

А.К. Туякова, М.С. Уразова, А.М. Сатенова*, С.М. Шайхин

РГП на ПХВ «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, Астана, Казахстан

*Автор для корреспонденции: Bota1990@mail.ru

Перспективность применения штаммов *Metschnikowia pulcherrima* для борьбы с возбудителями послеуборочной порчи плодов

Аннотация. Была исследована микробная контаминация поверхности свежих фруктов, выращенных в частных садовых хозяйствах Алматинской области. В качестве объектов исследования использовали свежие яблоки сортов – Апорт, Лимонка, Превосход, Грушовка и груши сортов – Дюшес и Талгарка. Всего было выделено 77 изолятов. Видовая идентификация позволила отнести их к 8 видам. Для биопрепарата было решено использовать микроорганизмы *Metschnikowia pulcherrima*. Скрининг штаммов осуществлялся на основе способности дрожжей подавлять фитопатогенные грибы *Penicillium expansum*, *Colletotrichum acutatum* и *Alternaria alternata*. В результате были отобраны 2 штамма с максимальными показателями фунгицидной активности: *Metschnikowia pulcherrima* MP D12-21 и *Metschnikowia pulcherrima* MP C10-21.

Ключевые слова: яблоки, *Metschnikowia pulcherrima*, фитопатогенные грибы, биопрепарат, антагонизм, фунгицидная активность, биопрепарат.

DOI: 10.32523/2616-7034-2022-140-3-76-82

Введение

Наукой доказано, что в Казахстане в предгорьях Алатау, появились первые дикие яблоки (Яблоня Сиверса), которые впоследствии были одомашнены и благополучно распространены в другие регионы, страны и континенты. Стоит отметить, что именно этот регион (предгорья Заилийского, Жонгарского Алатау в Алматинской области, Таласского Алатау в Жамбылской области) являлся и остается основной зоной промышленного садоводства в Казахстане. На сегодняшний день причина существенных потерь урожая овощей и фруктов связана с поражением плодов фитопатогенными грибами [1]. Актуальной задачей является разработка безопасных, но эффективных фунгицидов для защиты плодов [2,3]. Необходимо регулярно обновлять существующие препараты, так как спектр этих патогенов расширяется [4,5]. Целью данной работы явилось изучение фунгицидной и антагонистической активностей выделенных штаммов дрожжей по отношению к плесневым грибам, являющимся причиной послеуборочной порчи плодов.

Объекты и методы исследования

Фитопатологический анализ изучали с применением методов визуальной диагностики и микроскопирования. Фитопатогенные микроорганизмы *Penicillium expansum* (голубая плесень), *Alternaria alternata*, *Colletotrichum acutatum* выделяли из пораженных плодов яблок и груш с дальнейшим культивированием на среде Чапека при температуре 27° С в течение 14 суток. Из плодов отбирали по 1 г и засекали на различные питательные среды: МПА, Сабуро Агар, MRS agar, Чапека агар, картофельно-декстрозный агар. Инкубировали в аэробных условиях при (30±1) °С в течение 24-48 ч. После инкубации для первоначальной идентификации изучали морфолого-культуральные свойства и микроскопию выросших колоний. Жизнеспособность культур микроорганизмов определяли методом Miles&Misra [6].

Идентификацию выделенных изолятов проводили с использованием системы Bruker

MALDI-TOF Biotyper. Образцы для MALDI-TOF MS готовили следующим образом: проводили прямой перенос свежей единичной колонии на полированную стальную мишень MSP 96 (Bruker Daltonik), подсушивали. Покрывали 1µl насыщенного раствора α-сано-4-гидрокси-синамной кислоты (HCCA) matrix solution в 50% ацетонитриле-2.5% трифторуксусной кислоты (Bruker Daltonik) и сушили при комнатной температуре [7].

Исследование степени антагонистической активности изучаемых штаммов по отношению к фитопатогенным микроорганизмам выполняли методом агаровых блоков. Для этого суспензию тест-культур фитопатогенных микроорганизмов с концентрацией 10^7 КОЕ/мл вносили в расплавленный агар, затем подготовленную смесь разливали в чашки Петри. После застывания агара на его поверхность помещали агаровые блоки, вырезанные из газона исследуемого штамма, с титром микробных клеток 1×10^8 КОЕ/мл. Агаровые блоки размещали ростом (газоном) вверх на равном расстоянии друг от друга, плотно прижимая к агаровой пластинке. Подготовленные чашки Петри инкубировали при температуре 28°C, оптимальной для тест-культуры. Задержку роста фитопатогенных микроорганизмов при обработке исследуемыми штаммами контролировали через 7 суток.

Фунгицидную активность определяли с помощью метода Cross-Streak. Согласно методу, исследуемые штаммы дрожжей с помощью микробиологической петли и шпателя наносили на чашки со средой Сабуро. Затем культивировали в термостате при температуре 28°C в течение 48ч. Далее после двух суток инкубации на чашки Петри с бактериальным штрихом раскладывали блоки тест-патогенов диаметром не более 1 мм. Предварительно культуры грибов были выращены в течение 14 суток. Контролем служили чашки с культурой гриба, но без изучаемых штаммов. О фунгицидной активности дрожжей судили по диаметру роста колонии гриба [8].

Результаты исследования

Для исследования были выбраны наиболее востребованные среди потребителей и широко распространенные в Алматинской области 4 сорта яблок: Апорт, Лимонка, Превосход, Грушовка и 2 сорта груш: Дюшес, Талгарская красавица. Фрукты данных сортов отличаются высокими показателями качества, размерами плодов, а также большим содержанием витаминов, пектина и углеводов. Микробиологические исследования проводили согласно ГОСТ 10444.15-94.

Микробиологический анализ показал, что основной эпифитной микрофлорой поверхности фруктов являются бактерии, дрожжи и плесневые грибы.

Для идентификации микроорганизмов выращенные единичные колонии из всех возможных разведений были отсеяны на соответствующие питательные среды.

Получено более 70 изолятов, среди которых грамположительные и грамотрицательные палочки, грамположительные и грамотрицательные кокки и дрожжи (рисунок 1).

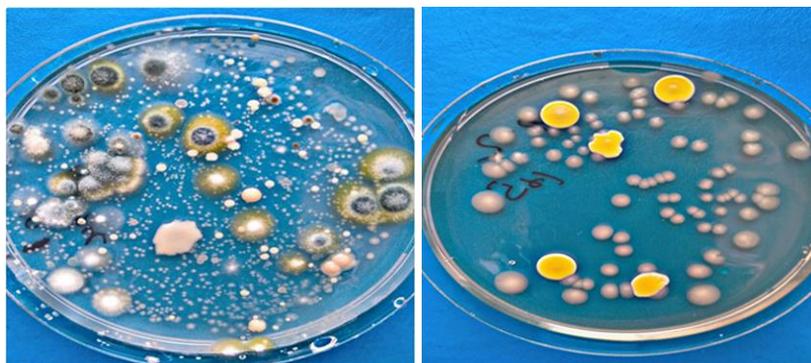


Рисунок 1. Рост микроорганизмов, выделенных с яблок на среде Чапека

Дальнейшая идентификация с использованием системы Bruker MALDI-TOF Biotyper позволила отнести 77 изолятов к 8 следующим видам: *Rhodococcus erythropolis* (2), *Pediococcus pentosaceus* (3), *Metschnikowia pulcherrima* (9), *Acinetobacter guillouiae* (30), *Arthrobacter histidinolovorans* (6), *Pseudomonas fluorescens* (1), *Pseudomonas tolaasii* (2), *Arthrobacter nicotinovorans* (24).

На рисунке 2 приведены наиболее часто выделяющиеся виды эпифитной микрофлоры на поверхности фруктов.

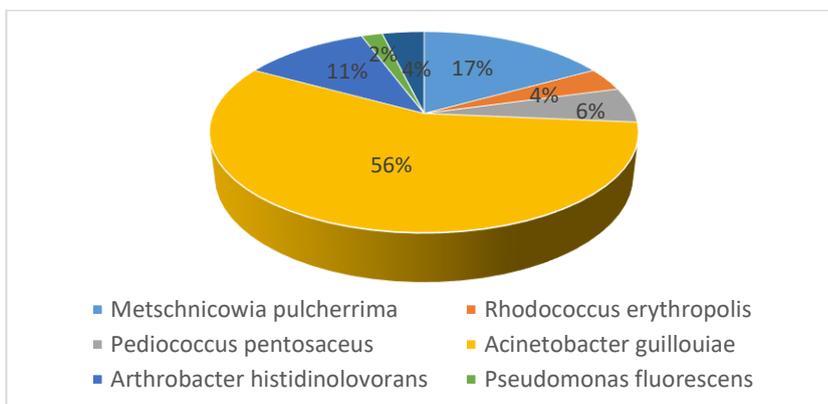


Рисунок 2. Видовой состав выделенных бактерий

Основываясь на культурально-морфологической картине и проведенной Малди идентификации, отобрали 8 изолятов дрожжей. На твердых питательных средах Сабуро большинство культур дрожжей представляли собой темно-бурые крупные колонии круглой формы, диффундирующие в среду вишневым пигмент.

Известно, что гниение и порча фруктов в период хранения вызывается преимущественно плесневыми грибами, которые особенно быстро развиваются на поврежденной поверхности. Было обнаружено, что плесневые грибы на поверхности исследуемых сортов яблоки груш представлены большим разнообразием фитопатогенных микроорганизмов видов: *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *Colletotrichum acutatum* (рисунок 3).

Для выявления поражения поверхности яблок фитопатогенными микроорганизмами фрукты хранили в закрытых боксах при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха 95 % в течение 16 суток. Указанные неблагоприятные условия хранения создавали специально для увеличения интенсивности роста плесеней на поверхности яблок.

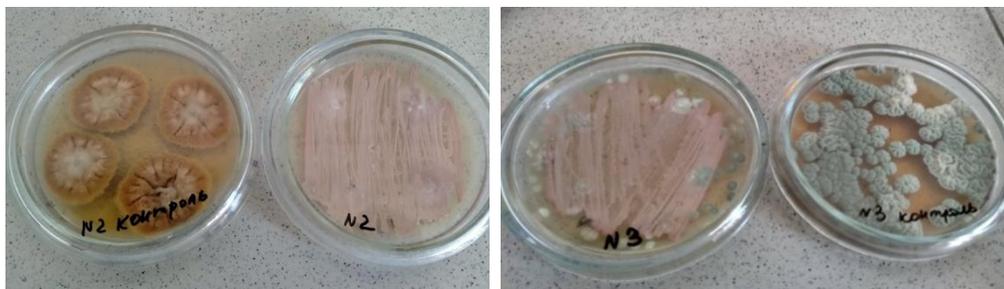


Рисунок 3. *Penicillium expansum* на яблоках сорта Превосход и грушах сорта Талгарское

При изучении антагонистической активности дрожжей к фитопатогенным грибам были получены следующие результаты: высокие показатели подавления роста гриба *Alternaria alternata* были выявлены у *Metschnikowia pulcherrima* МР G-19 ($35 \pm 1\text{мм}$), *Metschnikowia pulcherrima* МР H7-19 ($36,1 \pm 0,3\text{мм}$), *Metschnikowia pulcherrima* МР D 12-21 ($28 \pm 0,3\text{мм}$), *Metschnikowia pulcherrima* МР G1-21 ($26 \pm 1,0\text{мм}$), *Metschnikowia pulcherrima* МР C10-21 ($30 \pm 1\text{мм}$). Также выше среднего значения

отмечалась антагонистическая активность у всех штаммов дрожжей к грибу *Penicillium expansum* (диаметр зон составил от 18 до 24 мм) и к *Colletotrichum acutatum* (от 17 до 25 мм).

При изучении фунгицидной активности дрожжей методом Cross-Streak также было обнаружено, что все штаммы *Metschnikowia pulcherrima* способны подавлять рост и развитие гриба или его спороношение, но с различной интенсивностью (рисунок 4).



а - *Alternaria alternata* б - *Penicillium expansum*

Рисунок 4. Подавление роста плесневых грибов исследуемыми культурами дрожжей

В таблице 1 отображены результаты фунгицидной активности на примере штамма *Metschnikowia pulcherrima* МР С10-21.

Таблица 1

Фунгицидная активность *Metschnikowia pulcherrima* МР С10-21

Объекты исследования		Диаметр колонии грибов в зоне роста дрожжей, мм		
		3-и	7-е	14-е
<i>Alternaria alternata</i>	Контроль	13±0,54	22±0,6	39,3±03
	<i>M. pulcherrima</i> МР С10-21	0	2,3±0,5	6,9±0,42
<i>Penicillium expansum</i>	Контроль	Сплошной рост	Сплошной рост	Сплошной рост
	<i>M. pulcherrima</i> МР С10-21	0	0	0
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Контроль	11±0,34	47±0,8	53±0,6
	<i>M. pulcherrima</i> МР С10-21	0	4,4±03	5,2±0,83

С 3-го дня наблюдений рост плесневых грибов не зарегистрирован, а на 7-й день отмечался сплошной рост исследуемых штаммов и едва заметный рост грибов. Рост колонии *Penicillium expansum* на чашках с дрожжами не был выявлен в течение всего периода наблюдений. На 14-й день диаметр колоний грибов *Colletotrichum acutatum* составлял 5,2±0,83 мм, а в контроле 53±0,6 и у *Alternaria alternata* 6,9±0,42 мм, что меньше, чем в контрольной чашке на 46,2 мм.

Выводы

Результаты исследования показали, что изоляты дрожжей *Metschnikowia pulcherrima* обладают широким спектром фунгицидной активности по отношению к фитопатогенным грибам родов *Alternaria*, *Penicillium*, *Colletotrichum*. По итогам исследования были отобраны два штамма *Metschnikowia pulcherrima* МР D12-21 и *Metschnikowia pulcherrima* МР С10-21. Заявленные штаммы перспективны с целью разработки биопрепарата для обеспечения длительного хранения плодов.

Финансирование. Исследования проводились в рамках проекта ИРН АР09260001 «Получение биопрепарата для обеспечения длительного хранения и высокого качества плодовых культур Казахстана».

Список литературы

1. Портал проекта UNEP-GEF Bioversity International «Insitu/onfarm сохранение агробιοразнообразия плодовых культур и их диких сородичей в Центральной Азии». [Электронный ресурс] - URL: <http://centralasia.bioversity.asia/> (дата обращения: 15.07.2020).
2. Wisniewski M., Droby S. The postharvest microbiome: The other half of sustainability // *Biological Control*. -2019. - Vol. 137. -P. 104025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104025>.
3. Van den Heijden M.G.A., Hartmann M. Networking in the plant microbiome // *PLoS Biol*. - 2016. - Vol. 14(2). - P .1-9. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002378>.
4. Shafi Jamil Tian, Hui & Ji Mingshan. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. - 2017. - Vol. 3. - P. 446-459. DOI: <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>.
5. Tumbariski Y., Nikolova R., Petkova N., Ivanov I., & Lante, A. Biopreservation of fresh strawberries by carboxymethyl cellulose edible coatings enriched with a bacteriocin from *Bacillus methylotrophicus* BM47 // *Food Technology and Biotechnology*. - 2019. - Vol. 57, №2. - P.230-237. DOI: <https://doi.org/10.17113/ftb.57.02.19.6128>.
6. Бекенова Н.Е., Дауылбай С.С., Бекенова Э.Е., Ануарбекова С.С. Выделение и идентификация дрожжей перспективных для утилизации лактозы // *Успехи современного естествознания*. - 2015. - №-2. - С. 126-131.
7. Schulthess B., Bloemberg G.V., Zbinden R., Böttger E.C., Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory // *Journal of clinical microbiology*. - 2014. - Vol. 52, №4. - P. 1089-1097.
8. Зимоглядова Т.В., Шабалдас О.Г., Карташева И.А. Практикум по микробиологии: учебное пособие. - Москва: Колос, 2007. - С. 148.

А.К. Туякова, М.С. Уразова, А.М. Сатенова, С.М. Шайхин

ҚР БҒМ ҒК «Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы» РМК, Астана, Қазақстан

Егін жиналғаннан кейінгі жемістердің қоздырғыштарымен күресу үшін *Metschnikowia pulcherrima* штамдарын қолдану перспективасы

Аңдатпа. Алматы облысының жеке бау-бақша шаруашылықтарында өсірілген жаңа піскен жемістердің беткі қабаттарының микробиалдық контаминациясы зерттелді. Зерттеу нысаны ретінде Апорт, Лимонка, Превышход, Грушовка және Дюшес және Талгарка сұрыптарының жаңа алмалары пайдаланылды. Барлығы 77 изолятор бөлінді. Түрлік сәйкестендіру оларды 8 түрге жатқызуға мүмкіндік берді. Биологиялық өнім үшін *metschnikowia pulcherrima*

микроорганизмдерін қолдану туралы шешім қабылданды. Штамдардың скринингі ашытқының фитопатогенді *Penicillium expansum*, *Colletotrichum acutatum* және *Alternaria alternata* саңырауқұлақтарын басу қабілетіне негізделген. Нәтижесінде фунгицидтік белсенділіктің максималды көрсеткіштері бар 2 штамм таңдалды: *Metschnikowia pulcherrima* МР D12-21 және *Metschnikowia pulcherrima* МР C10-21.

Кілт сөздер: Алма, *Metschnikowia pulcherrima*, фитопатогенді саңырауқұлақтар, биологиялық өнім, антагонизм, фунгицидтік белсенділік, биологиялық өнім.

A.K. Tuyakova, M.S. Urazova, A.M. Satenova, S.M. Shaikhin
Republican Collection of Microorganisms, Astana, Kazakhstan

The prospect of using strains of *Metschnikowia pulcherrima* to combat pathogens of post-harvest spoilage of fruits

Abstract. Pre-treatment of fruits with biological products before placing them for long-term storage leads to a decrease in epiphytic microflora. The scientific article presents the results of studying the biological properties of antagonist strains that suppress the growth of phytopathogenic microorganisms. The article investigates microbial contamination of the surface of fresh fruits grown in private orchards in the Almaty region.

The purpose of the article is to study the fungicidal and antagonistic activities of the isolated yeast strains in relation to molds, which are the cause of the post-harvest spoilage of fruits. The objects of study were fresh apples of varieties - Aport, Limonka, Golden excellent, Pear and pear varieties - Duches and Talgar beauty, phytopathogenic microorganisms isolated from affected fruits - *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *Acremonium alternatum*.

There were 77 isolates in total. Species identification allowed them to be attributed to 8 species. It was decided to use *Metschnikowia pulcherrima* microorganisms for bio preparation. Pre-harvesting with the use of these yeasts is becoming increasingly popular, as they successfully colonize the surface of fruits, preventing the reproduction of pathogens. Protection, in this case, is provided by the substance pulcherrimin, a red chelates of iron, which is produced by some yeast and bacteria. It plays an important role in establishing the role of microorganisms at the ecosystem level, controlling the growth and biofilm formation of pathogens. Screening of strains was carried out based on the ability of yeast to suppress phytopathogenic fungi *Penicillium expansum* and *Alternaria alternate*, *Acremonium alternatum*.

As a result, there were selected 2 yeast strains with the highest indicators of fungicidal activity such as *Metschnikowia pulcherrima* МР D12-21 and *Metschnikowia pulcherrima* МР C10-21.

Keywords: apples, *Metschnikowia pulcherrima*, phytopathogenic fungi, biopreparation, antagonism, fungicidal activity, biopreparation.

References

1. Portal proyekta YUNEP-GEFBioversityInternational «Insitu/onfarm Sokhraneniye agrobioraznoobraziya plodovykh kul'turnykh i dikikh sorodichey v Tsentral'noy Azii» [Portal of the UNEP-GEF Bioversity International project "Insitu/onfarm conservation of agrobiodiversity of fruit crops and their wild relatives in Central Asia"] [Electronic resource] - Available at: <http://centralasia.bioversity.asia/> (Accessed: 15.07.2020). [in Russian]
2. Wisniewski M., Droby S. The postharvest microbiome: The other half of sustainability, *Biological Control*, 137, 104025 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019>.
3. Van den Heijden M.G.A., Hartmann M. Networking in the plant microbiome, *PLoS Biol.*, 14(2), 1-9 (2016). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002378>.

4. Shafi Jamil Tian, Hui & Ji Mingshan. Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 3, 446-459 (2017). DOI: <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>.

5. Tumbarski Y., Nikolova R., Petkova N., Ivanov I., & Lante, A. Biopreservation of fresh strawberries by carboxymethyl cellulose edible coatings enriched with a bacteriocin from *Bacillus methylotrophicus* BM47, *Food Technology and Biotechnology*, 57(2), 230-237 (2019). DOI: <https://doi.org/10.17113/ftb.57.02.19.6128>.

6. Bekenova N.E., Dauylbai S.S., Bekenova E.E., Anuarbekova S.S. Vydeleniye i identifikatsiya drozhzhey perspektivnykh dlya utilizatsii laktozy [Isolation and identification of yeast promising for the utilization of lactose], *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya* [Successes of modern natural science], 2, 126-131(2015). [in Russian]

7. Schulthess B., Bloemberg G.V., Zbinden R., Böttger E.C., Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory, *Journal of clinical microbiology*, 52(4), 1089-1097 (2014).

8. Zimoglyadova T.V., Shabalda O.G., Kartasheva I.A. Praktikum po mikrobiologii: uchebnoye posobiye [Workshop on microbiology: study guide] (Moskva, Kolos, 2007, 148 s. [Moscow, Kolos, 2007, 148 p.]). [in Russian]

Сведения об авторах:

Туякова А.К. - научный сотрудник, РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, ул. Ш.Уалиханова, 13/1, Астана, Казахстан.

Уразова М.С. - кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, ул. Ш.Уалиханова, 13/1, Астана, Казахстан.

Сатенова А.М. - магистр, младший научный сотрудник, РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, ул. Ш.Уалиханова, 13/1, Астана, Казахстан.

Шайхин С.М. - доктор биологических наук, заведующий лабораторией генетики и биохимии микроорганизмов, РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, ул. Ш.Уалиханова, 13/1, Астана, Казахстан.

Tuyakova A.K. - Researcher, Republican Collection of Microorganisms, 13/1 Valikhanova str., Astana, Kazakhstan.

Urazova M.S. - Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Republican Collection of Microorganisms, 13/1 Valikhanova str., Astana, Kazakhstan.

Satenova A.M. - Master, Junior Researcher, Republican Collection of Microorganisms, 13/1 Valikhanova str., Astana, Kazakhstan.

Shaikhin S.M. - Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Genetics and Biochemistry of Microorganisms, Republican Collection of Microorganisms, 13/1 Valikhanova str., Astana, Kazakhstan.