

**АНАЛІЗ МІКРОБІОМУ ЛИСТКОВИХ ПОВЕРХОНЬ РОСЛИН
ЗАКАРПАТСЬКОГО РЕГІОНУ****Л. М. БУГИНА**, асистент*Email: larina.bh@gmail.com***О. В. ПАЛЛАГ**, асистент*Email: ssarvash@gmail.com***Р. О. РУКАВЧУК**, аспірант*Email: roman.rukavchuk@gmail.com***Н. В. БОЙКО**, доктор біологічних наук, професор*Ужгородський національний університет**Email: nadiya.boyko@gmail.com*<https://doi.org/10.31548/dopovidi2020.04.003>

Анотація. Дослідження співвідношень мікроорганізмів, що здатні існувати (персистують) на поверхні їстівних рослин і означені як їх мікробіом, є актуальними насамперед для передбачення його потенційного впливу на здоров'я людини. Вивчення функціональних характеристик рослинної мікробіоти є важливим також для розробки і впровадження інноваційних технологій з метою збереження сільськогосподарських рослин та рослинної сировини. Мета: дослідити особливості формування поверхневої мікробіоти сільськогосподарських рослин регіону, пріоритетних за частотою вживання їх населенням і вирощених в різних агрокліматичних зонах Закарпатської області. Для дослідження відбирали сільськогосподарські рослини і плоди, зібрані в трьох районах Закарпатської області (Ужгородському, Берегівському та Міжгірському), які найбільше використовуються для приготування страв у свіжому вигляді. Їх перелік включає: яблука (*Malus domestica*), виноград (*Vitis vinifera*), огірки (*Cucumis sativus*), томати (*Solanum lycopersicum*), червоний перець (*Capsicum annuum* L.), листя щавлю (*Rumex acetosa*), петрушки (*Petroselinum crispum*), кропу (*Anethum graveolens* L.), буряку (*Beta cicica*), кропиви (*Urtica dioica* L.), капусти (*Brassica oleracea*), пера цибулі (*Allium fistulosum* L.) та часнику (*Allium sativum*). Ідентифікацію ізольованих із зелених поверхонь рослин мікроорганізмів здійснювали за допомогою біохімічних тест-систем. Десятикратні (серійні) розведення змивів листкових поверхонь висівали на диференційно-діагностичні та хромогенні середовища із наступним їх культивуванням при різних температурних режимах із використанням аеробних і анаеробних умов. За необхідності видову належність ізольованих штамів мікроорганізмів уточнювали шляхом протеомного аналізу за допомогою методу MALDI-TOF. Встановлено певну спорідненість у складі епіфітної мікробіоти сільськогосподарських рослин, вирощених в Ужгородському та Берегівському районах, що можна пояснити зосередженістю тут більшої кількості діючих підприємств області. Серед ізольованих мікроорганізмів із поверхонь їстівних рослин тут переважали штами *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes*,

Бугина Л. М., Паллаг О. В., Рукавчук Р. О., Бойко Н. В.

Enterococcus faecalis. На противагу, кількісний і якісний склад мікробіоти сільськогосподарських рослин, вирощених в Міжгірському районі, що відноситься до гірських і господарсько-малоосвоєних регіонів з низькими показниками промислового і сільськогосподарського виробництва, відрізнявся більшою різноманітністю ізолятів і домінуванням серед їх числа типових епіфітних бактерій, ізольованих зокрема з поверхні яблука, кропу, петрушки, червоного перцю та винограду. З вирощеного у цьому районі кропу було виділено штами *Lactobacillus plantarum*. Показано, що склад мікробіому рослин, який потенційно впливає на формування мікробіому людини, залежить від географічних, екологічних та антропогенних факторів навколишнього природного середовища. Показано, що фізико-хімічні умови ґрунтів, топологія рослинної поверхні і кліматичні умови, вміст біологічно-активних речовин (БАР) у рослинах і кількість антропогенного навантаження визначають якість та безпечність рослинної продукції. Рослини, крім власних механізмів захисту (сукупність процесів обміну речовин, а також здатність відповідати на дію пошкоджуючого чинника), володіють додатковим захисним резервом, який безпосередньо пов'язаний з генотипом рослини і залежить від складу епіфітного мікробіому, який надає стійкості до абіотичних та біотичних навантажень або допомагає росту та живленню рослин. Дані про мікробіом сільськогосподарських рослин є важливими для характеристики якості виготовленої з них продукції. З іншого боку ці відомості становлять інтерес для можливого прогнозування результатів взаємодії мікроорганізмів асоційованих з рослинною сировиною та представників кишкового мікробіому людини.

Ключові слова: епіфітна мікробіота, мікробіом сільськогосподарських рослин, Ужгородський, Березівський, Міжгірський регіони

Актуальність. Мікробіота відіграє важливу роль у житті рослини-господаря. До її функцій слід віднести давно відому здатність до азотфіксації та продукції ауксинів, що активізують ріст і розвиток рослин, редуції впливів аерозольних забруднювачів, захисту від фітопатогенних мікроорганізмів тощо. У взаємовідносинах вищих рослин із епіфітними мікроорганізмами задіяні біологічно активні речовини і продукти метаболізму останніх, епіфітні мікроорганізми також продукують вітаміни для підживлення рослин [1].

Як правило, більшість епіфітних бактерій не завдають шкоди рослині. Найчастіше до “здорового” мікробіому рослин відносять бактерії роду *Bacillus* (22 %) і *Xanthomonas* (10 %), і в менш значних кількостях виділяють представники родів *Acinetobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, а також деяких азотфіксаторів [2].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Згідно новітніх уявлень про мікробіом рослин у його формуванні значну роль відіграє мікробіом ґрунту [3].

Бугина Л. М., Паллаг О. В., Рукавчук Р. О., Бойко Н. В.

Функціональною ланкою системи ґрунт – рослина є насамперед мікробіоценоз ризосфери, який визначає угруповання різноманітних мікроорганізмів, що взаємодіють між собою завдяки екологічним і трофічним потребам та зв'язкам [4].

Поверхня листка є середовищем існування, що охоплює різні бактеріальні спільноти (епіфіти). Листові поверхні майже всіх вищих рослин утворюють місце проживання для епіфітних мікроорганізмів [5].

Аналіз літературних даних показав, що склад епіфітної мікробіоти можна розглядати також як фактор біозахисту рослин. Епіфітні мікроорганізми здатні пригнічувати ріст умовно-патогенних та патогенних бактерій на поверхні рослин. Це пов'язано з тим, що бенефітні (апіфітні) бактерії, продукуючи гідролази та антибіотичні речовини, руйнують клітинну стінку фітопатогенних бактерій [6]. Відомо, що існує тісний зв'язок між мікробіомом кишечника людини та продуктами, які споживаються [7, 8]. Тому вживання рослинної їжі з профілактичною метою може бути потенційною альтернативою застосуванню антибіотичних препаратів.

Видовий склад епіфітної мікробіоти рослин визначається складом органічних речовин на їх поверхні, зокрема фітонцидів, антоціанів [9], ефірних олій та кислотністю соку, а їх безпечність для

плодів і овочів пов'язана з природним імунітетом рослин [10].

Тісний зв'язок між видовою належністю рослин і мікробними спільнотами на листових поверхнях свідчить про їх тісні спів-еволюційні відносини та процес тривалої адаптації [11]. Серед епіфітних мікроорганізмів зустрічаються різні види дріжджів, молочнокислі й оцтовокислі бактерії, плісняві гриби [12]. У попередніх дослідженнях показано, що ізоляти із бульби картоплі, а саме *Erwinia carotovora* характерно наявність певних відмінностей у біологічних властивостях від інших штамів *E. carotovora*, а саме відсутність активності ліпази, що робить дані ізоляти не фітопатогенними [13].

Отже, видовий склад і чисельність мікробіому рослин змінюється залежно від виду рослин, факторів навколишнього середовища, а також – від кількісного і якісного складу мікроорганізмів ґрунту, води і повітря [14]. Нами раніше було показано, що серед числа епіфітних мікроорганізмів часто виділяються бактерії з ефектом прозапальної дії [8].

Склад мікробіому рослин залежить від географічних умов. Саме тому актуальним є дослідження мікробіому рослин Закарпатської області для характеристики (з'ясування видових особливостей) і кількісних співвідношень (профілів) корисних і фітопатогенних

Бугина Л. М., Паллаг О. В., Рукавчук Р. О., Бойко Н. В.

мікроорганізмів для розробки засобів захисту рослин, їх тривалого збереження та для прогнозування їх впливу на мікробіом, а відтак і здоров'я людини.

Метою цієї роботи було дослідити особливості поверхневої мікробіоти пріоритетних за споживанням їстівних рослин, вирощених у різних агрокліматичних зонах Закарпатської області України.

Матеріали і методи дослідження. Всі експерименти виконані нами у трьохкратній повторності. Із трьох районів Закарпатської області, а саме з Ужгородського, Берегівського, та Міжгірського районів із різними географічними умовами зростання, було відібрано 13 видів місцевих їстівних рослин, культивованих у приватних господарствах: плоди яблук (*Malus domestica*), винограду (*Vitis vinifera*), огірків (*Cucumis sativus*), томатів (*Solanum lycopersicum*), червоного перцю (*Capsicum annuum L.*), листя щавлю (*Rumex acetosa*), петрушки (*Petroselinum crispum*), кропу (*Anethum graveolens L.*), буряку (*Beta cicia*), кропиви (*Urtica dioica L.*), капусти (*Brassica oleracea L.*), пера цибулі (*Allium fitulosum L.*) та часнику (*Allium sativum*). Для ізоляції та попередньої ідентифікації мікроорганізмів різних родів використовували селективні та хромогенні поживні середовища: Aero Pseudo Selective Agar, Nutrient

agar, MacConkey Agar, Bile Esculin Agar, Sabouraud Dextrose Agar, Streptococcus Selection Agar, *Lactobacillus* MRS Agar, Mannitol Salt Agar (HiMedia Laboratories, Індія) та UriSelect™ Medium (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). Присутність епіфітних та умовно-патогенних патогенних мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі визначали шляхом висіву десятикратних розведень змивів листових поверхонь на зазначені диференційно-діагностичні середовища з подальшим вивченням їх культурально-біохімічних властивостей. Для ідентифікації використовували тест системи: ANAERO-23, ENTERO-24, NEFERM-test, Candida-23, STAPHY-16, STREPTOtest 24 (LACHEMA, Чеська Республіка) та API® 50 CH (bioMérieux, Франція).

Мікроорганізми зі спірними біохімічними властивостями додатково ідентифікували за допомогою матрице-активованої лазерної десорбції / іонізації (MALDI-TOF) з використанням приладу Microflex LT instrument (Bruker Daltonik GmbH, Німеччина) та бази даних MALDI Biotyper 3.0 software (Bruker Daltonik GmbH, Німеччина).

Результати та їх обговорення. При виборі районів відбору рослинної продукції керувалися двома підходами. Згідно статистичних даних [15], 13 районів області відрізняються за площами

Бугина Л. М., Паллаг О. В., Рукавчук Р. О., Бойко Н. В.

сільськогосподарських угідь, а відтак і об'ємами реалізації вирощеної тут продукції. Другим важливим аспектом скринінгу були відомості [16] про відмінність на цих територіях важливих для рослинництва природних кліматичних та інших екологічних чинників, і наявність антропогенного впливу.

За означеними нами вище показниками низинні райони Закарпаття, а саме: Берегівський, Виноградівський, Іршавський, Мукачівський і Ужгородський характеризуються значно високими рівнями антропогенного навантаження. До того ж Ужгородський і Берегівський райони відрізняються за іншими природними чинниками: типи та рН ґрунтів, кількістю атмосферних опадів,

тривалістю сонячної радіації та кількістю сумарної радіації.

На противагу низинним районам, гірські райони Закарпаття характеризуються мінімальною інтенсивністю антропогенного навантаження. Міжгірський район характеризується до того ж властивими лише йому природними умовами у порівнянні з низинними районами Закарпаття (табл. 1). До прикладу, для гірських районів характерна більша кількість опадів, понижена середньорічна температура та тривалість сонячного саява. Також наявна різниця в показниках ґрунту. Так, за показником кислотності ґрунтів гірські райони відносять до слабо-кислих, з незначним пестицидним навантаженням, але при цьому вони є малородючими.

1. Деякі важливі для рослинництва показники територій обраних районів

Показник	Адміністративний район		
	<i>Ужгородський</i>	<i>Берегівський</i>	<i>Міжгірський</i>
Атмосферні опади (мм)	700 – 800	650 – 700	> 1200
Кислотність опадів (рН)	6.2	6.2	6.4
Тип ґрунтів	бурі гірсько-лісові щебенюваті	дернові опідзолені	лучні та чорноземно-лучні
Пестицидне навантаження на ґрунти (у.о.)	2.3 – 3.6	2.3 – 3.6	1 – 2.3
Кислотність ґрунтів (рН)	< 4.5	< 4.5	5 – 5.5
Якість ґрунтів (бали)	45 – 52	31 – 38	17 – 24
Середньорічна температура поверхні ґрунтів (°С)	8 – 9	9 – 10	5 – 9
Тривалість сонячного саява (години)	1800 – 1900	1900 – 2000	< 1600
Сумарна радіація (10 ⁶ Дж/м ²)	3600 – 3800	4000 – 4200	3400 – 3600

Бугина Л. М., Паллаг О. В., Рукавчук Р. О., Бойко Н. В.

Аналіз епіфітного мікробіому їстівних рослин, вирощених у трьох різних географічних зонах Закарпатської області, показав наявність суттєвих відмінностей як у видовому спектрі, так і в кількісному співвідношенні ізолюваних штамів мікроорганізмів.

Всі виділені мікроорганізми умовно можна віднести до трьох систематичних груп: корисні, епіфітні та умовно-патогенні мікроорганізми. Нами під час реалізації проекту BaSeFood [17] було показано, що склад поверхневої рослинної мікробіоти та вміст біологічно активних речовин залежать не лише від виду рослин та рослинної продукції, а й від умов їхнього зростання [18].

Аналізуючи наведені в табл. 2 дані якісного та кількісного обстеження епіфітної мікробіоти відібраних їстівних рослин, можна зробити висновок, що з поверхні рослин, вирощених у Міжгірському районі, переважали представники типової епіфітної мікробіоти, тоді як представники умовно-патогенних мікроорганізмів таких, як *Enterobacter sakazakii* та *Streptococcus parauberis* були не численними. Найбільшу кількість серед числа фітопатогенних мікроорганізмів тут становили штам *Pantoea agglomerans* та бактерії роду *Erwinia*. Цікавим є те, що штам *Pseudomonas fluorescens*, які володіють антагоністичними властивостями

щодо фітопатогенів, найчастіше були ізолювані з поверхонь рослин саме Міжгірського району. Також варто зазначити, що пробіотичні штам *Lactobacillus plantarum* було ізолювано з листків кропу та часника, вирощених лише в цьому районі.

Результати нашого дослідження показали, що на поверхні їстівних рослин, вирощених у Берегівському районі, переважають умовно-патогенні мікроорганізми родів *Hafnia*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* та *Enterococcus*. Слід зазначити, що з поверхні листя кропиви було ізолювано *Candida albicans*. Для даного регіону характерною особливістю є велика кількість ізолюваних бактерій роду *Bacillus*, серед яких на поверхні листків петрушки та буряку також виявлено штам *Bacillus licheniformis*.

На поверхні огірків, червоного перцю та томатів, а також на листі кропу, вирощених у Берегівському районі, були виявлені фітопатогенні бактерії *E. carotovora*, *E. herbicola* та *P. agglomerans*.

Мікробіом їстівних рослин, вирощених в Ужгородському районі, характеризувався найвищим вмістом умовно-патогенних мікроорганізмів. Так, зокрема численні штам різних видів ентеробактерій були ізолювані тут з поверхонь плодів яблук, огірків, томатів, а також листків кропиви, кропу, щавлю, буряку та цибулі. Бактерії родів *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* та

Бугина Л. М., Паллаг О. В., Рукавчук Р. О., Бойко Н. В.

Micrococcus були виявлені на поверхні червоного перцю, огірків, листі капусти, шавлю та часнику. Також на поверхні листків кропу, що був вирощений в даному районі, було виявлено *B. licheniformis*.

Дані наведені в табл. 2 свідчать, що значну кількість умовно-патогенних та фітопатогенних штамів було виявлено на плодах огірків та томатів, листі кропиви, капусти, які були вирощені на території всіх трьох районів. Також варто звернути увагу, що значними рівнями мікробної контамінації характеризувалися гладкі поверхні рослин (яблука, виноград, огірки, листя капусти та буряку), трохи меншими – зелені частини цибулі та часнику. Відомо,

що листя рослин з ускладненою архітектонікою – як от петрушки і кропу, при їх природному забрудненні довго зберігають персистуючі на їх поверхні мікроорганізми. Варто зазначити, що з поверхні рослин, де було знайдено корисні мікроорганізми, штамів умовно-патогенних мікроорганізмів та фітопатогенів виявлено не було.

Деяке занепокоєння щодо якості одержаної рослинної продукції пов'язане з частим виділенням із поверхонь майже всіх тестованих нами рослин штамів *Pantoea agglomerans*, ентеробактерій та інших УПМ, які можуть зумовлювати так звані опортуністичні інфекції.

2. Ключові мікроорганізми, що були ізольовані з найбільш вживаних їстівних рослин Закарпатської області

№ з/п	Рослини (плоди, листя, пера) (кількість проб – 15)	Місце вирощування, район	Ізольовані мікроорганізми (кількість виділених штамів)	Титр±SD, КУО/мл
1.	Яблука (плід) (<i>Malus domestica</i>)	Міжгірський	<i>Pseudomonas fluorescens</i> /3	$(1.0 \cdot 10^7) \pm 0.65$
		Берегівський	<i>Erwinia carotovora</i> /5	$(3.0 \cdot 10^8) \pm 0.6$
		Ужгородський	<i>Hafnia alvei</i> /4	$(2.0 \cdot 10^8) \pm 0.8$
2.	Виноград (плід) (<i>Vitis vinifera</i>)	Міжгірський	<i>Bacillus megaterium</i> /4	$(3.0 \cdot 10^6) \pm 0.63$
		Берегівський	<i>Pseudomonas fluorescens</i> /2	$(4.0 \cdot 10^7) \pm 1.5$
		Ужгородський	<i>Bacillus subtilis</i> /4	$(1.0 \cdot 10^8) \pm 0.5$
3.	Огірки (плід) (<i>Cucumis sativus</i>)	Міжгірський	<i>Erwinia carotovora</i> /5	$(4.0 \cdot 10^6) \pm 0.3$
			<i>Pantoea agglomerans</i> /4	$(3.0 \cdot 10^7) \pm 0.66$
			<i>Hafnia alvei</i> /5	$(1.0 \cdot 10^7) \pm 0.37$
		Берегівський	<i>Pseudomonas fluorescens</i> /2	$(1.0 \cdot 10^8) \pm 0.63$
			<i>Erwinia carotovora</i> /5	$(3.5 \cdot 10^7) \pm 0.59$
			<i>Bacillus subtilis</i> /5	$(1.0 \cdot 10^8) \pm 0.6$
Ужгородський	<i>Pseudomonas fluorescens</i> /4	$(2.0 \cdot 10^6) \pm 0.75$		
	<i>Proteus vulgaris</i> /5	$(1.0 \cdot 10^7) \pm 0.5$		
	<i>Micrococcus luteus</i> /4	$(1.5 \cdot 10^4) \pm 0.82$		
4.	Томати (плід)	Міжгірський	<i>Enterococcus faecalis</i> /5	$(1.0 \cdot 10^5) \pm 0.4$
		Берегівський	<i>Bacillus subtilis</i> /4	$(5.0 \cdot 10^5) \pm 0.65$
		Берегівський	<i>Erwinia carotovora</i> /3	$(1.0 \cdot 10^4) \pm 0.9$

	<i>(Solanum lycopersicum)</i>		<i>Proteus vulgaris</i> /4	$(3.0 \cdot 10^7) \pm 0.65$
		Ужгородський	<i>Enterobacter cloacae</i> /5	$(5.0 \cdot 10^6) \pm 0.4$
5.	Червоний перець (плід) <i>(Capsicum annuum L.)</i>	Міжгірський	<i>Bacillus subtilis</i> /5	$(2.0 \cdot 10^7) \pm 0.5$
		Берегівський	<i>Pantoea agglomerans</i> /4	$(1.5 \cdot 10^5) \pm 0.65$
		Ужгородський	<i>Enterococcus faecalis</i> /5	$(4.0 \cdot 10^6) \pm 0.5$
6.	Кропива (листя) <i>(Urtica dioica L.)</i>	Міжгірський	<i>Pantoea agglomerans</i> /3	$(3.0 \cdot 10^7) \pm 0.9$
		Берегівський	<i>Candida albicans</i> /4	$(1.0 \cdot 10^5) \pm 0.7$
			<i>Enterobacter cloacae</i> /3	$(4.0 \cdot 10^5) \pm 0.85$
		Ужгородський	<i>Bacillus subtilis</i> /5	$(1.0 \cdot 10^7) \pm 0.5$
			<i>Enterobacter cloacae</i> /3	$(2.0 \cdot 10^5) \pm 0.8$
7.	Капуста (листя) <i>(Brassica oleracea L.)</i>	Міжгірський	<i>Pantoea agglomerans</i> /3	$(1.5 \cdot 10^7) \pm 0.9$
			<i>Enterobacter sakazakii</i> /4	$(1.0 \cdot 10^4) \pm 0.75$
		Берегівський	<i>Bacillus subtilis</i> /3	$(3.0 \cdot 10^7) \pm 1.05$
			<i>Proteus mirabilis</i> /5	$(1.0 \cdot 10^3) \pm 0.4$
		Ужгородський	<i>Pantoea agglomerans</i> /4	$(1.5 \cdot 10^6) \pm 0.6$
			<i>Streptococcus acidominimus</i> /4	$(3.0 \cdot 10^4) \pm 0.7$
8.	Кріп (листя) <i>(Anethum graveolens L.)</i>	Міжгірський	<i>Lactobacillus plantarum</i> /5	$(4.0 \cdot 10^7) \pm 0.25$
		Берегівський	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> /3	$(1.0 \cdot 10^3) \pm 0.93$
			<i>Bacillus subtilis</i> /5	$(1.0 \cdot 10^7) \pm 0.45$
			<i>Erwinia herbicola</i> /3	$(4.0 \cdot 10^6) \pm 0.9$
		Ужгородський	<i>Serratia marcescens</i> /2	$(1.0 \cdot 10^6) \pm 1.1$
			<i>Pantoea agglomerans</i> /3	$(5.0 \cdot 10^5) \pm 0.87$
			<i>Bacillus licheniformis</i> /4	$(4.0 \cdot 10^6) \pm 0.7$
			<i>Bacillus subtilis</i> /5	$(4.0 \cdot 10^7) \pm 0.5$
9.	Щавель (листя) <i>(Rumex acetosa)</i>	Міжгірський	<i>Hafnia alvei</i> /3	$(4.0 \cdot 10^5) \pm 0.76$
			<i>Pantoea agglomerans</i> /3	$(3.0 \cdot 10^6) \pm 0.86$
			<i>Streptococcus parauberis</i> /4	$(1.0 \cdot 10^4) \pm 0.6$
		Ужгородський	<i>Staphylococcus epidermidis</i> /2	$(1.0 \cdot 10^6) \pm 0.9$
			<i>Enterobacter aerogenes</i> /3	$(2.0 \cdot 10^4) \pm 0.76$
10.	Петрушка (листя) <i>(Petroselinum crispum)</i>	Міжгірський	<i>Staphylococcus epidermidis</i> /3	$(1.0 \cdot 10^3) \pm 0.8$
			<i>Hafnia alvei</i> /2	$(2.0 \cdot 10^6) \pm 1.1$
		Берегівський	<i>Enterobacter aerogenes</i> /3	$(1.0 \cdot 10^5) \pm 0.85$
			<i>Bacillus licheniformis</i> /3	$(3.5 \cdot 10^7) \pm 0.7$
		Ужгородський	<i>Pseudomonas fluorescens</i> /4	$(1.5 \cdot 10^7) \pm 0.5$
11.	Буряк (листя) <i>(Beta cicia)</i>	Міжгірський	<i>Pantoea agglomerans</i> 2	$(4.0 \cdot 10^7) \pm 0.9$
		Берегівський	<i>Bacillus subtilis</i> /5-	$(1.0 \cdot 10^8) \pm 0.25$
			<i>Bacillus licheniformis</i> /1	$(1.0 \cdot 10^6) \pm 1.3$
			<i>Bacillus megaterium</i> /1	$(1.0 \cdot 10^6) \pm 1.3$
		Ужгородський	<i>Escherichia coli</i> /5	$(5.0 \cdot 10^7) \pm 0.3$
12.	Цибуля (пера) <i>(Allium fistulosum L.)</i>	Міжгірський	<i>Kluyvera ascorbata</i> /3	$(1.0 \cdot 10^4) \pm 0.6$
		Берегівський	<i>Enterococcus faecalis</i> /4	$(2.0 \cdot 10^5) \pm 0.6$
		Ужгородський	<i>Enterobacter cloacae</i> /3	$(3.0 \cdot 10^4) \pm 0.7$
13.	Часник (пера) <i>(Allium sativum)</i>	Міжгірський	<i>Lactobacillus plantarum</i> /4	$(1.0 \cdot 10^7) \pm 0.5$
		Берегівський	<i>Staphylococcus epidermidis</i> /4	$(1.5 \cdot 10^4) \pm 0.6$
		Ужгородський	<i>Enterococcus faecalis</i> /4	$(1.5 \cdot 10^4) \pm 0.56$

Бугина Л. М., Паллаг О. В., Рукавчук Р. О., Бойко Н. В.

Висновки і перспективи.

Отримані результати щодо якісного та кількісного складу епіфітної мікробіоти досліджуваних сільськогосподарських рослин, відібраних на різних територіях, показали, що більшість штамів ізольованих нами мікроорганізмів належать до нормальної епіфітної мікробіоти. Аналіз кількісного складу мікробіому обстежених видів їстівних рослин, свідчить про те, що максимальне різноманіття епіфітних бактерій спостерігали на поверхнях яблук, кропу, петрушки, червоного перцю і винограду, вирощених на території Міжгірського району, за майже повної відсутності представників умовно-патогенних мікроорганізмів.

Одержані нами дані важливі для дослідження взаємозалежності між станом здоров'я людей, тварин і навколишнім середовищем, що є прерогативою концепції One Health Approach [19]. Суть її полягає в здійсненні безпосереднього прямого впливу на здоров'я людини поширення в навколишньому середовищі збудників зоонозних захворювань, залишків в ґрунтах і водах антибіотиків чи генів резистентності мікроорганізмів до антибіотиків, інших екологічних факторів, і, насамперед, різноманітних антропогенних чинників. Виявлені нами відмінності у складі мікробіоти їстівних рослин можна пояснити тим, що саме в

Ужгородському та Берегівському районах зосереджено більшість діючих на сьогодні підприємств області. Як наслідок, з переважної більшості обстежених рослин Ужгородського та Берегівського районів ізольовано представники УПМ родів *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* та *Hafnia*. На противагу іншим, Міжгірський район є типовою гірською територією, що відзначається невисокою господарською освоєністю, низькими показниками промислового виробництва і вирощування сільськогосподарської продукції, і тому наявність на поверхні тестованих нами рослин фітопатогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів в цьому регіоні була мінімальною. Варто зазначити, що на мікробну контамінацію поверхні рослин також впливає їх архітектоніка. Однією з найбільш важливих властивостей епіфітних бактерій, що стимулюють і покращують ріст та розвиток рослин, є продукування ними широкого спектру біологічно активних речовин, а саме: фітогормонів (ауксинів, гіберелінів), сполук антифунгальної природи, вітамінів, екзополісахаридів, пігментів, антибіотиків тощо [20]. Склад мікробіому рослин, значною мірою залежить від географічних, екологічних та антропогенних факторів. Нами в попередніх

Бугина Л. М., Паллаг О. В., Рукавчук Р. О., Бойко Н. В.

дослідженнях показано, що вміст біологічно активних речовин (а саме, поліфенолів та антоціанів) безпосередньо впливає на склад кишкового мікробіому. Доведено, що антоціани володіють пробактеріальними властивостями стосовно корисної мікробіоти, а поліфеноли в свою чергу здатні інгібувати ріст умовно-патогенних мікроорганізмів [21, 22].

Отримані нами дані підтверджують той факт, що фізико-хімічні умови ґрунтів, топологія рослинної поверхні і кліматичні умови, вміст БАР і кількість антропогенного навантаження

безпосередньо впливають на якість та безпечність рослинної продукції [23]. Згідно отриманих даних нами встановлено співвідношення між кількістю ізолюваних епіфітних, фітопатогенних та лактобактерій. На рис. 1 показано, що переважаючими видами були фітопатогенні бактерії (73 %). В разі менше було ізолювано та ідентифіковано представників епіфітної мікробіоти рослин (21%). Лише 4 % серед ізолюваних штамів мікроорганізмів склали лактобактерії і тільки 2% від загальної кількості мікроорганізмів було ізолювано мікроскопічних грибів, а саме *Candida albicans*.

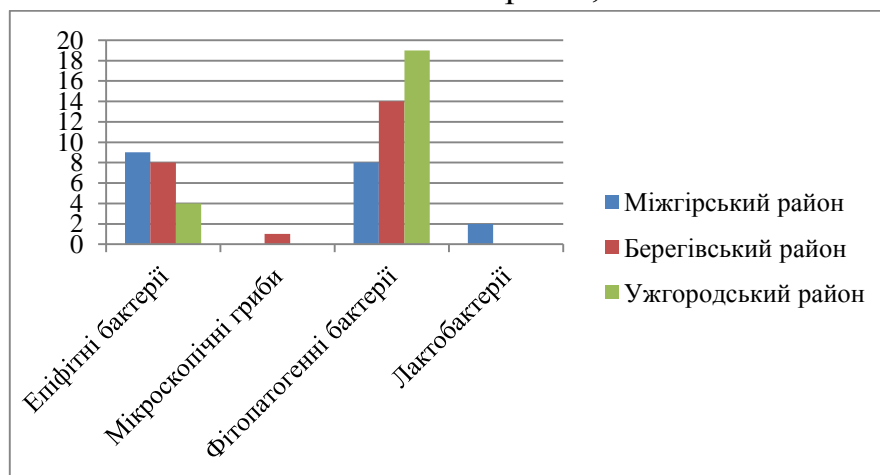


Рис. 1 Співвідношення між мікроорганізмами: фітопатогенні, грибові, епіфітні та лактобактерії.

Саме тому, актуальним є дослідження мікробіому сільськогосподарських рослин, адже продукти харчування, які людина вживає в раціоні, є одним із рушійних

епігенетичних факторів, що впливають на формування мікробіому людини, який в свою чергу забезпечує нормальне функціонування макроорганізму [24].

Список використаних джерел

1. Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendonça-Previato, L., James, E. K., & Venturi, V. (2012). Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated

Burkholderia. *Microbial ecology*, 63(2), 249-266.

2. Vacher C., Hampe A., Porté A., Sauer U., Compant S., Morris, C. The Phyllosphere: Microbial Jungle at the Plant–Climate Interface. *Annual Review Of Ecology*,

Бугина Л. М., Паллаг О. В., Рукавчук Р. О., Бойко Н. В.

Evolution, And Systematics. 2016. Vol. 47(1), P. 1-24. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-121415-032238

3. Дем'янюк, О. С., Симочко, Л. Ю., Тертична, О. В. Сучасні методичні підходи до оцінювання екологічного стану ґрунту за активністю мікробіоценозу. Питання біоіндикації та екології. 2017 № 1. С. 127-142.

4. Гадзало Я.М., Патька Н.В., Заришняк А.С. Агробиологія ризосфери рослин: монографія К. Аграрна наука, 2015. 386 с.

5. Venturi V., Keel C. Signaling in the rhizosphere. Trends in plant science. 2016. Vol 21(3). P. 187-198.

6. Haroon M., Zaidi A., Ahmed B., Rizvi A., Khan M. S., Musarrat J. Effective inhibition of phytopathogenic microbes by eco-friendly leaf extract mediated silver nanoparticles (AgNPs). Indian journal of microbiology. 2019 Vol. 59 (3). P. 273-287.

7. Clark Ashley K., Kelly N. Haas, Raja K. Sivamani. "Edible plants and their influence on the gut microbiome and acne." International journal of molecular sciences. 2017 Vol 18(5). P. 1070.

8. Mudryk M. R. Plant-Isolated Pantoea agglomerans—New Look into Potential Pathogenicity. Мікробіологічний журнал. 2012. № 6. С. 53-57 с.

9. Yong YH, Dai CC, Gao FK, Yang QY, Zhao M. Effects of endophytic fungi on growth and two kinds of terpenoids for Euphorbia pekinensis. Chin. Trad. Herbal Drugs. 2009. Vol 40. P. 18-22.

10. Шкрабак В. С., Луковников А. В., Тургиев А. К. Безопасность жизнедеятельности в сельскохозяйственном производстве. М.: Колос, 2003. 512 с.

11. Xuan, W., Beeckman, T., Xu, G. Plant nitrogen nutrition: sensing and signaling. Current Opinion in Plant Biology. 2017. Vol 39. P. 57-65. doi: 10.1016/j.pbi.2017.05.010

12. Gnanamanickam S. S. Immanuel J. E. Epiphytic bacteria, their ecology and functions. Plant-associated bacteria. Springer: Dordrecht. 2007. P. 131-153.

13. Pishchik, V. N., Mokrousov, I. V., Lazarev, A. M., Vorobyev, N. I., Narvskaya, O. V., Chernyaeva, I. I., ... & Koval, G. N. (1998). Biological properties of some nitrogen-fixing

associative enterobacteria. *Plant and soil*, 202(1), 49-59.

14. Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*.

15. Сільське господарство Закарпаття за 2010–2017 роки. Статистичний збірник /За редакцією Г.Д. Гриник. Ужгород: Головне управління статистики у Закарпатській області, 2018. 61 с.

16. Національний атлас України / НАН України, Інститут географії, Державна служба геодезії, картографії та кадастру; голов. ред. Національного атласу України Л. Г. Руденко ; голова ред. кол. Б. Є. Патон. К. : ДНВП «Картографія», 2007. - 435 с

17. <http://www.basefood-fp7.eu/www.basefood-fp7.eu/index.html>

18. Thapa R., Chatterjee A., Abbey W., Butcher K. Carbon dioxide and nitrous oxide emissions from naturally occurring sulfate-based saline soils at different moisture contents. *Pedosphere*. 2017. Vol 27(5). P. 868-876.

19. Kniel K. E., Kumar D., Thakur S. Understanding the complexities of food safety using a “One Health” approach. *Microbiology spectrum*. 2018. Vol. 6(1) PFS-0021.

20. Цавкелова Е. А., Климова С. Ю., Чердынцева Т. А., Нетрусов А. И. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор). Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42, № 2. С. 133–143.

21. Pallah, O. V., Meleshko, T. V., Bati, V. V., & Boyko, N. V. (2019). EXTRACTS OF EDIBLE PLANTS STIMULATORS FOR BENEFICIAL MICROORGANISMS. *Biotechnologia Acta*, 12(3), 67-74.

22. Pallah, O., Meleshko, T., Tymoshchuk, S., Yusko, L., & Bugyna, L. (2019). Як уникнути ескапе патогенів використовуючи екстракти їстівних рослин. *ScienceRise: Biological Science*, (5-6 (20-21)), 30-37.

23. Schlechter, R. O., Miebach, M., & Remus-Emsermann, M. N. (2019). Driving factors of epiphytic bacterial communities: A mini-review. *Journal of advanced research*.

24. Jarvis, K. G., Daquigan, N., White, J. R., Morin, P. M., Howard, L. M., Manetas, J. E., ... & Grim, C. J. (2018). Microbiomes associated with foods from plant and animal sources. *Frontiers in microbiology*, 9, 2540.

References

- Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendonça-Previato, L., James, E. K., & Venturi, V. (2012). Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated Burkholderia. *Microbial ecology*, 63(2), 249-266.
- Vacher C., Hampe A., Porté A., Sauer U., Compant S., Morris, C. The Phyllosphere: Microbial Jungle at the Plant–Climate Interface. *Annual Review Of Ecology, Evolution, And Systematics*. 2016. Vol. 47(1), P. 1-24. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-121415-032238
- Demianiuk, O. S., Symochko, L. Yu., Tertychna, O. V. Suchasni metodychni pidkhody do otsiniuvannia ekolohichnoho stanu igruntu za aktyvnistiu mikrobiotsenozu. Pytannia bioindykatsii ta ekolohii. 2017 № 1. S. 127-142.
- Hadzalo Ya.M., Patyka N.V., Zaryshniak A.S. Ahrobyolohyia ryzosfery rastenyi: monohrafiya K. Ahrarna nauka, 2015. 386 s.
- Venturi V., Keel C. Signaling in the rhizosphere. *Trends in plant science*. 2016. Vol 21(3). P. 187-198.
- Haroon M., Zaidi A., Ahmed B., Rizvi A., Khan M. S., Musarrat J. Effective inhibition of phytopathogenic microbes by eco-friendly leaf extract mediated silver nanoparticles (AgNPs). *Indian journal of microbiology*. 2019 Vol. 59 (3). P. 273-287.
- Clark Ashley K., Kelly N. Haas, Raja K. Sivamani. "Edible plants and their influence on the gut microbiome and acne." *International journal of molecular sciences*. 2017 Vol 18(5). P. 1070.
- Mudryk M. R. Plant-Isolated Pantoea agglomerans–New Look into Potential Pathogenicity. *Mikrobiolohichniy zhurnal*. 2012. № 6.S. 53-57 s.
- Yong YH, Dai CC, Gao FK, Yang QY, Zhao M. Effects of endophytic fungi on growth and two kinds of terpenoids for Euphorbia pekinensis. *Chin. Trad. Herbal Drugs*. 2009. Vol 40. P. 18-22.
- Shkrabak V. S., Lukovnykov A. V., Turhyev A. K. Bezopasnost zhyznedeiatelnosti v selskokhoziaistvennom proyzvodstve. M.: Kolos, 2003. 512 s.
- Xuan, W., Beeckman, T., Xu, G. Plant nitrogen nutrition: sensing and signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 2017. Vol 39. P. 57-65. doi: 10.1016/j.pbi.2017.05.010
- Gnanamanickam S. S. Immanuel J. E. Epiphytic bacteria, their ecology and functions. *Plant-associated bacteria*. Springer: Dordrecht. 2007. P. 131-153.
- Pishchik, V. N., Mokrousov, I. V., Lazarev, A. M., Vorobyev, N. I., Narvskaya, O. V., Chernyaeva, I. I., ... & Koval, G. N. (1998). Biological properties of some nitrogen-fixing associative enterobacteria. *Plant and soil*, 202(1), 49-59.
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*.
- Silske hospodarstvo Zakarpattia za 2010–2017 roky. Statystychnyi zbirnyk /Za redaktsiieiu H.D. Hrynyk. Uzhhorod: Holovne upravlinnia statystyky u Zakarpatskii oblasti, 2018. 61 s.
- Natsionalnyi atlas Ukrainy / NAN Ukrainy, Instytut heohrafiy, Derzhavna sluzhba heodezii, kartohrafiy ta kadastru; holov. red. Natsionalnoho atlasu Ukrainy L. H. Rudenko ; holova red. kol. B. Ye. Paton. — K. : DNVP «Kartohrafiia», 2007. - 435 s
- <http://www.basefood-fp7.eu/www.basefood-fp7.eu/index.html>
- Thapa R., Chatterjee A., Abbey W., Butcher K. Carbon dioxide and nitrous oxide emissions from naturally occurring sulfate-based saline soils at different moisture contents. *Pedosphere*. 2017. Vol 27(5). P. 868-876.
- Kniel K. E., Kumar D., Thakur S. Understanding the complexities of food safety using a “One Health” approach. *Microbiology spectrum*. 2018. Vol. 6(1) PFS-0021.
- Czavkelova E. A., Klimova S. Yu., Cherdy`nczeva T. A., Netrusov A. I. Mikroorganizmy` – producenty` stimulyatorov rosta rastenij i ikh prakticheskoe

Бугина Л. М., Паллаг О. В., Рукавчук Р. О., Бойко Н. В.

primenienie (obzor). Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2006. T. 42, № 2. S. 133–143.

21. Pallah, O. V., Meleshko, T. V., Bati, V. V., & Boyko, N. V. (2019). EXTRACTS OF EDIBLE PLANTS STIMULATORS FOR BENEFICIAL MICROORGANISMS. *Biotechnologia Acta*, 12(3), 67-74.

22. Pallah, O., Meleshko, T., Tymoshchuk, S., Yusko, L., & Bugyna, L. (2019). Як уникнути ескапе патогенів використовуючи екстракти їстівних

рослин. *ScienceRise: Biological Science*, (5-6 (20-21)), 30-37.

23. Schlechter, R. O., Miebach, M., & Remus-Emsermann, M. N. (2019). Driving factors of epiphytic bacterial communities: A mini-review. *Journal of advanced research*.

24. Jarvis, K. G., Daquigan, N., White, J. R., Morin, P. M., Howard, L. M., Manetas, J. E., ... & Grim, C. J. (2018). Microbiomes associated with foods from plant and animal sources. *Frontiers in microbiology*, 9, 2540.

ANALYSIS OF THE MICROBIOM OF LEAF SURFACES OF NATURAL PLANTS OF THE TRANSCARPATHIAN REGION

L. M. Bugyna, O. V. Pallah, R. O. Rukavchuk, N. V. Boyko

Abstract. Topicality. *Research on the ratio of microorganisms that can exist (persist) on the surface of edible plants, designated as their microbiome, is relevant first of all to predict their potential impact on human health. Establishment of their additional functional characteristics (plant microbiota) is important for the implementation of microbiological innovations in practice in order to solve modern problems of preservation of agricultural plants and plant raw materials.*

The aim of the work was to investigate the peculiarities of formation of surface microbiota of agricultural plants of the region, prioritized by frequency of food consumption by the population and grown in different agroclimatic zones of Transcarpathian region.

Materials and methods: *Agricultural plants from three regions of the Transcarpathian region (Uzhhorod, Berehiv and Mizhhirya districts) were selected for the study, namely: fruits of apples (*Malus domestica*), grapes (*Vitis vinifera*), cucumbers (*Cucumis sativus*), tomatoes (*Solanum lycopersicum*), red pepper (*Capsicum annuum* L.), sorrel leaves (*Rumex acetosa*), parsley (*Petroselinum crispum*), dill (*Anethum graveolens* L.), beet (*Beta cicia*), nettle (*Urtica dioica* L.), cabbage (*Brassica oleracea*), onions (*Allium fitulosum* L.) and garlic (*Allium sativum*), which are most commonly used for the preparation of fresh dishes. The identification of isolated from green surfaces of plants by microorganisms was carried out by means of crops with subsequent cultivation of dilutions of flushes of leaf surfaces on differential diagnostic and chromogenic media, using biochemical test systems. If necessary, species identity was refined by proteomic analysis using the MALDI-TOF method.*

Results. *There is a certain affinity in the composition of the epiphytic microbiota of agricultural plants grown in Uzhhorod and Berehiv districts, which can be explained by the concentration of most of the existing enterprises in the region. Pseudomonas fluorescens, Enterobacter aerogenes, Enterococcus faecalis prevailed among isolated microorganisms from the surfaces of edible plants in these areas. In contrast, the quantitative and qualitative composition of the microbiota of agricultural plants grown*

Бугина Л. М., Паллаг О. В., Рукавчук Р. О., Бойко Н. В.

in the Mizhhirya region, which refers to the mountainous and economically underdeveloped regions with low industrial and agricultural production, was characterized by a greater diversity of isolates and the dominance of typical epiphytic bacteria, dill, parsley, red pepper, and grapes. Lactobacillus plantarum strains were also isolated from dill grown in the area.

Prospects. *It has been shown that the composition of plant microbiome, which potentially influences the formation of human microbiome, depends on geographical, ecological and anthropogenic factors of the environment. It is significant that the physical and chemical conditions of the soil, the topology of the plant surface and climatic conditions, the content of BAR and the amount of anthropogenic load directly affect the quality and safety of plant products. Because plants, in addition to their own mechanisms of protection (a set of metabolism processes, as well as the ability to respond to the action of the damaging factor), have an additional protective reserve, which is directly related to the genotype of the plant and depends on the composition of the epiphytic microbiome, which gives resistance to abiotic and abiotic loads or promotes plant growth and nutrition. It is important to take into account information about the microbiome of agricultural plants for plant protection, their quality and to predict the results of interaction with the representatives of the beneficial (intestinal) microbiota.*

Keywords: *epiphytic microbiota, microbiome of agricultural plants, Uzhhorod, Berehiv, Mizhhirya regions*