

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИСТОВОГО САЛАТА
И БАЗИЛИКА ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *PS. AERUGINOSA*
И *PS. FLUORESCENS* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Г.В. ГОДОВА², А.А. ОВОД³, Н.В. АСТАХОВА¹, Е.А. КАЛАШНИКОВА²

(¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН;

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования Российский государственный аграрный университет –
МСХА им. К.А. Тимирязева;

³ ООО «ЭкзактЛабс»)

При взаимодействии растительных клеток листового салата и базилика с Ps.aeruginosa ATCC B3994 при использовании электронного микроскопа были выявлены деформации клеточной стенки с нарушениями ее целостности, а также обнаружены увеличенного размера хлоропласты с ультраструктурными изменениями. Ps.fluorescens ATCC 948 локализовались в цитоплазме и хлоропластах клеток без цитотоксического эффекта. Идентификация выделенных из растений изолятов осуществлялась с помощью окраски по Граму, биохимических тестов и ПЦР. Контаминация зеленых культур, не подвергающихся тепловой обработке вирулентным штаммом Ps. aeruginosa, представляет потенциальную угрозу для здоровья и жизни людей.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, зеленые культуры, динамика численности бактерий, фенольные соединения, ультраструктура хлоропластов.

Введение

Микробно-растительные ассоциации являются основой поддержания жизни на нашей планете. Известно, что растения имеют как субстратную, подземную, обильно заселенную ризосферными микроорганизмами, так и надземную части. Почвенные бактерии, грибы способны проникать в корни растений или колонизировать их поверхность. Эпифиты и некоторые бактериальные и грибные паразиты, в свою очередь, развиваются на поверхности листьев в филлосфере [7, 14].

Как правило, между микроорганизмами и макроорганизмами возникают взаимоотношения, носящие характер либо положительного симбиоза (то есть они обоюдно полезны и растениям, и микроорганизмам), либо деструктивного паразитизма, способного причинить вред не только организму-хозяину, но (при использовании трофических цепей) и другим организмам. Пребывание патогенных организмов в растениях является частью цикла их циркуляции во внешней среде. Вероятнее всего, они используют растения как альтернативного хозяина и переносчика в организм человека или животного [6, 11, 14].

Формирование любой микробно-растительной патологической системы определяется, главным образом, «совместимостью» генотипов хозяина и патогена: наличием или отсутствием механизмов устойчивости растений и факторов вирулентности бактерий [20]. Внутренние процессы, защищающие организм растений, находятся под контролем системы гормональной регуляции [12], активация которой приводит к устранению проникшей угрозы внутри организма и способствует повышению устойчивости макроорганизма [24]. В некоторых случаях микроорганизмы, используя систему гормональной регуляции в качестве мишени, тем самым способны манипулировать «поведением» хозяина, оказывая воздействие на его восприимчивость [30].

Наибольшее внимание ученых в последнее время привлекают взаимоотношения распространенных условно-патогенных и патогенных микроорганизмов с зелеными культурами, не подвергающимися тепловой обработке и представляющими опасность для жизни и здоровья человека [18].

Известно, что в зависимости от вида культуры или условий выращивания циклический морфогенез высших растений, обладающих сложным строением, протекает по-разному. В настоящее время оценить взаимодействие некоторых штаммов микроорганизмов в связи с наличием факторов патогенности и высших растений не представляется возможным в естественных условиях. Анализ имеющихся экспериментальных данных и сообщений в области культуры *in vitro* позволяет получать модели растительных организмов в строго контролируемых стерильных условиях [8].

Целью работы является изучение взаимодействия бактерий рода *Pseudomonas* (*Ps.aeuginosa* и *Ps.fluorescens*) с растениями листового салата (*Lactuca sativa* L.) и базилика красного (*Ocimum basilicum* L.) в условиях *in vitro*.

Ps.aeruginosa (синегнойная палочка) – грамотрицательные палочковидные возбудители гнойно-воспалительных заболеваний человека [4, 13]. Вызываемые ими инфекции обычно характеризуются длительностью и сложностью лечения, что напрямую связано с приобретенной устойчивостью инфекционного агента к различным антибиотикам или непосредственно с природой самого возбудителя [5]. Их сопротивляемость терапевтическим мерам связана с формированием устойчивых к факторам окружающей среды биопленок. Возможность некоторого «сообщения» и координации поведения при помощи выделения молекулярных сигналов (Quorum Sensing) имеет особое значение на различных этапах развития биопленки [33, 19]. Инфекции, вызываемые синегнойной палочкой, характеризуются достаточно высоким уровнем летальности – до 40–50% [28, 13]. Установлено, например, что синегнойной инфекции подвержены онкобольные, беременные женщины, пожилые, дети, а также люди с ослабленным иммунитетом [3, 29].

Возможность поражения *P. aeruginosa* любого органа и ткани обусловлена значительным числом различных факторов патогенности (экзотоксин А, экзoэнзим S, цитотоксин), а также высвобождением эндотоксинов при гибели и распаде бактериальной клетки. Кроме выделяемых токсинов, возбудитель синегнойной инфекции проявляет ферментативную активность, увеличивающую патогенные свойства микроорганизма, выделяя, например, протеазу и нейраминидазу, и др. [27].

Ps.fluorescens – широко распространенные непатогенные для человека и животных сапротрофные бактерии, встречающиеся в различных средах обитания, в том числе на различных животных и растительных субстратах. Часто они обнаруживаются в ризосфере и филлосфере растений, являются естественными регуляторами фитопатогенных микроорганизмов, а также усиливают ростовые процессы у растений, повышают их продуктивность и устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды [32].

Материалы и методы исследования

В экспериментах были использованы штаммы *Ps. aeruginosa* ATCC B 3994™ и *Ps. fluorescens* ATCC 948™, полученные из коллекции ООО «ВЕЛЕС», а также зеленые культуры: листовой салат (*Lactuca sativa* L.) и базилик красный (*Ocimum basilicum* L.), полученные в условиях *in vitro*.

Бактерий рода *Pseudomonas* культивировали на среде МПА при температуре 28°C в течение 3-х сут. Зеленые культуры листового салата (*Lactuca sativa* L.) и базилика красного (*Ocimum basilicum*) выращивали до стадии листообразования на среде MS в стеклянных сосудах при влажности в течение 18 сут. [10, 15].

Заражение растений для ультраструктурных исследований проводили с помощью шприца, вводя бактериальную суспензию под каждое растение в дозе 10⁶ м.к/мл. В качестве контроля оставляли растения, под которые вводили по 1,0 мл изотонического раствора NaCl [15, 16].

Биохимические свойства и идентификацию изолятов из растительных тканей оценивали с помощью СИБ-тестов, метода окраски по Граму, ПЦР [16].

Для ПЦР-исследования изолятов псевдомонад использовали видоспецифичные (*PA-SS-F/PA-SS-R*) для выявления *Ps. aeruginosa* и родоспецифичные праймеры (*Ps-for/Ps-rev*) (табл. 1).

Таблица 1

Праймеры, используемые в ПЦР-анализе для идентификации псевдомонад [9]

Выявляемый вид, последовательность	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.
<i>Pseudomonas</i> spp.	Ps-for	5'-GG TCTGAGAGGATGATCAGT	969
	Ps-rev	5'-TTAGCTCCACCTCGCGGC	
<i>Ps. aeruginosa</i>	PA-SS-F	5'-GGGGGATCTTCGGACCTCA	956
	PA-SS-R	5'-TCCTTAGAGTGCCACCCG	

Отдельную колонию каждого штамма ресуспендировали в 500 мкл сверхчистой воды, инкубировали в твердотельном термостате «Термит» (Россия) в течение 10 мин при 95°C и центрифугировали в течение 5 мин при 13 000 об/мин. Надосадочную жидкость использовали для ПЦР-исследований.

Протоколы амплификации соответствовали рекомендациям авторов, предложенных используемых праймеров. Температура отжига для праймеров составляла: 65°C – 60 с; для *PA-SS-F/PA-SS-R*: 58°C – 20 с. Электрофоретическое разделение продуктов реакции проводили в 1,2%-м агарозном геле в трис-боратном буфере при напряжении электрического поля 6 В/см [1] (рис. 1).

Для изучения ультраструктуры клеток инфицированных растений отрезки из срединной части до центральной жилки молодых листьев среднего размера фиксировали в течение 4 ч «на холоде» 2,5%-ным глутаровым альдегидом и 4%-ным раствором оксида осмия, контрастировали 2%-ным раствором уранилацетата и обезвоживали, а затем заливали смолой «Эпон-812» по методу Сабатини [2, 32].

С помощью ультрамикротомы LKB3 (Швеция) получали ультратонкие срезы листьев растений, просмотр которых осуществляли при помощи электронного микроскопа

Libra-120 («Zeiss», Германия) при среднем увеличении от $\times 2500$ до $\times 4000$ с последующей морфометрической обработкой.

Во всех экспериментах биологическая и аналитическая повторяемость измерений была 3-кратной. При морфометрических исследованиях обработку полученных результатов проводили на основании данных, полученных на 100 хлоропластах каждого варианта. Статистическая обработка проводилась в программе Microsoft Office Excel 2007. В таблицах и на графиках представлены средние значения и их стандартные ошибки. Критерий вероятности $P < 0,05$ принимали достаточным для достоверной разницы опытной и контрольной групп данных.

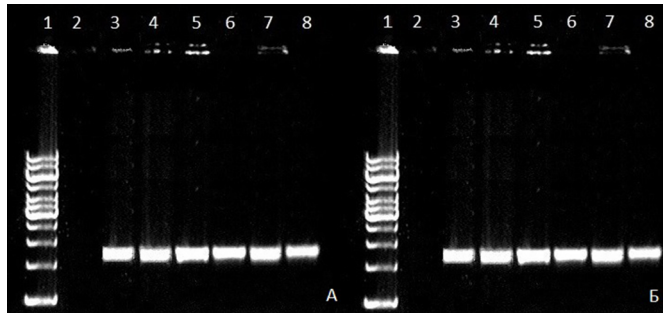


Рис. 1. Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК на 1,2%-ном агарозном геле (А – *Pseudomonas spp.* Б – *Ps. aeruginosa*: 1 – ДНК-маркер; 2 – отрицательный контроль; 3 – положительный контроль (*Ps. aeruginosa*); 4, 5 – ПЦР-продукты (изоляты *Ps. aeruginosa* из листового салата и базилика); 6 – положительный контроль (*Ps. fluorescens*); 7, 8 – ПЦР-продукты (изоляты *Ps. fluorescens* из листового салата и базилика)

Результаты исследования

В результате экспериментов обнаружено, что контрольные неинфицированные растения базилика обладали правильной овальной формой с ровной, немного изогнутой клеточной стенкой. Внутри клеток находились цитоплазма, центральная вакуоль, многочисленные митохондрии и округлые плотные хлоропласты, содержащие 1–4 крахмальных зерен, немного пластоглобул (рис. 2).

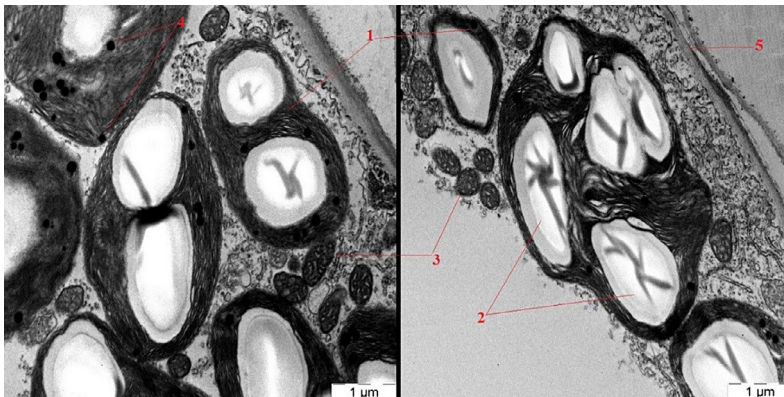


Рис. 2. Клетки столбчатой паренхимы листьев растений базилика без заражения (контроль): 1 – хлоропласты; 2 – крахмальные зерна; 3 – митохондрии; 4 – пластоглобулы; 5 – клеточная стенка

Клетки столбчатой паренхимы незараженного листового салата (контроль) были по форме вытянутыми, с изгибами клеточной стенки. При исследовании большого числа снимков обнаружена более однообразная ультраструктура клеток, чем у базилика, был виден пристенный слой цитоплазмы и многочисленные хлоропласты группами по 4–5 шт. по краям клетки у клеточной стенки.

В клетках листового салата наблюдались овальной формы хлоропласты с плотной стромой, многочисленными липидными каплями и без крахмальных зерен. Митохондрии наблюдались в клетках весьма редко. Важно отметить, что на многочисленных снимках срезов листового салата и базилика в контрольных вариантах ни изучаемых псевдомонад, ни других бактерий-контаминантов обнаружено не было (рис. 3).

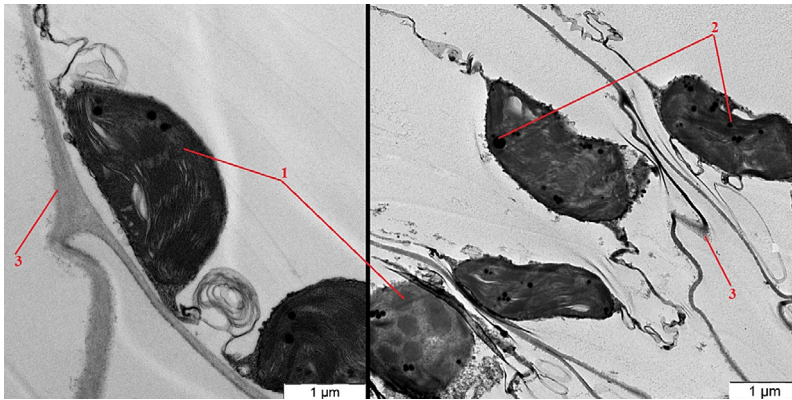


Рис. 3. Клетки растений листового салата без заражения (контроль): 1 – хлоропласты; 2 – пластоглобулы; 3 – клеточная стенка

Бактерии *Ps.aeruginosa* мигрировали в клетки растений базилика через разрывы клеточной стенки, что, по-видимому, является следствием токсического воздействия условно-патогенных псевдомонад на клетки растений. Распространение инфекции по растению происходило скорее всего через образовавшиеся повреждения в клеточной стенке, и таким образом синегнойная палочка получила возможность перемещения из клетки в клетку.

Установлено, что при сохранении клетками растений округлой формы хлоропласты несколько видоизменялись – в основном это было увеличение их размеров по сравнению с контрольными вариантами. Получены снимки, на которых видны *Ps.aeruginosa*, которые при проникновении внутрь хлоропласта разрушали его изнутри. На некоторых снимках можно наблюдать лизис крахмальных зерен, поскольку бактерии могли, видимо, использовать их как источник питания (рис. 4).

Проникновение сапротрофных псевдомонад в растительные клетки было также подтверждено с помощью электронной микроскопии срезов листьев базилика, зараженного *Ps.fluorescens*. Сапротрофные псевдомонады были локализованы в клетке небольшими группами без видимых нарушений строения клеточной стенки. На многих снимках четко видны по сравнению с контролем ядро, аппарат Гольджи, многочисленные митохондрии, что свидетельствует об усилении энергетических процессов в клетках базилика. Кроме того, были видны липидные капли, или пластоглобулы, которые способствуют в растительных клетках образованию или разрушению тилакоидов хлоропластов (рис. 5).

На отдельных микроснимках зафиксировано проникновение бактерий в хлоропласты без последующего цитопатогенного воздействия. Было отмечено, что крахмальные зерна в окружении флюоресцирующих псевдомонад не претерпевали

никаких морфологических изменений, но в результате взаимодействия с *Ps. fluorescens* была полностью утрачена оболочка хлоропласта (рис. 6).

При инфицировании *Ps. aeruginosa* листового салата наблюдалось проникновение синегнойной палочки в клетки салата с последующим нарушением целостности клеточных стенок и деструктивным воздействием на хлоропласты, как и в опыте с базиликом. Деструкция клеточных органелл с последующим увеличением количества пластоглобул (липидных капель) происходила, по-видимому, ввиду отрицательного воздействия синегнойной палочки. Также отмечена значительная деформация клеточных стенок салата и более вытянутых узких хлоропластов (рис. 7).

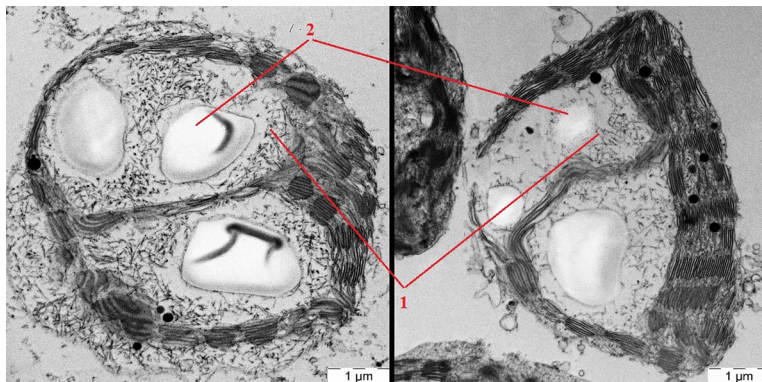


Рис. 4. Измененные хлоропласты клеток базилика при воздействии *Ps. aeruginosa*: 1 – бактерии; 2 – крахмальные зерна

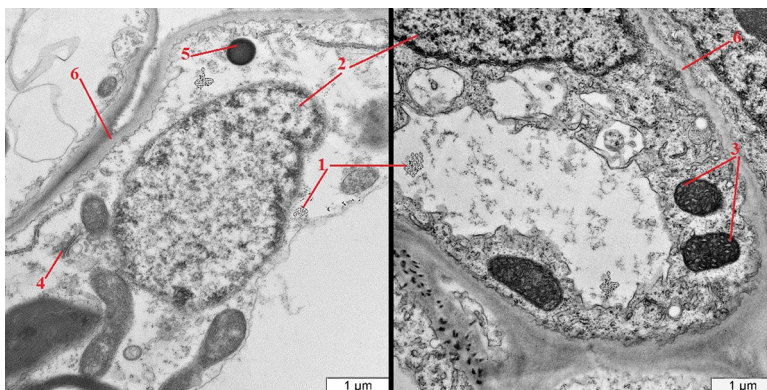


Рис. 5. Клетки растений базилика при взаимодействии с сапротрофом *Ps. fluorescens*: 1 – бактерии *Ps. fluorescens*; 2 – ядро; 3 – митохондрии; 4 – аппарат Гольджи; 5 – пластоглобулы; 6 – клеточная стенка

Гистологическое изучение взаимодействия *Ps. fluorescens* и листового салата обнаружило миграцию этих сапротрофов в клетки салата при сохранении целостности клеточной стенки. В растительных клетках наблюдались увеличение количества митохондрий и изменение формы хлоропластов на более вытянутую (рис. 8).

Изолированные из растений бактерии на всем протяжении опыта не меняли своих культуральных, морфологических и биохимических свойств. Для уточнения полученных результатов использовался метод ПЦР. Молекулярно-генетические исследования изолятов бактерий с использованием родо- и видоспецифичных праймеров подтвердили их принадлежность изучаемым бактериям.

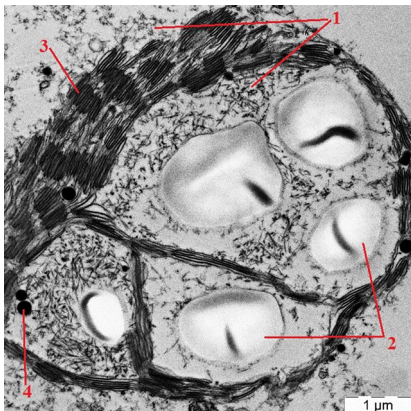


Рис. 6. Хлоропласты базилика, зараженного бактериями *Ps. fluorescens*:

- 1 – бактерии *Ps. fluorescens*;
- 2 – крахмальные зерна;
- 3 – граны с тилакоидами;
- 4 – пластоглобулы

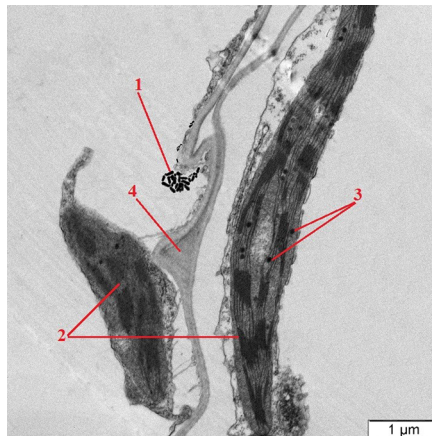


Рис. 7. Клетки столбчатой паренхимы листьев растений листового салата после заражения *Ps. aeruginosa*:

- 1 – бактерии *Ps. aeruginosa*; 2 – хлоропласты;
- 3 – пластоглобулы; 4 – клеточная стенка



Рис. 8. Клетки столбчатой паренхимы листьев растений листового салата после заражения *Ps. fluorescens*:
1 – бактерии *Ps. fluorescens*; 2 – хлоропласты; 3 – клеточная стенка;
4 – митохондрии; 5 – ядро

Обсуждение

При анализе публикаций ряда авторов можно отметить, что поведение псевдомонад может иметь некоторые сходства и различия по сравнению с поведением других возбудителей пищевых инфекций. Так, В.И. Пушкаревой с соавт. [17] были доказаны активное размножение и сохранение в концентрации 10^7 КОЕ/г в течение месяца в филлосфере проростков пшеницы *L. monocytogenes*, куда они проникли через корневую систему. В работе М.Т. Brandl и R. Amundson [16] по инфицированию листового салата штаммом *E. coli* серотипа O157: H7 показано, что в первые сутки после заражения наблюдалось увеличение численности кишечной палочки в 100 раз, инфектант сохранялся на уровне 10^{6-7} КОЕ/г в течение 7 дней.

В других исследованиях М.Т. Brandl [22] смоделировал эксперимент с участием энтеропатогенных кишечных палочек, которые использовал при инфицировании латука, нанося бактериальную культуру на листья растения. Несмотря на активацию синтеза фенольных соединений растений как защитной реакции, численность патогенных бактерий увеличилась в 20 раз в первые часы после заражения. Автором установлено, что бактерии проникали в растения латука через устьица или поврежденные листья с последующим некрозом тканей латука.

В наших экспериментах [18] было доказано проникновение *E. coli O157: H7* через корневую систему в молодые проростки базилика, выращенного до стадии листообразования. Уже на вторые сутки количество этих бактерий возросло логарифмически: до 7 суток сокультивирования для энтеропатогенного штамма, до 5 суток – для непатогенных кишечных палочек.

Для изучения взаимодействия возбудителей пищевых инфекций с зелеными культурами многие исследователи также пользовались электронным микроскопом, однако цели и характер таких экспериментов были несколько другими по сравнению с нашими исследованиями. Так, М.Т. Brandl и R.E. Mandrell [22] изучали стадии формирования биопленки *S. enterica* на модели растения кинзы с помощью КЛСМ (конфокальной лазерной сканирующей микроскопии). В работах Y. Dong и др. [26] для изучения способности энтеробактерий размножаться внутри тканей и на корневых волосках растений также использовали электронный микроскоп. Исследования L. Dinu и S. Bach [25], изучавших взаимодействия листового салата и GFP-мутанта *E. coli O157: H7* с помощью метода КЛСМ, обнаружили многочисленные морфологически измененные некультивируемые клетки бактерий кутикуле и поверхности изучаемого растения.

В настоящее время возбудители пищевых инфекций находят новые резервуары в растительных организмах, паразитируя в их клетках, становясь угрозой для здоровья и жизни людей. Решение данной проблемы требует объединенных усилий специалистов разного профиля. Проведенные нами исследования позволяют приблизиться к расшифровке механизмов внутриклеточного паразитизма возбудителей пищевых инфекций, который до сих пор слабо изучен как в нашей стране, так и за рубежом.

Данные эксперименты более полно определяют характер и результат воздействия *Ps.aeruginosa* и *Ps.fluorescens* на растительные клетки, а именно:

– При взаимодействии *Ps.aeruginosa* с клетками базилика наблюдались разрывы клеточной стенки, увеличенные по размеру хлоропласты с большим содержанием крахмальных зерен; отмечена также полная деструкция хлоропластов при высокой концентрации *Ps.aeruginosa*. Заражение синегнойной палочкой листового салата приводило к сильной деформации клеточной стенки и хлоропластов, приобретающих вытянутую зауженную форму с последующим разрушением и формированием пластоглобул.

– При взаимодействии растений базилика и листового салата с бактериями *Ps.fluorescens* бактерии обнаруживались в цитоплазме и хлоропластах клеток без цитопатогенного эффекта, лишь с некоторыми изменениями формы хлоропластов; наблюдалось увеличение количества липидных капель, увеличение количества митохондрий, свидетельствующих об усилении интенсивности энергетических процессов, происходящих в растительных клетках.

Библиографический список

1. Артамонов А.М. Спектр литической активности и специфичность бактериофагов *Pseudomonas fluorescens* / А.М. Артамонов, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы

- и пути их решения: Материалы V Международной научно-практической конференции (Ульяновск, 11 июня 2013 г.) – Ульяновск, 2013. – Т. 2. – С. 3–6.
2. Астахова Н.В. Реорганизация ультраструктуры хлоропластов при низкотемпературном закаливании растений арабидопсиса / Н.В. Астахова, В.Н. Попов, А.А. Селиванов, Е.А. Буряханова, Г.П. Алиева, И.Е. Мошков // Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – С. 790–797.
3. Балко А.Б. Формирование биопленки штаммами *Pseudomonas aeruginosa* Украинской коллекции микроорганизмов / А.Б. Балко, О.И. Балко, Л.В. Авдеева // Микробиологический журнал. – 2013. – Т. 75. – № 2. – С. 50–56.
4. Булгаков А.К. Факторы вирулентности и лекарственной устойчивости некоторых представителей семейства *Enterobacteriaceae*, их чувствительность к новому ряду азотсодержащих гетероциклов: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Челябинск, 2000. – 47 с.
5. Бухарин О.В. Патогенные бактерии в природных экосистемах / О.В. Бухарин, В.Ю. Литвин. – Екатеринбург: УрО РНА, 1997. – 277 с.
6. Вертнев Ю.В. Бактериальные токсины: Биологическая сущность и происхождение // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1996. – Вып. 3. – С. 43–46.
7. Габидова А.Э. Основные начала возникновения резистентности в биосфере / А.Э. Габитова, В.А. Галынкин // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2017. – № 3(1). – С. 92–102.
8. Круглова Н.Н. Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2011. – № 3–4. – С. 17–22.
9. Кузнецова М.В. Опыт использования методов молекулярной генетики при идентификации клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – Вып. 3. – С. 34–37.
10. Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии / Е.А. Калашникова, М.Ю. Чередниченко, Н.П. Карсункина, М.Р. Халилуев. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2014. – С. 147.
11. Маркова Ю.А. Растения как экологическая ниша патогенных для человека бактерий / Ю.А. Маркова, А.Л. Турская // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2012. – № 84.
12. Медведев С.С. Биология развития растений. Начала биологии развития растений. Фитогормоны: В 2-х т. / С.С. Медведев, Е.И. Шарова // Изд-во Санкт-Петербургского университета, 2011. – Т. 1. – 253 с.
13. Моррисон А.В. Синегнойная инфекция: эффекты экзотоксина А (обзор) / А.В. Моррисон, В.И. Попович, В.В. Моррисон // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2014. – Вып. 10(3). – С. 542–546.
14. Овод А.А. Особенности популяционной динамики псевдомонад и листерий в ассоциации с каллусами зеленных культур / А.А. Овод, Г.В. Годова, Е.А. Калашникова // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2017. – № 6. – С. 56–67.
15. Овод А.А. Особенности взаимодействия токсинов-продуцирующих *E.coli* с клетками зеленных культур / А.А. Овод, В.И. Пушкарева // Ученые записки Тамбовского отделения РосМУ. – 2016. – № 5. – С. 220–229.
16. Овод А.А. Взаимодействие *Listeria monocytogenes* с агрокультурами и стадии формирования биопленки / А.А. Овод, В.И. Пушкарева, Г.В. Годова // Концепт: Научно-методический электронный журнал. – 2014. – Т. 20. – С. 4846–4850.

17. Пушкарева В.И. Листерии в растениях: экспериментальное изучение колонизации, численности и изменчивости / В.И. Пушкарева, В.Ю. Литвин, В.В. Троицкая // ЖМЭИ. – 1996. – № 5. – С. 10–12.
18. Пушкарева В.И. Взаимодействие *Escherichia coli* с растениями на популяционном и клеточном уровнях / В.И. Пушкарева, Л.В. Диденко, А.А. Овод, С.А. Ермолаева // Успехи современной биологии. – 2015. – Т. 135. – № 3. С. 297–306.
19. Пушкарева В.И. *Listeria monocytogenes* – взаимодействие с агрокультурами и стадии формирования биопленки / Л.В. Диденко, Г.В. Годова, А.А. Овод, Е.А. Калашникова, С.А. Ермолаева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – № 1. – С. 42–49.
20. Agrios G.N. Plant Pathology // G.N. Agrios. – 5 th ed. – Elsevier Academic Press, 2005. – 922 p.
21. Brandl M.T. Plant lesions promote the rapid multiplication of *Escherichia coli* O157:H7 on postharvest lettuce // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74(17). – P. 5285–5289.
22. Brandl M.T., Amundson R. Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* / M.T. Brandl, R. Amundson // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – V. 74(8). – P. 2298–2306.
23. Brandl M.T., Mandrell R.E. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro Phyllosphere // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – Vol. 68. – No 7. – P. 3614–3621.
24. Bari R. Role of plant hormones in plant defence responses / R. Bari, J.D.G. Jones // Plant Mol. Biol., 2009. – Vol. 69. – P. 473–488.
25. Dinu L.D., Bach S. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 in the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – V. 77(23). – P. 8295–8302.
26. Dong Y., Iniguez A.L., Ahmer B.M. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69(3). – P. 1783–1790.
27. Goldberg J.B., Hancock R.E.W., Parales R.E., Loper J., Cornelis P. *Pseudomonas* 2007 // J. Bacteriology, 2008. – № 190(8). – P. 2649–2662.
28. Lv, L., Jiang T., Zhang S., Yu, X. Exposure to mutagenic disinfection byproducts leads to increase of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* // Environ Sci. Technol., 2014. – № 48(14). – P. 8188–8195.
29. Ovod A.A., Pushkareva V.I., Godova G.V., Ermolaeva S.A. Vegetable crops as a model for studying polyhostality *Listeria monocytogenes* // European Innovation Convention. The 1st International scientific conference proceedings (December 20–21, 2013). – «East West» Association for Advanced Studies and Higher Education GmbH. Viena, 2013. – Pp. 105–112.
30. Robert-Seilaniantz A. Pathological hormone imbalances / A. Robert-Seilaniantz L. Navarro, R. Bari J.D.G Jones // Current Opinion in Plant Biology. – 2007. – Vol. 10. – P. 372–379.
31. Sabatini D.D., Bensch K., Barmett R.J. Chytochemistry and electron microscopy – the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation // J. of Cell Biology. – 1963. – V. 1. – P. 16–58.
32. Traits of Fluorescent *Pseudomonas spp.* involved in suppression of Plant Root Pathogens / Daniel J. O’Sullivan, Fergal O’Gara // Microbiol. Rev. – 1992. – Vol. 56. – P. 662–676.
33. Whiteley M., Bangera M.G., Bumgarner R.E., Parsek M.R., Teitzel G.M., Lory S., Greenberg E.P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Nature. – 2001. – P. 413:860–864.

HISTOLOGICAL STUDY OF LETTUCE AND BASIL BY INFECTION WITH *PS. AERUGINOSA* AND *PS. FLUORESCENS* IN VITRO

G.V. GODOVA², A.A. OVOD³, N.V. ASTAKHOVA¹, E.A. KALASHNIKOVA²

(¹ Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev
at the Russian Academy of Sciences, Moscow;

² Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow;

³ LLC “EkzakteLabs”, Moscow)

Studies based on the use of an electronic microscope revealed ultrastructural changes in plant cells of lettuce and Basil in interaction with Ps.aeruginosa ATCC B3994, expressed in deformation and violation of the integrity of the cell wall, increasing the size of chloroplasts, sometimes full destruction accompanied by the increased number of plastoglobuli. Ps.fluorescens ATCC948 were localized in the cytoplasm and chloroplasts of cells without a cytotoxic action. Plant isolates were identified with gram staining, biochemical tests and PCR. Contamination of non-heat-treated leaf vegetables with virulent strain Ps. aeruginosa is a potential threat to human health and life.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, leaf vegetables, bacterial population dynamics, phenolic compounds, chloroplast ultrastructure.*

References

1. Artamonov A.M. Spektr liticheskoy aktivnosti i spetsifichnost' bakteriofagov Pseudomonas fluorescens [Spectrum of lytic activity and specificity of bacteriophages of Pseudomonas fluorescens] / A.M. Artamonov, D.A. Viktorov, D.A. Vasil'yev // Agrarnaya nauka i obrazovaniye na sovremennom etape razvitiya: opyt, problemy i puti ikh resheniya: Materialy V Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, Ul'yanovsk, June 11. 2013; 2: 3–6. (In Rus.)
2. Astakhova N.V. Reorganizatsiya ul'trastruktury khloroplastov pri nizkotemperaturnom zakalivanii rasteniy arabidopsisa [Reorganization of chloroplast ultrastructure during low-temperature hardening of Arabidopsis plants] / N.V. Astakhova, V.N. Popov, A.A. Selivanov Ye.A. Burakhanova, G.P. Aliyeva I.Ye. Moshkov // Fiziologiya rasteniy. 2014; 61: 790–797. (In Rus.)
3. Balko A.B., Balko O.I., Avdeyeva L.V. Formirovaniye bioplenki shtammami Pseudomonas aeruginosa Ukrainskoy kollektzii mikroorganizmov [Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa strains of the Ukrainian collection of microorganisms] // Mikrobiologicheskii zhurnal. 2013; 75; 2: 50–56. (In Rus.)
4. Bulgakov A.K. Faktory virulentnosti i lekarstvennoy ustoychivosti nekotorykh predstaviteley semeystva Enterobacteriaceae, ikh chuvstvitel'nost' k novomu ryadu azot-soderzhashchikh geterotsiklov: Avtoreferat diss. ... dok. med. Nauk [Factors of virulence and drug resistance of some members of the Enterobacteriaceae family, their sensitivity to a new series of nitrogen-containing heterocycles: Self-review of DSc (Med) thesis]. Chelyabinsk, 2000: 47. (In Rus.)
5. Bukharin O.V. Patogenniye bakterii v prirodnykh ekosistemakh [Pathogenic bacteria in natural ecosystems] / O.V. Bukharin V.Yu. Litvin // UrO RNA, Yekaterinburg, 1997: 277. (In Rus.)
6. Vertiyev Yu.V. Bakterial'niye toksiny: Biologicheskaya sushchnost' i proiskhozhdeniye [Bacterial toxins: Biological essence and origin] // Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. 1996; 3: 43–46. (In Rus.)

7. *Gabidova A.E., Galynkin V.A.* Osnovniye nachala vozniknoveniya rezistentnosti v biosphere [Basic origins of resistance in the biosphere] // Mezhdunarodniy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy. 2017; 3–1: 92–102. (In Rus.)
8. *Kruglova N.N.* Kallus kak model' dlya izucheniya formirovaniya struktury vysshego rasteniya [Callus as a model for studying the structure formation of a higher plant] // Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN. 2011; 3–4: 17–22. (In Rus.)
9. *Kuznetsova M.B.* Opyt ispol'zovaniya metodov molekulyarnoy genetiki pri identifikatsii klinicheskikh shtammov *Pseudomonas aeruginosa* [Experience of using methods of molecular genetics in the identification of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*] // Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2013; 3: 34–37. (In Rus.)
10. Laboratorniy praktikum po sel'skokhozyaystvennoy biotekhnologii [Laboratory training course on agricultural biotechnology] / Ye.A. Kalashnikova M.Yu. Cherednichenko, N.P. Karsunkina, M.R. Khaliluyev. M.: Izd-vo RGAU-MSKHA, 2014: 147. (In Rus.)
11. *Markova Yu.A., Turskaya A.L.* Rasteniya kak ekologicheskaya nisha patogenykh dlya cheloveka bakteriy [Plants as an ecological niche of human pathogenic bacteria] / Yu.A. Markova, A.L. Turskaya // Politematicheskiy setevoj elektronniy nauchniy zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2012; 84. (In Rus.)
12. *Medvedev S.S.* Biologiya razvitiya rasteniy. Nachala biologii razvitiya rasteniy. Fitogormony: v 2-kh knigakh [Biology of plant development. Basics of plant biology. Phytohormones: in 2 volumes] / S.S. Medvedev Ye.I. Sharova // Izd-vo S. – Peterb. un-ta, 2011; 1: 253. (In Rus.)
13. *Morrison A.V., Popovich V.I., Morrison V.V.* Sinegnoynaya infektsiya: efekty ekzotoksina A (obzor) [*Pseudomonas aeruginosa*: the effects of exotoxin A (review)] / A.V. Morrison, V.I. Popovich, V.V. Morrison // Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal. 2014; 10 (3): 542–546. (In Rus.)
14. *Ovod A.A., Godova G.V., Kalashnikova Ye.A.* Osobennosti populyatsionnoy dinamiki psevdomonad i listeriy v assotsiatsii s kallusami zelenykh kul'tur [Peculiarities of the population dynamics of pseudomonads and listeria in association with calluses of leaf vegetables] / A.A. Ovod, G.V. Godova, Ye.A. Kalashnikova // Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii. 2017; 6: 56–67. (In Rus.)
15. *Ovod A.A., Pushkareva V.I.* Osobennosti vzaimodeystviya toksin-produitsiruyushchikh *E.coli* s kletkami zelenykh kul'tur [Features of interaction of toxin-producing *E. coli* with cells of leaf vegetables] / A.A. Ovod, V.I. Pushkareva // Ucheniye zapiski Tambovskogo otdeleniya RoSMU. 2016; 5: 220–229. (In Rus.)
16. *Ovod A.A., Pushkareva V.I., Godova G.V.* Vzaimodeystviye *Listeria monocytogenes* s agrokul'turami i stadii formirovaniya bioplenki [Interaction of *Listeria monocytogenes* with agricultural crops and stages of biofilm formation] / A.A. Ovod, V.I. Pushkareva, G.V. Godova // Nauchno-metodicheskiy elektronniy zhurnal Kontsept. 2014; 20: 4846–4850. (In Rus.)
17. *Pushkareva V.I.* Listerii v rasteniyakh: eksperimental'noye izucheniye kolonizatsii, chislennosti i izmenchivosti [Listeria in plants: experimental study of colonization, abundance and variability] / V.I. Pushkareva V.Yu. Litvin, V.V. Troitskaya // ZHMEI. 1996; 5: 10–12. (In Rus.)
18. *Pushkareva V.I.* Vzaimodeystviye *Escherichia coli* s rasteniyami na populyatsionnom i kletochnom urovnyakh [Interaction of *Escherichia coli* with plants at the population and cellular levels] / V.I. Pushkareva, L.V. Didenko, A.A. Ovod, S.A. Yermolayeva // Uspekhi sovremennoy biologii. 2015; 135; 3: 297–306. (In Rus.)
19. *Pushkareva V.I., Didenko L.V., Godova G.V., Ovod A.A., Kalashnikova Ye.A., Yermolayeva S.A.* *Listeria monocytogenes* – vzaimodeystviye s agrokul'turami

i stadii formirovaniya bioplenki [*Listeria monocytogenes* and their interaction with crops and stages of biofilm formation] // Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika. 2013; 1: 42–49. (In Rus.)

20. Agrios G.N. Plant Pathology // G.N. Agrios. – 5th ed. – Elsevier Academic Press, 2005: 922.

21. Brandl M.T. Plant lesions promote the rapid multiplication of *Escherichia coli* O157: H7 on postharvest lettuce // Appl. Environ. Microbiol. 2008; 74 (17): 5285–5289.

22. Brandl M.T., Amundson R. Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* / M.T. Brandl, R. Amundson // Appl. Environ. Microbiol. 2008; 74 (8): 2298–2306.

23. Brandl M.T., Mandrell R.E. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro Phyllosphere // Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68; 7: 3614–3621.

24. Bari R. Role of plant hormones in plant defence responses / R. Bari, J.D.G. Jones // Plant Mol. Biol., 2009; 69: 473–488.

25. Dinu L.D., Bach S. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 in the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor // Appl. Environ. Microbiol. 2011; 77 (23): 8295–8302.

26. Dong Y., Iniguez A.L., Ahmer B.M. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* // Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69 (3): 1783–1790.

27. Goldberg J.B., Hancock R.E.W., Parales R.E., Loper J., Cornelis P. *Pseudomonas* 2007 // J. Bacteriology, 2008; 190 (8): 2649–2662.

28. Lv L., Jiang T., Zhang S., Yu X. Exposure to mutagenic disinfection byproducts leads to increase of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* // Environ Sci. Technol., 2014; 48 (14): 8188–8195.

29. Ovod A.A., Pushkareva V.I., Godova G.V., Ermolaeva S.A. Vegetable crops as a model for studying polyhostality *Listeria monocytogenes* // European Innovation Convention. The 1st International scientific conference proceedings (December 20–21, 2013). – “East West” Association for Advanced Studies and Higher Education GmbH. Viena, 2013: 105–112.

30. Robert-Seilaniantz A. Pathological hormone imbalances / A. Robert-Seilaniantz L. Navarro, R. Bari J.D.G Jones // Current Opinion in Plant Biology. 2007; 10: 372–379.

31. Sabatini D.D., Bensch K., Barmett R.J. Chytochemistry and electron microscopy – the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation // J. of Cell Biology. 1963; 1: 16–58.

32. Traits of Fluorescent *Pseudomonas spp.* involved in suppression of Plant Root Pathogens / Daniel J. O’Sullivan, Fergal O’Gara // Microbiol. Rev. 1992; 56: 662–676.

33. Whiteley M., Banger M.G., Bumgarner R.E., Parsek M.R., Teitzel G.M., Lory S., Greenberg E.P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Nature. 2001; 413: 860–864.

Годова Галина Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 125550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: godova@list.ru.

Овод Артем Артурович, кандидат биологических наук, руководитель метрологической лаборатории ООО «ЭкзактЭЛабс», 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 2; e-mail: belosom@rambler.ru.

Астахова Нина Васильевна, старший научный сотрудник, лаборатория зимостойкости ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35; e-mail: trunova@ippras.ru.

Калашникова Елена Анатольевна, доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 125550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: kalash0407@mail.ru.

Galina V. Godova, PhD (Bio), Associate Professor, the Department of Microbiology and Immunology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 125550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; e-mail: godova@list.ru.

Artem A. Ovod, PhD (Bio), Head of the Metrological Laboratory of LLC “ExakteLabs”, 117246, Moscow, Nauchny proezd, 20, bld. 2; e-mail: belosom@rambler.ru.

Nina V. Astakhova, Senior Research Associate, the Winter Hardiness Laboratory, RAS Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev, 127276, Moscow, Botanicheskaya Str., 35; e-mail: trunova@ippras.ru.

Yelena A. Kalashnikova, DSc (Bio), Professor, the Department of Genetics, Biotechnology, Breeding and Seed Production, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 125550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; e-mail: kalash0407@mail.ru.