

Министерство образования и науки Российской Федерации
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., 1753)
В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

биологического факультета

Курочкиной Юлии Александровны

Научный руководитель

к.б.н., доцент

А. М. Петерсон

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

С. А. Степанов

Саратов 2025

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.

В связи с этим целью данной работы стал поиск бактерий-антагонистов, эффективных против большинства фитопатогенов, вызывающих порчу томатов при хранении в Саратовской области.

Для реализации 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, выделенных с сельскохозяйственных растений на территории Саратовской области, на

фитопатогенов, изолированных с томатов. Определить наиболее эффективных антагонистов.

3. Получить мутантные штаммы бактерий-антагонистов и выявить изменение их антагонистической активности по отношению к фитопатогенам.

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

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

Материал и методы исследования. Работа проводилась в 2022-2025 гг. на базе кафедры микробиологии и физиологии растений биологического факультета Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского.

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 oryzae* 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.

Также использовались 65 штаммов бактерий, изолированных с 25 здоровых плодов томатов разных сортов, выращенных на территории фермерских хозяйств Саратовской области.

Для выделения с поверхности плодов томата бактерий-антагонистов проводили посева фрагмента плода методом отпечатка на питательную среду ГРМ-агар (Оболенск). Для исследования отбирались зрелые визуально здоровые плоды томатов разных сортов без механических повреждений и признаков порчи.

Для выделения возбудителей порчи плодов томата при хранении посев производился аналогичным образом на среду PDA (200 г картофеля; 1 л дистиллированной воды; 2 % глюкозы; 2 % голодного агара) для фитопатогенных грибов.

Все посеы инкубировали при температуре +28 °C в течение 3-х суток для выделения бактерий и 5-7 суток для выявления грибов.

Для идентификации выделенных грибов были изучены культуральные свойства и морфология органов спороношения. Определение видовой принадлежности грибных штаммов проводили по определителям грибов Д. Саттон [3] и Ф. Б. Ганнибала [4]. Для идентификации выделенных штаммов бактерий по фенотипическим признакам были изучены их морфологические, культуральные и биохимические свойства. Постановку тестов проводили по общепринятым методикам [5].

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 балльная 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.

Антагонистическую активность бактерий по отношению к фитопатогенам определяли с помощью метода блоков, а также использовали модифицированный метод перпендикулярных штрихов.

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.

С целью повышения антагонистической активности выделенных штаммов бактерий использовали ненаправленный индуцированный мутагенез. В качестве мутагенного агента применяли УФ-лучи, источником которых служил ультрафиолетовый бактерицидный облучатель ОВУ-1209. Время облучения составляло от 1 до 10 минут с шагом в 1 минуту при длине волны 254 нм, после чего чашки выдерживали в темноте в течение 2 часов во избежание фотореактивации.

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 объём работы. Работа изложена на 80 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 18 таблицами и 12 рисунками. Список использованных источников включает 99 наименований.

Научная новизна. Впервые проверена антагонистическая активность бактерий-ассоциантов здоровых плодов томата и предпринята попытка повысить эффективность выделенных микроорганизмов с помощью индуцированного мутагенеза. Впервые проверена безопасность этих бактерий для растений томата.

Научная значимость. Проведённые исследования существенно расширили представления об антагонистической активности выделенных бактерий по отношению к фитопатогенам томата. Полученные данные послужат научной основой для дальнейшего совершенствования биологических методов защиты растений томата от фитопатогенов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Исследованные штаммы бактерий-антагонистов, изолированные с вегетативных органов различных сельскохозяйственных растений, способны подавлять рост фитопатогенов томата и безопасны для самих растений томата.

2. Бактерии-ассоцианты здоровых плодов томата участвуют в поддержании колонизационной резистентности к микромицетам – возбудителям порчи.

3. Природные и мутантные штаммы бактерий-антагонистов не способны полностью подавить рост микромицетов разных видов на растениях томата.

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.

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 oryzae* 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 *B. 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.

В ходе дальнейшей работы были микробиологически исследованы здоровые плоды томатов с целью поиска новых антагонистов из состава нормальной микробиоты томата. Среди выделенных микроорганизмов отбирали грамположительные палочки, так как известно, что среди представителей рода *Bacillus* и близких ему спорообразующих родов наиболее часто встречаются штаммы с фунгистатической активностью [9, 10].

В результате проведённых исследований было выделено 30 штаммов бактерий, антагонистическая активность которых была оценена в условиях *in vitro* с помощью модифицированного метода перпендикулярных штрихов. Оказалось, что многие бактерии в какой-то степени были способны подавлять рост фитопатогенов. Самыми эффективными штаммами оказались *B. clausii* 2, *B. halodurans* 24 и *Microbacterium imperiale* 55. Это подтверждает анализ Крускала-Уоллиса. Эти штаммы были подвергнуты индуцированному УФ-мутагенезу, после чего была изучена способность мутантов подавлять рост фитопатогенов томата.

Облучение *M. imperiale* 55 в течение 6 минут и *B. halodurans* 24 в течение 4 минут привело к усилению их антагонистической активности по отношению к *A. alternata* с 15,4 до 55,0 %, и с 0 до 29,2 % соответственно. Остальные штаммы не показали повышения антагонистической активности.

С целью оценки безопасности и потенциальной пригодности облученных штаммов бактерий для разработки биопрепаратов было исследовано их влияние на листья томата в условиях *in vitro*. Штаммы *B. clausii* 2 (5 и 6 минут облучения) и *M. imperiale* 55 (6 минут облучения) не вызывали патологий ни листьев с искусственным надрезом, ни неповрежденных тканей, что может свидетельствовать об их безопасности для растений томата.

Выводы

1. Штаммы грибов (*A. alternata* 5, *A. solani* 102, *A. jiangsuensis* 8, *C. lycopersicum* 76, *C. gloesporoides* 97, *P. lanosum* 71, *R. oryzae* 34, *R. stolonifer* 7), изолированные с различных поражённых органов растений томата, оказались способны вызывать патологии плодов этой культуры.

2. Исследованные штаммы бактерий-антагонистов (*B. cereus* A52, *B. circulans* A46, *B. clausii* A39, *B. firmus* A29, *B. halodurans* A30, *B. pumilis* 171, *B. soli* 9, *C. flaccumfaciens* 1, *M. lacticum* 4, *P. alcaligenes* 3), изолированные с вегетативных органов различных сельскохозяйственных растений, 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. Тест Манна-Уитни показал отсутствие достоверных отличий в поражении обработанных антагонистами и контрольных образцов.

5. Бактерии-ассоцианты здоровых плодов томата участвуют в поддержании колонизационной резистентности к микромицетам – возбудителям порчи, однако эффективность подавления таких грибов различными видами бактерий не превышала 50 %. Наибольшая фунгистатическая активность отмечена у *B. clausii* (25,0-50,0 %), *B. halodurans* (25,0-50,0 %), *M. imperiale* (36,4-42,9 %).

6. Облучение *M. imperiale* 55 в течение 6 минут и *B. halodurans* 24 в течение 4 минут привело к усилению их антагонистической активности по отношению к *A. alternata* с 15,4 до 55,0 %, и с 0 до 29,2 % соответственно. Однако только мутантный штамм бактерии-антагониста *M. imperiale* 55 оказался безопасен для растения томата.

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 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.

4 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.

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

9 Празднова, Е. В. Нерибосомально синтезируемые метаболиты и генетические механизмы их синтеза в реализации фунгицидного эффекта бактерий р. *Bacillus* и *Raenibacillus* (обзор) / Е. В. Празднова, А. И. Андриянов, Н. Г. Васильченко // Живые и биокосные системы. – 2018. – № 25. – С. 6-24.

10 Сидорова, Т. М. Особенности антагонизма бактерий рода *Bacillus* по отношению к токсиногенным грибам *Fusarium* при защите растений от болезни и контаминации микотоксинами (обзор) / Т. М. Сидорова, А. М. Асатулова, В. В. Аллахвердян // Юг России: экология, развитие. – 2021. – Т. 61, № 4. – С. 86-103.