

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**БАКТЕРИИ РОДА *PSEUDOMONAS*(M., 1894), ВЫДЕЛЯЕМЫЕ
С ОВОЩНОЙ ПРОДУКЦИИ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы

направления подготовки магистратуры 060401 Биология

биологического факультета

Аль-Хазраджи Мустафа Тхаер Хамид

Научный руководитель

к.б.н., доцент

А. М. Петерсон

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

С. А. Степанов

Саратов 2020

Введение

Актуальность темы. Поверхность растений, в том числе и овощей, всегда населена микроорганизмами. Их состав и численность зависят от вида и сорта растения, степени зрелости, расстояния от почвы в период вегетации, природно-климатической зоны [1]. Попадая на готовую овощную продукцию, эти микроорганизмы будут существенно влиять на их безопасность для человека, длительность срока хранения. Одним из наиболее важных компонентов микрофлоры овощей являются бактерии рода *Pseudomonas*. С одной стороны, представители этого рода могут играть негативную роль: вызывать различные гнили при хранении овощей, попадание на овощную продукцию патогенных псевдомонад представляет угрозу для здоровья человека [2]. С другой стороны, псевдомонады, являясь активными продуцентами антибиотиков, могут сами подавлять нежелательную микрофлору на поверхности овощей во время их хранения [3]. Таким образом, изучение видового состава и биологических свойств псевдомонад, встречающихся на овощах, имеет большое теоретическое и практическое значение.

Цель и задачи работы. Целью данной работы явилось выявление видового состава и биологических особенностей бактерий рода *Pseudomonas*, выделяемых с овощной продукции. Для реализации указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

- 1) Выделить бактерии рода *Pseudomonas* с корнеплодов моркови, с плодов томатов и огурцов, капусты и листьев салата, реализуемых в торговой сети г. Саратов (Россия) и г. Дияла (Ирак).
- 2) Провести идентификацию выделенных изолятов.
- 3) Установить долю этих бактерий в общей микробной обсеменённости исследованной овощной продукции.
- 4) Определить наличие у выделенных штаммов факторов фитопатогенности.

5) Изучить антагонистическую активность изолятов в отношении возбудителей гнилей овощей.

Материал и методы исследования. Материалом для исследований послужили корнеплоды моркови, плоды томатов и огурцов, капуста и листья салата, реализуемые в торговой сети г. Саратов (Россия) и г. Дияла (Ирак). Было исследовано по 10 проб каждого вида овощей из России и Ирака. Для выявления антагонистической активности псевдомонад в отношении возбудителей гнилей овощей, исследовали корнеплоды моркови, плоды томатов и огурцов, листья капусты, поражённые гнилями или плесневыми грибами

Микробиологические исследования овощей проводили на кафедре микробиологии и физиологии растений СГУ имени Н.Г. Чернышевского (Россия) и в микробиологической лаборатории Университета г. Дияла (Ирак) в 2019-2020 гг.

Для выделения псевдомонад с поверхности овощей использовали метод отпечатка на питательной среде Кинг Б. Культивировали при температуре +28°C в течение 2-3 суток, после чего из колоний делали мазки, окрашивали по Граму. С грамотрицательными палочками ставили тесты на каталазу и оксидазу, выявляли их подвижность. Грамотрицательные подвижные оксидазо- и каталазоположительные палочки отсевали на скошенные среды для дальнейшего изучения их биохимической активности. Видовую принадлежность бактерий определяли по фенотипическим признакам с помощью определителя бактерий Берджи [4].

При выделении возбудителей порчи овощной продукции, овощи с признаками поражения гнилями или плесневыми грибами засевали методом отпечатка на картофельную среду и среду PDA. Посевы на картофельной среде культивировали в течение 2-3 суток, на среде PDA – 5-6 суток при температуре 28°C. Затем посевы просматривали, определяли доминирующие штаммы и отсевали их на аналогичные скошенные среды для дальнейшего изучения. Для идентификации выделенных грибов изучали их

морфологические и культуральные свойства. Видовую принадлежность грибов устанавливали с помощью определителей [5].

Антагонистическую активность изучали методом встречного роста культур [6]. В качестве контроля использовали диск с культурой гриба на чашке без антагонистов. Степень ингибирования роста мицелия патогена определяли по формуле: $I = (1 - (A/B)) \times 100$, где И - % ингибирования; А - рост гриба в варианте; В - рост гриба в контроле.

Для проверки целлюлолитической активности производили посев на среду с целлюлозой. Способность к мацерации определялась на стандартных тест-объектах: клубнях картофеля, корнеплодов моркови и свёклы [7].

Структура и объём работы. Работа изложена на 61 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 13 таблицами и 3 рисунками. Список использованных источников включает 75 наименований.

Научная новизна. Впервые проведено сравнение обсеменённости бактериями рода *Pseudomonas* овощной продукции, реализуемой в торговых сетях России и Ирака. Впервые проведено двустороннее исследование возможного воздействия псевдомонад на овощную продукцию при хранении: их способности вызывать какие-либо виды порчи и их возможности подавлять рост других микроорганизмов, вызывающих порчу овощей при хранении.

Научная значимость. Полученные результаты существенно расширяют представления о роли бактерий рода *Pseudomonas* в микробиологических процессах, происходящих на поверхности овощей при их хранении. Выявленные особенности позволяют скорректировать мероприятия по увеличению продолжительности хранения овощной продукции.

Положения, выносимые на защиту:

1. Видовой состав псевдомонад на овощной продукции, выращенной и реализованной в России и Ираке во многом схож. Наиболее часто с поверхности овощей выделяются *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes*.

2. *P. fluorescens* может играть заметную роль в защите плодов и корнеплодов от фитопатогенов в процессе их хранения. Виды, наиболее часто встречающиеся на овощах (*P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes*) практически не оказывают антагонистического воздействия на возбудителей порчи овощной продукции.

3. Из всех исследованных нами штаммов только *P. chlororaphis* P3 обладает широким набором факторов фитопатогенности и способен вызывать порчу разных видов овощной продукции.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных о поверхности овощей как среде обитания микроорганизмов, микроорганизмах, населяющих поверхность овощей, микроорганизмах, вызывающих порчу овощей при их хранении, патогенных и условно-патогенных микроорганизмах, которые встречаются на поверхности плодов и овощей, об особенностях биологии бактерий рода *Pseudomonas*.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о доле бактерий рода *Pseudomonas* в микробной ассоциации поверхности различных овощей, видовом составе псевдомонад, выделенных с поверхности овощей, антагонистической активности псевдомонад по отношению к возбудителям порчи овощной продукции при хранении, наличии факторов фитопатогенности у бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных с овощной продукции.

Исследования показали, что бактерии рода *Pseudomonas* присутствуют на поверхности всех исследованных овощей. Однако, ни на одном из исследованных видов овощей представители этого рода не являлись доминирующими. Основная масса выделяемых бактериальных видов

являлась представителями рода *Bacillus*, что вполне закономерно, т.к. наличие споры у этих бактерий позволяет им выживать в самых неблагоприятных условиях. В небольшом количестве изолировались грамположительные кокки. Среди грамотрицательных палочек преобладали представители семейства Enterobacteriaceae.

Представители рода *Pseudomonas* в большем количестве присутствовали на поверхности корнеплодов моркови, т.к. корнеплоды в наибольшей степени контактируют с почвой – одной из основных сред обитания бактерий этого рода. Среди бактерий, изолированных с поверхности моркови в России, псевдомонады составляли 9%, в Ираке этот показатель был ещё выше - 11%. Второе место по обсеменённости псевдомонадами занимали томаты, особенно томаты, реализуемые в Ираке (псевдомонады составляли 7% всех изолированных бактерий). На огурцах, салате и капусте псевдомонады встречались редко, и их доля в общей микробной обсеменённости этих продуктов не превышала 5%. Таким образом, содержание псевдомонад на поверхности овощей в большей степени зависит от их вида, а не от региона культивирования.

Было установлено, что на поверхности овощей, реализуемых в России и Ираке, встречаются 7 видов псевдомонад: *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. aeruginosa*.

Из российской овощной продукции наиболее разнообразный видовой состав псевдомонад был отмечен на корнеплодах моркови (5 видов), по 3 вида было изолировано с плодов огурцов и листьев салата, по 2 вида - с плодов томатов и верхних листьев капусты.

В Ираке с аналогичной овощной продукции было выделено 6 видов рода *Pseudomonas*. Наиболее широко псевдомонады были представлены на моркови и томатах. Также как и в России, наиболее часто изолировались виды *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes*.

Количественное содержание видов бактерий рода *Pseudomonas* на овощной продукции сильно варьировало.

В России наиболее высокие количественные показатели (до 10^3 в смыве) отмечались у *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes* на моркови и томатах.

При микробиологических исследованиях, проведённых в Ираке, наибольшие количественные показатели были отмечены у *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes* на моркови, томатах и огурцах, у *P. fluorescens* на моркови и томатах, а также у *P. aeruginosa* на моркови.

Таким образом, наши исследования показали, что наиболее распространёнными видами *Pseudomonas* на овощах, реализуемых как в России, так и в Ираке, являются *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes*, которые имели наиболее высокие показатели встречаемости и численности. Наибольшее количество псевдомонад было выделено с моркови и томатов.

Бактерии рода *Pseudomonas* широко известны как продуценты различных антибиотиков и антибиотикоподобных веществ [1,2]. При этом возможно одновременное супрессирующее действие псевдомонад на фитопатогены как за счёт синтеза сидерофоров, антибиотиков и других вторичных метаболитов, так и за счёт простой конкуренции псевдомонад и фитопатогенов за источники углеродного и азотного питания.

В связи с этим, представляло интерес выяснить, как будут бактерии этого рода воздействовать на возбудителей порчи овощной продукции. С этой целью было проведено микробиологическое исследование овощей с признаками поражения плесневыми грибами или гнилями. Во всех случаях доминантами оказались представители плесневых грибов. На поражённых корнеплодах моркови доминировал гриб *Alternaria radicina* – возбудитель альтернариоза или чёрной гнили моркови, на поражённых листьях капусты обнаружен *Phoma lingam* – возбудитель фомоза или сухой гнили капусты, на плодах огурца – *Sclerotinia sclerotiorum*, возбудитель белой гнили огурцов, на плодах томатов – *Phoma destructive*, возбудитель фомоза или бурой гнили

томатов. Все выявленные виды грибов являются широко распространёнными возбудителями порчи овощной продукции при её транспортировке и хранении.

Для проверки антагонистического действия из каждой группы псевдомонад в эксперименты были взяты штаммы, выделенные в России с поверхности тех же видов овощей, что и тестируемые возбудители.

Оказалось, что виды, наиболее часто встречающиеся на овощах (*P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes*) практически не оказывают антагонистического воздействия на возбудителей порчи овощной продукции. Лишь два штамма этих видов (*P. alcaligenes* P5 и *P. pseudoalcaligenes* P7) оказывали слабое ингибирующее действие на грибы рода *Phoma*.

Наиболее сильное подавляющее действие на все тестируемые виды грибов оказали штаммы *P. fluorescens*. Причём подавление грибов родов *Alternaria* и *Phoma* происходило сильнее, чем грибов рода *Sclerotinia*.

Штаммы *P. chlororaphis* P3 и *P. putida* P16 незначительно подавляли все тестируемые виды грибов, но индекс ингибирования нив одном случае не доходил даже до 50%.

Таким образом, среди бактерий рода *Pseudomonas*, сохраняющихся на овощной продукции в процессе её хранения, лишь *P. fluorescens* может играть заметную роль в защите плодов и корнеплодов от фитопатогенов. Однако этот вид не является доминантным в микробных ассоциациях овощей при хранении.

Среди видов рода *Pseudomonas* известно немало фитопатогенных видов. Однако, среди видов, изолированных в ходе наших исследований, в качестве фитопатогена в литературе указывается лишь *P. chlororaphis* (вызывает поражения корневой системы сахарной свёклы) [8]. Тем не менее, среди сапрофитических видов часто можно встретить штаммы, обладающие потенциальной фитопатогенностью. В связи с этим, представляло интерес

выяснить, имеют ли изолированные нами штаммы псевдомонад какие-либо факторы фитопатогенности.

Оказалось, что целлюлолитической активностью обладал лишь штамм *P.chlororaphis* P3, изолированный с моркови. Мацерирующая активность наших изолятов была намного выше, причём в большей степени мацерировались ткани корнеплодов моркови. Так мацерацию тканей картофеля осуществляли 3 штамма, свёклы – 2 штамма, а моркови – 6 штаммов.

Ни один из исследованных штаммов не мацерировал ткани всех трёх растительных тест-объектов. По два тест-объекта мацерировали *P. alcaligenes* P1, *P.chlororaphis* P3, *P. fluorescens* P9, *P. fluorescens* P18 и *P. putida* P16. *P. pseudoalcaligenes* P4 мацерировал только ткани моркови. Таким образом, из всех исследованных нами штаммов только *P.chlororaphis* P3 обладал широким набором факторов фитопатогенности.

Выводы

1. На овощной продукции, реализуемой в г Саратов (Россия) и г. Дияла (Ирак) представители рода *Pseudomonas* составляли от 2 до 11% всех бактериальных изолятов. В наибольшем количестве они присутствовали на поверхности корнеплодов моркови (9% и 11% соответственно).
2. На поверхности овощей, реализуемых в России и Ираке, встречались 7 видов псевдомонад: *P. alcaligenes*, *P.pseudoalcaligenes*, *P.chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*. *P. aeruginosa*. Условно патогенный вид *P. aeruginosa* был изолирован на территории Ирака с поверхности моркови, томатов и огурцов.
3. Наиболее высокие показатели встречаемости (от 50 до 100%) имели виды *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes* на моркови, томатах и огурцах, реализуемых и в России, и в Ираке.
4. В России наиболее высокие количественные показатели (до 10^3 в смыве) отмечались у *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes* на моркови и томатах, в Ираке – у *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes* на моркови, томатах и

огурцах, у *P. fluorescens* на моркови и томатах, а также у *P. aeruginosa* на моркови.

5. Наиболее сильное подавляющее действие на возбудителей порчи овощной продукции оказали штаммы *P. fluorescens*. Индекс ингибирования ими роста грибов *Alternaria radicina* составил 75-85%, *Phoma destructive* – 73-82%, *Phoma lingam* – 72-80%, *Sclerotinia sclerotiorum* – 44-53%.
6. Из всех исследованных штаммов рода *Pseudomonas* только *P. chlororaphis* РЗ обладал широким набором факторов фитопатогенности, имел высокую целлюлолитическую и пектолитическую активность.

Список использованных источников

1. King, A.D. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce/ A.D. King, J.A. Magnuson, T. Török //J. Food Sci. –1991. –V.5, № 2. – P. 459–461.
2. Жарикова, Г.Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена / Г.Г. Жарикова – Москва: «ACADEMA», 2005. – 209 с.
3. Matthijs, S. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-Pythium activity / S. Matthijs, K. A. Tehrani ,G. Laus// J. Environ. Microbiol. – 2007. –V. 7, №. 5. – P. 111– 131.
4. Hardie, L.D. The Secreted Proteins of *Pseudomonas aeruginosa*: Their Export Machineries, and How They Contribute to Pathogenesis. Bacterial Secreted Proteins: Secretory Mechanisms and Role in Pathogenesis / L.D. Hardie – Caister: Academic Press, 2009. – 48 p.
5. Miller, Jr. Guide to edible and inedible fungi / Jr. Miller, K. Orson, Jr. Miller – Guilford: Pequot Press, 2006. – 343 p.
6. Хархун, Е. В. Использование антагонизма *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* при создании экспериментального биопрепарата и его влияние на состояние микробоценоза почвы: автореф. дис....канд. биол. наук / Е.В. Хархун – Ростов-на-Дону, 2013 – 24 с.

7. Желдакова, Р.А., Мямин В.Е. Фитопатогенные микроорганизмы / Р.А. Желдакова, В.Е. Мямин // Учебно-методический комплекс для студентов биологического факультета специальности 310101 «Биология» – Минск: БГУ, 2006. – 116 с.

8. Пересыпкин, В.Ф. Сельскохозяйственная фитопатология / В.Ф. Пересыпкин – Москва: Агропромиздат, 1989. – 480 с.