

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Элькаиб Х. М., Леонтьев В. Н.

Белорусский государственный технологический университет,

Минск, Республика Беларусь

e-mail: хусам83@mail.ru, leontiev@belstu.by

В статье представлены результаты скрининга образцов молока, говяжьего фарша, рыбы, куриных грудок и крыльев, огурцов, турецкого гороха, фасоли, томатов, винограда, подвергшихся микробиологической порче. Исследованы 44 изолята бактерий рода *Pseudomonas*, идентификацию которых проводили по определителю бактерий Берджи.

Введение

Нарушение целостности клеток пищевых продуктов приводит к активации гидролитических ферментов, которые катализируют расщепление углеводов, белков, липидов. Это ведет к их разрушению с последующей микробной контаминацией. Основной является именно микробиологическая порча [1], она наиболее опасная для человека из-за выделяющихся токсинов и развития болезнетворной микробиоты [2].

Псевдомонады являются грамотрицательными, условно патогенными бактериями из семейства *Pseudomonadaceae*, способными продуцировать различные флуоресцентные и нефлуоресцентные пигменты и передвигаться с помощью полярных жгутиков [3].

Pseudomonas fluorescens, *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas fragi* являются наиболее часто встречающимися видами, однако распределение видов в пищевой экосистеме остается относительно малоизученным [4]. Основная микробная популяция у овощных культур в полевых условиях состоит из видов рода *Pseudomonas*, в особенности присутствующие пигменты обладающие флуоресценцией. Культуры бактерий рода *Pseudomonas* иногда утрачивают способность синтезировать пигмент. Например, некоторые бактерии *Pseudomonas aeruginosa* могут временно или совсем утратить пигментацию. Известны и беспигментные штаммы этого вида. Во время хранения и обработки культур их число возрастает, а при минимальной обработке овощей они играют важную роль в процессе потемнения плодов благодаря их пектинолитической активности. Наиболее широко распространенными видами являются *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chitorii* и *Pseudomonas maltophilia*. Рыбные продукты служат хорошим субстратом для размножения бактерий рода *Pseudomonas*, особенно в условиях аэробного хранения во льду. Действительно, бактерии данного рода считаются одними из главных продуцентов летучих соединений, придающих продуктам неприятный запах (альдегидов, кетонов и сложных эфиров) [5]. *Pseudomonas fragi* оказался

наиболее мощным продуцентом неприятного фруктового запаха, появляющегося в результате расщепления аминокислот [6]. Бактерии *Pseudomonas spp.* также играют важную роль в процессе ферментативной порчи молока. Во время хранения сырого молока они производят много термоустойчивых липолитических и протеолитических ферментов, которые приводят к снижению качества и срока годности переработанного молока [7].

Таким образом, учитывая значительный интерес к роду *Pseudomonas* и его доминантную роль в процессах порчи пищевых продуктов, целью данной работы было классифицировать и оценить ферментативную деятельность большого количества штаммов, выделенных из различных продуктов.

Материалы и методы исследования

Материалом для данного исследования являлись некоторые виды овощей (огурцы, томаты, виноград, турецкий горох, фасоль), а также молоко, мясо, домашняя птица, рыба и жабры рыб.

В начале эксперимента, для выявления представителей рода *Pseudomonas* культуры микроорганизмов высевали на плотные питательные среды (ПА с 2 % глицерином, среду Эндо), а затем на дифференциально-диагностические среды (среду Кинга-Б, среду Хью-Лейфсона, цетримидный агар, среду с 0,3 % агаром) [6].

Навеску измельченного исследуемого материала 20 г помещали в коническую колбу емкостью 100 мл, приливали 5 мл стерильного физиологического раствора. Инкубировали при 30°C в течение 3 сут. Из полученной накопительной культуры осуществляли высеv на плотную элективную синтетическую питательную среду ММ9 для выделения бактерий рода *Pseudomonas* [6]. В качестве элективных факторов использовали способность микроорганизмов к росту в присутствии триптофана – единственного источника углерода и энергии, а также в присутствии кислорода. Образовавшиеся колонии пересевали на дифференциально-диагностическую среду Блеск для исключения патогенных псевдомонад, которые формировали колонии с металлическим блеском. Непатогенные бактерии рода *Pseudomonas* идентифицировали по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам.

Среду Хью-Лейфсона с глюкозой применяют для определения способности псевдомонад окислять глюкозу до глюконовой кислоты в аэробных условиях [7]. Среду Кинга-Б используют для усиления способности псевдомонад продуцировать сине-зеленый пигмент пиоцианин, ярко-красный – пиорубин и бурый – пиовердин. *Ps. Aeruginosa* образует зеленовато-желтый пигмент – флюоресцеин, флюоресцирующий в проходящем УФ свете [8, 9].

Каталазную активность бактерий наблюдали по образованию пузырьков газа в присутствии перекиси водорода [9]. Морфологические особенности клеток бактерий определяли с помощью общепринятых методов [10]. Отнесение бактерий к роду *Pseudomonas* осуществляли по способности

восстанавливать нитраты и нитриты, а также гидролизовать крахмал [9]. Принадлежность бактерий *Pseudomonas* к видам *fluorescens* и *aeruginosa* определяли по способности роста при оптимальных значениях температуры [12].

Для определения бактерий рода *Pseudomonas* принимали во внимание такие показатели, как рост при температуре 4°C и 41°C. Таким образом, псевдомонады выращивали при температуре 4°C в течение 7-10 дней и при температуре 41°C в течение 24 часов соответственно [13, 14].

Результаты

В результате скрининга из образцов молока, говяжьего фарша, рыбы (карп, толстолобик и свежемороженая скумбрия), куриных грудок и крыльев, огурцов, турецкого гороха, фасоли, томатов, винограда, подвергшихся порче, были отобраны 44 изолята бактерий рода *Pseudomonas*, идентификацию которых проводили по определителю бактерий Берджи [15].

Характеристика некоторых выделенных штаммов бактерий представлена в таблице.

Таблица – Характеристика некоторых выделенных штаммов бактерий

Штамм	Отношение к кислороду		Пигменты	Окраска по Граму	Форма клеток	Каталаза	Рост		Восст. Нитратов, нитритов	Гидролиз крахмала
	Аэр	Анаэр					4°C	41°C		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ви-1	ГК	–	+	–	П	+	–	+	+	–
Ви-2	ГК	–	+	–	П	+	–	+	+	–
Ви-3	–	–	–	+	К	+	–	–	–	+
Ви-4	ГК	–	–	–	П	+	+	+	–	–
Жа-1	ГК	–	+	–	П	+	+	–	+	–
Жа-2	ГК	–	+	–	П	+	+	–	+	–
Жа-4	–	–	–	+	К	+	+	–	–	+
Жа-5	ГК	–	+	–	П	+	–	+	+	–
Жа-6	–	–	–	–	К	+	+	–	–	–
Жа-7	–	–	–	+	К	+	–	–	–	+
Жа-8	–	–	–	+	К	+	–	–	–	+
Жа-9	ГК	–	–	–	П	+	+	+	–	–
Мо-1	ГК	–	+	–	П	+	+	–	+	–
Мо-2	ГК	–	+	–	П	+	+	–	+	–
Мя-1	ГК	ГК	+	–	П	+	+	–	–	+
Мя-2	ГК	–	+	–	П	+	–	+	+	–
Мя-3	ГК	–	+	–	П	+	+	–	+	–
Мя-4	ГК	–	+	–	П	+	+	–	+	–
Ту-1	–	–	–	+	К	+	+	–	–	+
Ту-2	ГК	–	+	+	К	+	+	–	–	–
Ту-3	ГК	–	+	–	П	+	–	+	+	–
Ту-4	ГК	ГК	+	–	П	+	+	–	–	+
Ту-5	ГК	–	+	–	П	+	+	–	+	–
Ог-1	–	–	–	+	К	+	–	–	–	+
Ог-2	ГК	–	+	–	П	+	+	–	+	–

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ог-3	–	–	–	+	К	+	–	–	–	+
Ог-4	ГК	–	+	+	К	+	+	–	–	–
По-1	–	ГКГ	–	+	К	+	–	–	–	+
По-2	ГК	–	+	–	П	+	+	–	+	–
По-3	ГК	–	+	–	П	+	+	–	+	–
Ры-1	ГК	ГК	–	+	К	+	+	+	–	+
Ры-2	ГК	ГКГ	–	+	К	+	+	+	–	+
Ры-3	ГК	–	+	+	К	+	+	–	–	–
Ры-4	–	ГКГ	–	+	К	+	–	–	–	+
Ры-5	ГК	ГК	–	+	К	–	+	–	–	+
Ры-6	–	–	–	–	К	+	–	–	–	–
Ры-7	ГК	–	+	–	П	+	–	+	+	–
Ры-8	–	–	–	+	К	+	–	–	–	+
Ф-1	ГК	–	+	–	П	+	–	+	+	–
Ф-2	ГК	–	+	–	П	+	+	–	+	–
Ф-3	–	–	–	–	К	+	–	–	–	–
Ф-4	ГК	–	+	–	П	+	–	+	+	–
Ф-5	ГК	–	+	+	К	+	+	–	–	–
Ф-6	–	ГКГ	–	+	К	+	–	–	–	+

Примечание.

Ви – виноград
Жа – жабры;
Мо – молоко;
Мя – мясо.
Ту – турецкий горох
Ог – огурец

По – помидоры
Ры – рыба;

Аэр – аэробные бактерии;
Анаэр – анаэробные бактерии;
ГК – образование глюконовой кислоты;
Г – газа образование;
П – палочки;
К – кокки.

Как видно из таблицы, 19 штаммов непатогенных бактерий, относящихся к роду *Pseudomonas*, являются аэробами (окисляют глюкозу до глюконовой кислоты), образуют специфические пигменты, представляют собой грамтрицательные палочки, обладают каталазной активностью, восстанавливают нитраты и нитриты, не гидролизуют крахмал.

Большинство изолятов бактерий *P. fluorescens* образовывали бесцветные или желтоватые, выпуклые, гладкие, блестящие колонии. Характерной особенностью колоний являлась внешняя микроструктура, которая имела сетчатое или ячеистое строение. Клетки окрашивали среду в зеленовато-желтый цвет за счет продуцирования пигментов – пиовердина и флуоресцеина.

Бактерии *P. aeruginosa* образовывали бесцветные или желтоватые плоские колонии. Клетки окрашивали среду в сине-зеленый цвет за счет продуцирования пигмента – пиоцианина. Бактерии *P. fluorescens* росли при температуре 4°C, а бактерии *P. aeruginosa* – при температуре 41°C.

Проведенные исследования показали, что штаммы Жа-1, Жа-2, Мо-1, Мо-2, Мя-3, Мя-4, Ог-2, По-3, По-4, Ф-2 принадлежат к виду *fluorescens*, а

штаммы Ви-1, Ви-2, Жа-5, Мя-2, Ту-3, Ту-5, Ры-7, Ф-1, Ф-4 к виду *aeruginosa*.

Выводы

В ходе экспериментальной работы выделены 44 изолята, бактерий рода *Pseudomonas*, вызывающих порчу пищевых продуктов, установлены их морфологические и физиолого-биохимические характеристики, на основании которых идентифицированы 27 штаммов из них 19 штаммов непатогенных бактерий. Образование специфических пигментов и способность к росту при разных температурах позволили установить принадлежность бактерий рода *Pseudomonas* к видам *fluorescens* и *aeruginosa*.

Создана коллекция штаммов бактерий *P. fluorescens* и *P. aeruginosa*, которая в ходе дальнейших исследований послужит основой для изучения и разработки средств защиты продуктов питания от порчи.

Список литературы:

1. Kumar, A. Isolation and Characterization of Microorganisms Responsible for Different Types of Food Spoilages. International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology / A. Kumar [et.al.]. 2011; 1(2): 22-31.
2. Rawat S. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention/ Asian Journal of Plant Science and Research, 2015, 5(4):47-56
3. Леонтьев В. Н., Элькаиб Х. М., Эльхедми А. Э. Порча пищевых продуктов: виды, причины и способы предотвращения // Труды БГУ. 2013. Т. 8, ч. 1. С. 125–130.
4. Жарикова Г. Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена. М.: АСАДЕМА, 2005. 297 с.
5. Джей Дж. М., Лесснер М. Дж., Гольден Д. А. Современная пищевая микробиология / пер. с англ. Е. А. Барановой [и др.]. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. 886 с.
6. Меджидов М.М. Справочник по микробиологическим питательным средам. М.: Медицина, 2003. 208 с.
7. Воробьев А. А., Кривошеин Ю. С., Быков А. С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. М.: Мастерство, 2001. 224 с.
8. Леванова Г.Ф., Парфенова О.В., Кашников С.Ю. Молекулярно-биологические способы идентификации и дифференциации бактерий. М.: АСАДЕМА, 1995. 158 с.
9. Сиволодский Е.П. Синтетическая питательная среда King BS для определения синтеза флюоресцеина бактериями рода *Pseudomonas*. Клиническая лабораторная диагностика, 2012, 10.
10. Смирнов В.В., Киприанова Е. А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наукова думка, 1990. 264 с.
11. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии: в 3 т. / пер. с англ. под ред. Е. Н. Кондратьевой, Л. В. Калакуцкого. М.: Мир, 1983. Т. 1. 536 с.

12. Franzetti L., Scarpellini M. Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, 2007, vol. 57, no. 1, pp. 39–47.
13. Palleroni, N.J., *Pseudomonaceae* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1, Ed.Krigr, N.R., Holt, J.G., et al. 9th ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, (1984) 114.
14. Васильев Д.А. [и др.]. Выделение и типирование бактерии *Pseudomonas putida*. Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии, 2009, 3 (10).
15. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / пер. с англ. под ред. Г. А. Заварзина. М.: Мир, 1997. Т. 1. 432 с. Т. 2. 368 с.

РОЛЬ ФОСФОЛИПИДОВ И НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ ПОКОЯЩИХСЯ
И ПРОРАСТАЮЩИХ СПОРАНГИОСПОР
CUNNINGHAMELLA ECHINULATA И *UMBELOPSIS RAMANNIANA* –
ПРОДУЦЕНТОВ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Мысякина И.С.*, Бокарева Д.А.***, Сергеева Я.Э.**

*Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Москва, РФ

**Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, РФ

Changes in the content and composition of lipids and fatty acids in exogenously dormant ("spores 0") and germinating sporangiospores ("spores P") of zygomycete fungi Cunninhamella echinulata VKM F-663 and Umbelopsis ramanniana VKM F-582 in distilled water were investigated. Changes in spores P lipids compared with spores 0 are expressed in an increase in the proportion of unsaturated fatty acids, in the decrease in the content of massive phospholipids (phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine) and in the increase in the levels of phosphatidylglycerol and phosphatidic acid, which can function as signaling compounds. The level of the basic phospholipid of mitochondrial membranes – cardiolipin in the process of spore exit from the state of dormancy increased in both representatives of zygomycetes. A certain increase in the content of free and esterified sterols was observed in the composition of neutral lipids of the spores of U. ramanniana. During the C. echinulata sporangiospores germination there did not occur any significant changes in the composition of neutral lipid classes, which can be explained by the fact that they are not the main reserve, mobilizing at the exit from the state of dormancy.

Введение. Мицелиальные грибы широко используются в биологических и экологических технологиях в процессах получения биологически активных соединений, органических кислот, ферментов, хитина, липидов, а также в детоксикации ксенобиотиков, процессах очистки сточных вод, биосорбции и