

Экологическая безопасность и эффективность применения биофунгицидов при
холодильном хранении растительной продукции

Автор – Мишин С.С. (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики; Санкт-Петербург)

Научный руководитель – Кипрушкина Е.И. (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики; Санкт-Петербург)

В настоящее время в большом количестве используются химические соединения, для увеличения сроков холодильного хранения растительной продукции. Важное значение приобретают исследования в области биологических соединений и препаратов, созданных на основе микроорганизмов, в меньшей степени наносящих вред растительной продукции и человеку, чем химические соединения.

Ключевые слова: пустыня Намиб, биофунгициды, микробиология, фитопатогены, скрининг.

Цель данной работы – поиск и определение эффективности и безопасности применения биопрепаратов, применяемых при холодильном хранении, для человека.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

-Поиск потенциально новых препаратов, на основе выделенных природных штаммов микроорганизмов, для последующего использования при холодильном хранении растительной продукции.

-Выделить изоляты, обладающих биоконтрольными свойствами.

-Оценить биоконтрольную активность лабораторных образцов изолятов.

-Разработать рекомендации по созданию опытных образцов биопрепаратов, обладающих биофунгицидным действием.

Источниками выделения штаммов, проявляющих антагонизм в отношении фитопатогенных грибов растительной продукции, послужили образцы почвы с континента Африка, пустыня Намиб.

Для выделения потенциальных биоконтрольных штаммов применяли метод Дригальского с использованием питательной среды МПА для выделения бактерий и КАА, для выделения актиномицетов.

Скрининг осуществлялся методом простой окраски и окраски по Граму и оценка внешних морфологических признаков – методом макроскопии.

Описание внешних признаков колоний: оценка профиля, формы, размера, поверхности, блеска и прозрачности, цветности, края, структуры и консистенции колоний.

Анализ окраски по Граму осуществляется следующим образом: на фиксированный мазок нанести карболово-спиртовой раствор генцианового фиолетового через полоску фильтровальной бумаги. Через 1—2 мин ее снять, а краситель слить. Нанести раствор Люголя на 1—2 мин. Обесцветить этиловым спиртом в течение 30—60 с до прекращения отхождения фиолетовых струек красителя. Промыть водой. Докрасить водным раствором фуксина в течение 1—2 мин, промыть водой, высушить и микроскопировать.

Определение фунгицидной активности штаммов

Полученные изоляты исследовали на наличие антагонизма в отношении фитопатогенного гриба *Fusarium coeruleum*.

Изучение свойств производилось с помощью метода агаровых блоков. Гриб-антагонист высевали на агаризованную среду Чапека в чашку Петри. Пробочным сверлом (диаметр 8 мм) вырезали агаровые блоки из колоний гриба и переносили их на поверхность другой агаровой пластинки, предварительно засеянной тест-микроорганизмом *Fusarium coeruleum*. Чашки с агаровыми блоками помещали в термостат на 20-24 ч при температуре, оптимальной для развития тест-культуры. Если выделяемый

грибом антибиотик подавлял рост тест-микроба, то вокруг агарового блока образуется зона отсутствия роста. В центр чашки Петри помещают по одному блоку, вырезанному из колонии гриба-антагониста, затем в чашку наливают питательный агар, пригодный для развития тест-микробов, с таким расчетом, чтобы уровень агара был на 1-2 мм ниже уровня блока. Затем по радиусам агаровой пластинки высевали штрихами тест-организмы и чашки помещали на 20-24 ч в термостат. Отсутствие роста штриха тест-культуры на определенном расстоянии от блока указывает на угнетение ее антибиотиком, образуемым изучаемым грибом-антагонистом.

Анализ активности продуцентов изолятов производили на тест-микрорганоме *Fusarium coeruleum* методом лунок. В чашке Петри, засеянной питательной средой с культурой испытуемого микроорганизма стерильным пробочным сверлом (диаметр 6-8 мм) делают лунки на расстоянии 1,5-2 см от края чашки. В лунки вносился раствор культуральной жидкости с испытуемым штаммом. Далее чашки термостатировались при температуре 28 °С 24ч. Результат учитывался по ширине зоны задержки роста.

Для каждого штамма делали по три повторности. Количественная оценка антагонистической активности культур представлена величинами диаметров зон ингибирования роста тест-грибов, мм.

Для определения характера воздействия выделенных изолятов на растения проводили обработку семян сельскохозяйственных культур суспензией клеток штаммов-антагонистов по методу рост-стимуляции. Определение производилось на тест-растении кресссалата (сорт «Весенний»). Наличие рост-стимулирующего, ингибирующего либо нейтрального эффекта определяли, сравнивая всхожесть семян растений в контрольном (замачивание семян стерильном физрастворе) и опытных вариантах.

Проращивание семян производилось во влажной камере. Замачивание семян производилось в стерильных условиях. Семена предварительно стерилизуют в 70% растворе этанола, после этого промывают дистиллированной водой и помещают на фильтр, в чашку Петри по 20 шт. После этого семена поливают суспензией исследуемой культуры микроорганизмов 10 мл, предварительно разведя до необходимой концентрации. Параллельно устанавливается контрольная чашка Петри с семенами, политыми физраствором. Чашки Петри помещают в термостат и проращивают при температуре = 28 С в течении 3- 5 суток. Определение процента всхожести семян, замер корня и стебля проводили на третьи сутки инкубации. После этого производятся подсчеты результатов, анализ всхожести семян и морфометрические показатели проростков.

Согласно проведенным исследованиям сформирована коллекция выделенных штаммов. Методами макроскопии и микроскопии произведены начальные этапы скрининга по идентификации выделенных штаммов. Показано, что 9 штаммов являются актиномицетами, 16 – бактериями.

Определена фунгицидная активность выделенных штаммов по отношению к тест-микрорганому *Fusarium coeruleum*.

Показана фиторегуляторная активность отдельных штаммов. Наибольшую ростстимуляцию показали штаммы №5,13,16 независимо от концентрации микробальной суспензии.

На основании полученных в первичных опытах *in vitro* результатов для дальнейших исследований в качестве перспективного агента при разработке биофунгицида для холодильного хранения картофеля был отобран штамм №5, показавший высокую биологическую активность в отношении агрессивного патогена клубней при холодильном хранении *Fusarium coeruleum*.