum* 4, *Pseudomonas alcaligenes* 3) способны подавлять рост фитопатогенов томата и безопасны для самих растений томата.
3. Наиболее широким спектром антагонистической активности по отношению к фитопатогенам томата обладали *B. firmus* A29, *B. soli* 9, *B. pumilus* 171.
4. Данные антагонисты не способны защищать плоды томатов от порчи в процессе хранения.

Список использованных источников

1 Гаджиева, А. М. Ликопин томатов – растительный пигмент с универсальными свойствами / А. М. Гаджиева, З. У. Абасова, Д. А. Маллаева // Студент года 2020: – сборник научных трудов. – Петрозаводск: Международный центр научного партнерства «Новая Наука», 2020. – С. 300-302.

2 Маскаленко, О. А. Биопрепараты для защиты томата от семенной инфекции при хранении генетической коллекции / О. А. Маскаленко, С. Н. Нековаль // Аграрная наука. – 2019. – Т. 3, № 1. – С. 124-126.

3 Петерсон, А. М. Практические рекомендации для идентификации сапрофитных и условно-патогенных бактерий по фенотипическим признакам. / А. М. Петерсон, П. А. Чиров. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2005. – 85 с.

4 Саттон, Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди // Пер. с англ. К. Л. Тарасова и Ю. Н. Ковалева. – М.: Мир, 2001. – 468 с.

5 Ганнибал, Ф. Б. Мониторинг альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria* / Ф. Б.

Ганнибал. – Санкт-Петербург: Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений РАСХН, 2011. – 70 с.

6 Лакин, Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

7 Кожевников, С. П. Алгоритмы биологической статистики / С. П. Кожевников – Ижевск: Изд. центр «Удмуртский университет», 2018. – 75 с.

8 Орина, А. С. Видовое разнообразие, биологические особенности и география грибов рода *Alternaria*, ассоциированных с растениями семейства *Solanaceae* / А. С. Орина, Ф. Б. Ганнибал, М. М. Левитин // Микология и фитопатология. – 2010. – Т. 44, № 2. – С. 150-159.

