

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ФАГОИНДИКАЦИИ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* В ОБЪЕКТАХ САНИТАРНОГО НАДЗОРА

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы

Беккалиева Айдын Канатовна, соискатель кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы

Сулдына Екатерина Владимировна, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae*, индикация, реакция нарастания титра фага, параметры, полифаговый биопрепарат, почва, речная вода, семена огурца

В статье представлены результаты исследований по разработке параметров практического применения фагового биопрепарата *Pseudomonas syringae* с целью индикации данных фитопатогенных бактерий в объектах санитарного надзора. Во введении статьи описан патоваров *Pseudomonas syringae* и расстройств, которые они поражают, что доказывает актуальность исследований, направленных на разработку ускоренных методов индикации и идентификации бактерий - возбудителей заболеваний, которые позволяют специалистам в краткие сроки разработать меры борьбы с вышеуказанными фитопатогенами. Было установлено, что культивирование системы «бактериофаг-исследуемый материал» при температуре 28 ± 1 °C в течение 3,5 часа позволяет выявить в пробах почвы, речной воде и семенах огурца бактерии *Pseudomonas syringae* методом РНФ в концентрации 10^3 м.к./мл., увеличение экспозиционного времени не повышает качества реакции. Бактериофаги Ps.s-7 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ в монокультуре были использованы в экспериментах в концентрации 10^3 БОЕ/мл. При тестировании в РНФ полифагового биопрепарата, включающего в основе вышеуказанные бактериофаги было установлено, что в исследованиях пробы воды речной получены результаты, сходные с данными эксперимента на пробе семян огурца. Концентрация выявленных бактерий *Pseudomonas syringae* составила 10^3 м.к./мл. Экспериментально было установлено, что снижение исходного титра полифагового биопрепарата до концентрации 10^2 БОЕ/мл позволило провести индикацию бактерий *Pseudomonas syringae* в пробе почвы в концентрации 10^3 мк/г.

Исследования проводятся в соответствии с тематическим заданием научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2020 году.

Введение

По литературным данным бактерии *Pseudomonas syringae* поражают примерно 180 видов как культурных, так и дикорастущих растений. Симптоматология заболеваний различна: опухоли, некроз, хлороз листьев, загнивание, отмирание роста и отмирание частей растения без признаков гниения и т.д. [1-2].

Впервые штамм бактерий, получивший название *Pseudomonas syringae*, был идентифицирован Van-Hall в 1902 году из пробы сирени (*Syringa vulgaris*), что и послужило прецедентом при определении названия и в дальнейшем стало таксономическим обозначением гомологичных бактериальных культур. В последующие годы исследователями было идентифицировано множество штаммов бактерий, имеющих аналогичные биологические свой-

ства, которые были способны вызывать болезни первоначально растений других видов. Штаммы *Pseudomonas syringae* подразделяются на 56 патоваров, так как они могут контаминировать различные растения [3]. Наибольшее значение в фитопатологии имеют следующие патовары: *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, вызывающие ожог листьев и гниль корнеплодов сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) [4], *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* вызывающие базальный бактериоз пшеницы (*Triticum*) [5], *Pseudomonas syringae* pv. *japonica* – являются патогенами для ячменя (*Hordeum*) [6]; *Pseudomonas syringae* pv. *panici* вызывают полосатый бактериоз или полосатую пятнистость проса обыкновенного (*Panicum miliaceum* L.) [7]; *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* поражает горох посевной (*Pisum sativum* L.) [8]; *Pseudomonas*

syringae pv. *syringae* – это космополит, паразитирующий на многих культурных и декоративных растениях [9-10]; *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* поражает цветную капусту (*Brassica oleracea*) [11]; *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* – это возбудитель бурой угловатой пятнистости листьев подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) [12]; *Pseudomonas syringae* pv. *mellea* вызывает мелкую некротическую пятнистость подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus* L.) [13]; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* поражает томаты (*Solanum lycopersicum*) [14]; *Pseudomonas syringae* pv. *lachrimans* является возбудителем угловатой пятнистости огурца обыкновенного (*Cucumis sativus*) [15]; *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. – это возбудитель бактериальной рябухи табака обыкновенного (*Nicotiana tabacum* L.) [16], но на сое культурной (*Glycine max*) вызывает бактериальный ожог [17]. Представители вида *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* поражают яблоню домашнюю (*Malus domestica*), *Pseudomonas syringae* pv. *aceris* – клён остролистный (*Acer platanoides* L.); *Pseudomonas syringae* pv. *fraxini* – ясень (*Fraxinus*); *Pseudomonas syringae* pv. *oleae* – оливу европейскую (*Olea europaea*) [18-20].

Представленный выше перечень патогенов *Pseudomonas syringae* и растений, которые они поражают, доказывает актуальность исследований, направленных на разработку ускоренных методов индикации и идентификации бактерий - возбудителей заболеваний, которые позволят специалистам в краткие сроки разработать меры борьбы с вышеназванными фитопатогенами.

В настоящее время в сельском хозяйстве интерес к бактериофагам связан с их применением для контроля популяций патогенов теплокровных животных, рыб и птицы, а также фитопатогенов, наносящих значительный экономический ущерб, в качестве недорогих лечебных и профилактических биопрепаратов, а также высокоспецифичных диагностикумов [21-23].

Цель исследований – разработка параметров практического применения фагового биопрепарата *Pseudomonas syringae* с целью индикации в пробах воды, почвы и в семенном материале в реакции нарастания титра фага.

Материалы и методы исследований

В экспериментах применяли штамм бактерий *Pseudomonas syringae* Ps.s № 3 (коллекция музея бактериальных штаммов и бактериофагов кафедры (МВЭ и ВСЭ) микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитар-

ной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ).

Характеристика бактериофага Ps.s-7 УлГАУ: выделен из пробы почвы (Республика Казахстан, Западно-Казахстанская область, г.Уральск), индикаторная культура Ps.s № 3, литическая активность - 10^{-8} (при определении по методу Аппельмана) и $2,0 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл (бляшкообразующих единиц) (при определении по методу Грациа), специфичность - 85,7 % на 14 бактериальных штаммах *Pseudomonas syringae*; в исследованиях установлена устойчивость к температуре до 60°C в течение 30 минут и трихлорметану в соотношении 1:10 (временная экспозиция 35 минут).

Характеристика бактериофага Ps.s-27 УлГАУ: выделен из пробы почвы (Российская Федерация, Ульяновская область, Ульяновский район, р.п. Ишеевка), индикаторная культура Ps.s № 3, литическая активность - 10^{-8} (по методу Аппельмана) и $1,0 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл (по методу Грациа), специфичность - 85,7 % на 14 бактериальных штаммах *Pseudomonas syringae*; определено, что бактериофаг устойчив к воздействию температуры до 60°C в течение 30 минут и трихлорметана в соотношении 1:10 (время экспозиции составило 35 минут).

Полифаговый биопрепарат состоял из двух бактериофагов - Ps.s-7 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ, которые культивировались на индикаторной культуре *Pseudomonas syringae* Ps.s № 3, диапазон литического действия составлял 100 % на 14 бактериальных штаммах *Pseudomonas syringae*; показатель литической активности $1,0 \pm 0,2 \times 10^9$ БОЕ/мл.

Рабочее разведение бактериофагов и фагового биопрепарата составляло 1:1000 и 1:100 в стерильном мясо-пептоном бульоне (МПБ).

Трихлорметан (хлороформ) использовался для очистки бактериофагов от бактериальных клеток в соотношении 1:10 при временной экспозиции 30 минут при встряхивании в шуттель-аппарате в течение 25 минут и отстаивании в течение 5 минут.

Реакция нарастания титра фага – это метод индикации, позволяющий выявить бактериальный агент в анализируемом материале, не выделяя чистую бактериальную культуру. В основу метода индикации положен тот факт, что если в анализируемой пробе присутствует искомым вид бактерий, то при введении специфичного бактериофага в определенном титре (концентрации) при адсорбции происходит увеличение его количества [24].

Реакцию нарастания титра фага ставили на пробах почвы (садоводческое общество

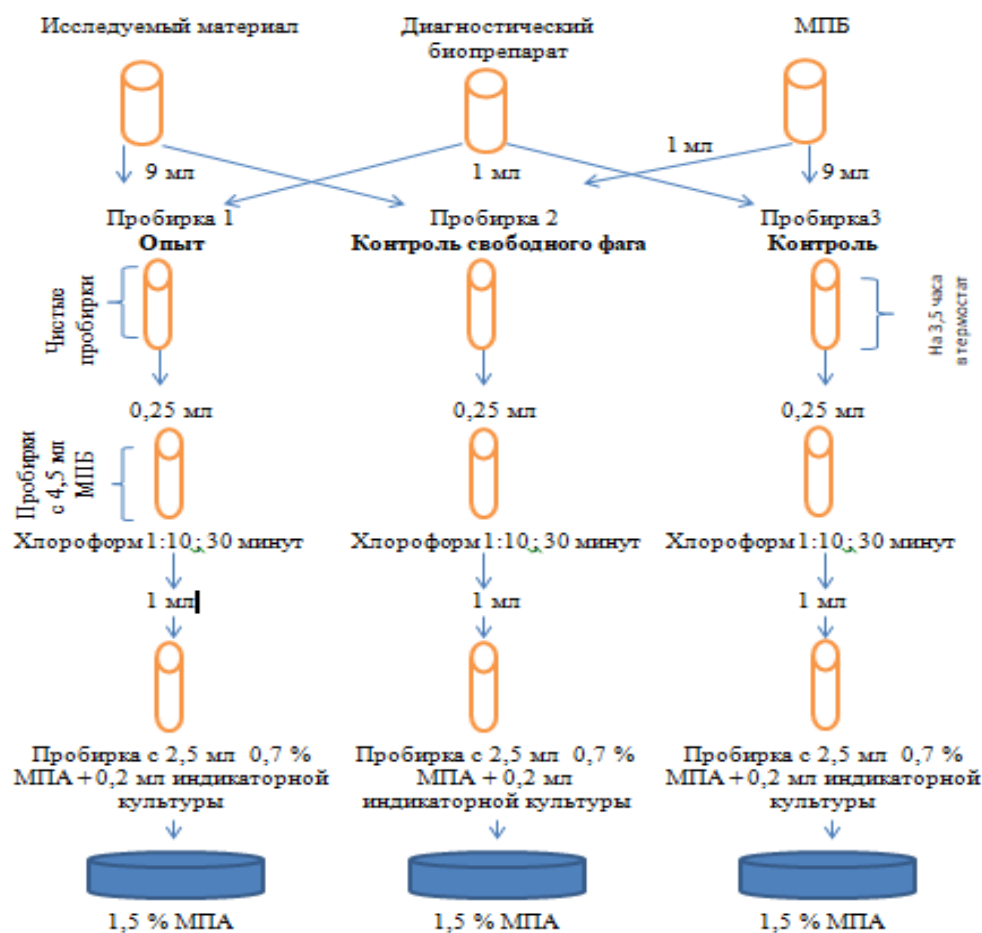


Рис. 1 – Схема индикации бактерий *Pseudomonas syringae* с методом реакции нарастания титра фага с использованием изучаемого бактериофагового биопрепарата

«Садовод УСХИ» п. Октябрьский Чердаклинского района Ульяновской области), семена огурца «Китайский змей» и речной воде (р.Свияга, г.Ульяновск) на базе кафедры (МВЭ и ВСЭ) микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ). Пробоподготовку осуществляли следующим образом: гомогенизация и последующее разведение анализируемого материала в стерильном физиологическом растворе, используя соотношение 1:10.

При подборе оптимального времени экспозиции компонентов фагового биопрепарата (полифагов Ps.s-7 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ) с исследуемой пробой эмпирически подбирали временной диапазон термостатирования с учетом температуры культивирования индикаторной бактериальной культуры. Эксперименты ставили на стерильном МПБ.

Параметры постановки эксперимента:

- исследуемый субстрат вместе с введенным бактериофагом термостатировали при температуре 28 ± 1 °С, не применяя этап «предварительного подращивания», в течение 3,5; 7,0; 15,0; 24,0 часов;

- исследуемый субстрат вместе с введенным бактериофагом термостатировали при температуре 28 ± 1 °С, включая этап «предварительное подращивание», в течение 3,5; 7,0; 15,0; 24,0 часов.

Схема исследования показана на рисунке 1. Результаты индикации бактерий в анализируемом субстрате методом реакции нарастания титра фага (РНФ) учитывались следующим образом: увеличение на чашке Петри количества негативных колоний фага (бляшкообразующих единиц) по сравнению с контролем в пять и более раз свидетельствует об наличии в опытной пробе искомых бактерий, на которых адсорбировался специфичный им бактериофаг и был зафиксирован цикл его развития [25].

Результаты исследований

При подборе оптимального времени экспозиции бактериофагов Ps.s-7 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ с исследуемым материалом (в эксперименте использовался стерильный мясо-пептонный

Таблица 1

Результаты постановки реакции нарастарния титра фага с целью индикации бактерий *Pseudomonas syringae* бактериофагами Ps.s-7 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ в стерильном мясо-пептонном бульоне

Концентрация бактерий <i>Pseudomonas syringae</i> , используемая для контаминации тест объекта – мясо-пептонный бульон, (м.к./мл)	Контроль индикаторного бактериофага (M±m)	Контроль свободного бактериофага (M±m)	Опыт (M±m)	Увеличение количества БОЕ (раз)
Ps.s-7 УлГАУ				
10 ³	5±2	-	31±11	6
10 ⁴	5±2	-	55±11	11
10 ⁵	5±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁶	5±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁷	5±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
Ps.s-27 УлГАУ				
10 ³	3±1	-	19±3	6
10 ⁴	3±1	-	28±8	9
10 ⁵	3±1	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁶	3±1	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁷	3±1	-	полный лизис бактериальной культуры	-

Таблица 2

Результаты экспериментов постановки РНФ с целью индикации бактерий *Pseudomonas syringae* бактериофагами Ps.s-7 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ на семенах огурца

Концентрация бактерий <i>Pseudomonas syringae</i> , используемая для контаминации тест объекта - семян огурца, (м.к./г)	Контроль индикаторного бактериофага (M±m)	Контроль свободного бактериофага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ (раз)
Ps.s-7 УлГАУ				
10 ³	4±2	-	55±12	13
10 ⁴	4±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁵	4±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁶	4±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁷	4±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
Ps.s-27 УлГАУ				
10 ³	2±1	-	12±3	6
10 ⁴	2±1	-	25±8	12
10 ⁵	2±1	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁶	2±1	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁷	2±1	-	полный лизис бактериальной культуры	-

Таблица 3

Результаты экспериментов постановки РНФ с целью индикации бактерий *Pseudomonas syringae* бактериофагами Ps.s-7 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ в пробе почвы

Концентрация бактерий <i>Pseudomonas syringae</i> , используемая для контаминации тест объекта - пробы почвы, (м.к./г)	Контроль индикаторного бактериофага (M±m)	Контроль свободного бактериофага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ (раз)
	Количество БОЕ/мл			
Ps.s-7 УлГАУ				
10 ³	3±1	-	15±2	5
10 ⁴	3±1	-	24±3	8
10 ⁵	3±1	-	48±8	16
10 ⁶	3±1	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁷	3±1	-	полный лизис бактериальной культуры	-
Ps.s-27 УлГАУ				
10 ³	2±1	-	12±3	6
10 ⁴	2±1	-	25±2	12
10 ⁵	2±1	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁶	2±1	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁷	2±1	-	полный лизис бактериальной культуры	-

Таблица 4

Результаты экспериментов постановки РНФ с целью индикации бактерий *Pseudomonas syringae* бактериофагами Ps.s-7 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ в пробе речной воды

Концентрация бактерий <i>Pseudomonas syringae</i> , используемая для контаминации тест объекта - речной воды, (м.к./мл)	Контроль индикаторного бактериофага (M±m)	Контроль свободного бактериофага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ (раз)
	Количество БОЕ/мл			
Ps.s-7 УлГАУ				
10 ³	6±2	-	32±12	6
10 ⁴	6±2	-	48±12	8
10 ⁵	6±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁶	6±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁷	6±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
Ps.s-27 УлГАУ				
10 ³	4±2	-	24±2	6
10 ⁴	4±2	-	36±7	9
10 ⁵	4±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁶	4±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁷	4±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-

бульон) было установлено, что этап «предварительное подрачивание» применять в схеме постановки эксперимента нецелесообразно, так как определено, что культивирование системы

«бактериофаг - исследуемый материал» при температуре 28 ± 1 °C в течение 3,5 часов позволяет выявить бактерии *Pseudomonas syringae* при методом РНФ в концентрации 10³ м.к./мл.

Таблица 5

Результаты экспериментов постановки РНФ с целью индикации бактерий *Pseudomonas syringae* полифаговым биопрепаратом в пробе семян огурца

Концентрация бактерий <i>Pseudomonas syringae</i> , используемая для контаминации тест объекта - семян огурца, (м.к./г)	Контроль индикаторного бактериофага (M±m)	Контроль свободного бактериофага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ (раз)
	Количество БОЕ/мл			
10 ³	7±2	-	56±6	8
10 ⁴	7±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁵	7±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁶	7±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁷	7±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-

Таблица 6

Результаты экспериментов постановки РНФ с целью индикации бактерий *Pseudomonas syringae* полифаговым биопрепаратом в пробе почвы

Концентрация бактерий <i>Pseudomonas syringae</i> , используемая для контаминации тест объекта - пробы почвы, (м.к./г)	Контроль индикаторного бактериофага (M±m)	Контроль свободного бактериофага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ (раз)
	Количество БОЕ/мл			
10 ³	6±2	-	24±6	4
10 ⁴	6±2	-	36±8	6
10 ⁵	6±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁶	6±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10 ⁷	6±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-

Увеличение экспозиционного времени не повышает качества реакции. Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 1.

Далее эксперименты были направлены на отработку параметров постановки РНФ на тест-объектах (семена огурца, проба почвы, речная вода), которые были контаминированы бактериями *Pseudomonas syringae* в концентрации 10³ – 10⁷ м.к./мл (г) в лабораторных условиях. Схема эксперимента отражена на рисунке 1. Полученные нами результаты экспериментов представлены в таблицах 2-4.

Принимая во внимание полученные нами положительные результаты экспериментов по индикации бактерий *Pseudomonas syringae* в концентрации 10³ м.к./г (мл) бактериофагами Ps.s-7 УЛГАУ и Ps.s-27 УЛГАУ на пробах семян огурца, почвы и речной воды, было принято решение провести исследования на тех же тест-объектах с применением фагового биопрепарата, состоящего из вышеназванных бактериофа-

гов. Применение бактериофагов в составе полифагового биопрепарата позволило бы сократить затраты расходных материалов и трудозатраты на исследования. Таким образом, продолжительность постановки РНФ с бактериофагами Ps.s-7 УЛГАУ и Ps.s-27 УЛГАУ составляет 23 часа, включающие этап подготовки реакции 30 минут + 3,5 часа - время термостатирования посевов + этап очистки субстрата трихлорметаном - 30 минут + высев субстрата методом агаровых слоев - 30 минут + 18 часов - время термостатирования посевов = 23 часа. В расчет времени не был включен этап предварительной подготовки бактериофага до концентрации 10³ БОЕ/мл.

Следующий этап исследований – это отработка схемы постановки РНФ с целью индикации бактерий *Pseudomonas syringae* фаговым биопрепаратом (два бактериофага - Ps.s-7 УЛГАУ и Ps.s-27 УЛГАУ - культивировались в одном флаконе) в вышеназванных тест-объектах. Результаты экспериментов отражены в таблицах 5-7.

Таблица 7

Результаты экспериментов постановки РНФ с целью индикации бактерий *Pseudomonas syringae* полифаговым биопрепаратом в пробе почвы (титр фага 10^2 БОЕ/мл)

Концентрация бактерий <i>Pseudomonas syringae</i> , используемая для контаминации тест объекта - пробы почвы, (м.к./г)	Контроль индикаторного бактериофага (M±m)	Контроль свободного бактериофага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ (раз)
	Количество БОЕ/мл			
10^3	9±2	-	54±3	6
10^4	9±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10^5	9±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10^6	9±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10^7	9±2	-	полный лизис бактериальной культуры	-

Таблица 8

Результаты экспериментов постановки РНФ с целью индикации бактерий *Pseudomonas syringae* полифаговым биопрепаратом в пробе речной воды

Концентрация бактерий <i>Pseudomonas syringae</i> , используемая для контаминации тест объекта - речной воды, (м.к./мл)	Контроль индикаторного бактериофага (M±m)	Контроль свободного бактериофага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ (раз)
	Количество БОЕ/мл			
10^3	8±1	-	43±8	5
10^4	8±1	-	65±8	8
10^5	8±1	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10^6	8±1	-	полный лизис бактериальной культуры	-
10^7	8±1	-	полный лизис бактериальной культуры	-

Результаты постановки РНФ на тест объекте – семенах огурца – показали, что выявленная при помощи фагового биопрепарата концентрация бактерий *Pseudomonas syringae* составила 10^3 м.к./мл, то есть визуально нами было подсчитано, что количество бляшкообразующих единиц бактериофагов на опытных чашках Петри в сравнении с контрольными увеличилось примерно в 8 раз.

Из материалов таблицы 6 следует, что эффективность РНФ в пробе почвы показала, что обнаруживаемая в пробе почвы концентрация бактерий *Pseudomonas syringae* - это 10^4 м.к./г. Согласно вышесказанным критериям оценки результатов постановки РНФ полученные результаты не являются положительными. Было зафиксировано снижение «чувствительности» реакции, что, по нашему мнению, связано с адаптацией искусственно вносимой бактериальной культуры на тест - объекте и его структурой, которые, возможно, усложняют адсорбцию бактериофагов на индикаторной культуре. С це-

лю повышения эффективности РНФ мы решили снизить исходную концентрацию изучаемого фагового биопрепарата с 10^3 БОЕ/мл до 10^2 БОЕ/мл. Далее мы поставили реакцию по ранее описанному алгоритму. Результаты отражены в таблице 7.

Экспериментально было установлено, что снижение исходного титра полифагового биопрепарата до концентрации 10^2 БОЕ/мл позволило провести индикацию бактерий *Pseudomonas syringae* в концентрации 10^3 мк/г почвы.

Результаты постановки РНФ с целью индикации бактерий *Pseudomonas syringae* фаговым биопрепаратом в пробе речной воды представлены в таблице 8. В исследованиях пробы воды речной были получены результаты, сходные с данными эксперимента на пробе семян огурца. Концентрация выявленных бактерий *Pseudomonas syringae* составила 10^3 м.к./мл.

Свободный бактериофаг не обнаружен ни в одном из экспериментов.

Обсуждение

Таким образом, все проведенные исследования и полученные в ходе них данные принципиально не расходятся с данными аналогичных исследований на иных бактериальных агентах [24, 26] и позволяют рекомендовать данный алгоритм в качестве метода индикации фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae* в пробах почвы, семенном материале и воде. Длительность исследования составляет 23 часа, простота постановки РНФ не требует высокой квалификации исследователя и сложнотехнического оснащения лаборатории.

Заключение

При проведении исследований по разработке параметров практического применения фагового биопрепарата *Pseudomonas syringae* с целью индикации в пробах воды, почвы и в семенном материале в реакции нарастания титра фага было определено, что культивирование системы: бактериофаг - исследуемый материал при температуре 28 ± 1 °С в течение 3,5 часов позволяет выявить в вышеназванных тест - объектах бактерии *Pseudomonas syringae* при методом РНФ в концентрации 10^3 м.к./мл. Увеличение экспозиционного времени не повышает качества реакции. Бактериофаги Ps.s-7 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ в монокультуре были использованы в экспериментах в концентрации 10^3 БОЕ/мл. При тестировании в РНФ полифагового био-препарата на основе вышеназванных бактериофагов было установлено, что в исследованиях пробы воды речной были получены результаты, сходные с данными эксперимента на пробе семян огурца. Концентрация выявленных бактерий *Pseudomonas syringae* составила 10^3 м.к./мл. Экспериментально было установлено, что снижение исходного титра полифагового био-препарата до концентрации 10^2 БОЕ/мл позволило провести индикацию бактерий *Pseudomonas syringae* в пробе почвы в концентрации 10^3 мк/г.

Полученные данные позволят в перспективе использовать реакцию нарастания титра фага в качестве ускоренного и методически простого метода тестирования семенного материала, почвы и воды на наличие фитопатогенного бактериального агента *Pseudomonas syringae*. В случае положительного результата разработать систему мероприятий по их санации специфичным и экологически чистым фаговым био-препаратом.

Библиографический список

1. Кругова, Е. Д. Специфические страте-

гии клубеньковых и фитопатогенных бактерий при инфицировании растений / Е. Д. Кругова // Физиология и биохимия культурных растений. - 2009. - Т. 41, № 1. - С. 3-15.

2. Буров, В. Н. Использование индукторов иммунитета в защите растений / В. Н. Буров, В. И. Долженко // Защита и карантин растений. - 2008. - № 8. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/ispolzovanie-induktorov-immuniteta-v-zaschite-rasteniy> (дата обращения: 25.05.2020).

3. The relationship of host range, physiology, and genotype to virulence on cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from cantaloupe blight epidemics in France / С. E. Morris [and oth.] // Phytopathology. - 2000. - Vol. 90. - P. 636-646.

4. Панычева, Ю. С. Селекция растений сахарной свеклы на устойчивость к бактериозам: проблемы и пути решения / Ю. С. Панычева // Успехи современной науки. - 2017. - Т. 1, № 10. - С. 90-93.

5. Patyka, V. P. Phytopathogenic bacteria in contemporary agriculture / V. P. Patyka // Мікробіологічний журнал. - 2016. - № 78 (6). - P. 71-83.

6. Котляров, В. В. Изучение бактериальных болезней зерновых колосовых культур и разработка способов защиты посевов от них / В. В. Котляров, А. А. Дьяченко, Ю. П. Федулов // Труды КубГАУ. Краснодар, 2005. Вып. 2. С. 197-206.

7. Шпанев, А. М. Угроза посевам проса / А. М. Шпанев // Защита и карантин растений. - 2003. - № 6. - С. 40.

8. Ареал и зоны вредоносности бактериального ожога гороха (научно-аналитический обзор) / А. М. Лазарев, В. А. Коробов, И. Н. Надточий, Е. Н. Мыслик // Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки. - 2015. - № 15(212). - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/areal-i-zony-vredonosnosti-bakterialnogo-ozhogogoroha-nauchno-analiticheskij-obzor> (дата обращения: 25.05.2020).

9. Игнатов, А. Н. Распространение бактериальных и фитоплазменных болезней растений в России / А. Н. Игнатов, М. С. Егорова, М. В. Ходыкина // Защита и карантин растений. - 2015. - № 5. - С. 6-10

10. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rasprostranenie-bakterialnyh-i-fitoplazmennyh-bolezney-rasteniy-v-rossii> (дата обращения: 25.05.2020).

11. Xin, X. F. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen / X. F. Xin, B. Kvitko, S. Y. He // Nature Reviews Microbiology. - 2018. - Vol. 16, № 5. - P. 316.

12. Бактериальные болезни капусты и меры борьбы с ними : методические рекомендации / под редакцией В. А. Павлюшина. – Санкт-Петербург, 2004. - 56 с.

13. Бактериальные болезни подсолнечника / С. Г. Бородин, И. А. Котлярова, Г. А. Терещенко, Н. В. Пашаян // Масличные культуры. - 2012. - № 1(150). –URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/bakterialnye-bolezni-podsolnechnika> (дата обращения: 05.05.2020).

14. Игнатов, А. Н. Распространение возбудителей опасных бактериозов растений в Российской Федерации / А. Н. Игнатов // Защита картофеля. – 2014. – № 2. – С. 53-57.

15. Tomato wall-associated kinase SlWak1 depends on Fls2/Fls3 to promote apoplastic immune responses to *Pseudomonas syringae* / N. Zhang, M. A. Pombo, H. G. Rosli, G. B. Martin // *Plant physiology*. – 2020. – Vol. 183, № 4. – P. 1869-1882.

16. Косова, В. Н. Защита огурца от угловой и оливковой пятнистостей в условиях Курганской области / В. Н. Косова // Вестник Курганской ГСХА. – 2018. – № 3 (27). – С. 29-35.

17. Red light delays programmed cell death in non-host interaction between *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 and tobacco plants / L. Moyano, M. P. Lopéz-Fernández, A. Carrau [et al.] // *Plant Science*. – 2020. – Vol. 291. – P. 110361.

18. Krzysztof, K. Kosakoniacowanii as the New Bacterial Pathogen Affecting Soybean (*Glycine max* Willd.) / K. Krzysztof, B. F. Natasza // *European Journal of Plant Pathology*. – 2020. – T. 157, № 1. – С. 173-183.

19. Genome-wide identification and expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes in apple (*Malus domestica*) / C. Li, D. Meng, J. Zhang, L. Cheng // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2019. – Vol. 139. – P. 600-612.

20. Фадеев, И. А. Искусственные лесные насаждения Волгоградской области и их состояние / И. А. Фадеев, С. В. Колмукиди // Актуальные направления научных исследований XXI века: теория и практика. – 2015. – Т. 3, № 4-2.

– С. 129-132.

21. Кульбанська, І. М. Еколого-лісівничі чинники та їхній вплив на поширення туберкульозу ясен звичайного в західному Поділлі України / І. М. Кульбанська // Науковий вісник НЛТУ України. - 2015. - № 6. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/ekologo-lisivnichi-chinniki-ta-yihniy-vpliv-na-poshirennya-tuberkulozu-yasena-zvichaynogo-v-zahidnomu-podilli-ukrayini> (дата обращения: 25.05.2020).

22. Выделение и характеристика бактериофагов фитопатогенных бактерий / Н. И. Гирилович, П. И. Орловская, Т. А. Пилипчук [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2019. – С. 71-81.

23. Экологические особенности фагов фитопатогенных бактерий *Pseudomonas* на посевах сахарной свеклы / Е. Н. Андрийчук, Л. И. Семчук, С. А. Ромашев, Т. А. Игнатенко // Актуальні проблеми ботаніки, екології та біотехнології (27-30 вересня, 2006 р., м. Київ). – Київ : Фітосоціоцентр, 2006. – С. 129.

24. Герасимович, А. Д. Характеристика бактериофагов фитопатогенных бактерий / А. Д. Герасимович, Г. И. Новик, Э. И. Коломиец // Микробные технологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2012. - Т. 4. – С. 140-153.

25. Садртдинова, Г. Р. Биоиндикация бактерий вида *Klebsiella oxytoca* в объектах ветеринарно-санитарного надзора / Г. Р. Садртдинова // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. - 2017. - № 4(36). –URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/bioindikatsiya-bakteriy-vida-klebsiella-oxytoca-v-obektah-veterinarno-sanitarnogo-nadzora> (дата обращения: 25.05.2020).

26. Чугунова, Е. О. Применение бактериофагов для детекции бактерий (обзор литературы) / Е. О. Чугунова, Н. А. Татарникова // Пермский аграрный вестник. – 2016. – № 4 (16). – С. 121-126.

27. Пименов, Н. В. Фагоиндикация *Staphylococcus aureus* в образцах молока / Н. В. Пименов, Е. А. Глазунов, Е. Е. Новикова // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2019. – № 8. – С. 31-39.

DEVELOPMENT OF PHAGOINDICATION METHOD FOR PSEUDOMONAS SYRINGAE BACTERIA IN SANITARY CONTROL OBJECTS

Feoktistova N.A., Bekkalieva A.K., Vasilyev D.A., Suldina E.V.
FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017, Ulyanovsk, Novy Venetz boulevard, 1; 8(8422)55-95-47
e-mail: feokna@yandex.ru

Key words: *Pseudomonas syringae*, indication, phage titer increase reaction, parameters, polyphage biopreparation, soil, river water, cucumber seeds
The article presents the results of research on the development of parameters for practical application of phage biopreparation *Pseudomonas syringae*

in order to indicate the data of phytopathogenic bacteria in sanitary control objects. The introduction of the article describes pathogens of *Pseudomonas syringae* and plants that they affect, which proves research actuality aimed at developing speed-up methods of indication and identification of bacteria-pathogens, which will allow specialists to develop measures to combat above-mentioned phytopathogens in a short time. It was established that cultivation of the "bacteriophage-test material" system at a temperature of 28 ± 1 °C during 3.5 hours allows detecting *Pseudomonas syringae* bacteria in soil samples, river water, and cucumber seeds by the RSF method at a concentration of 103 MK/ml., increase in the exposure time does not improve the quality of the reaction. The bacteriophages Ps. s-7 UIGAU and Ps. s-27 UIGAU in monoculture were used in experiments at a concentration of 103 BFU/ml. When testing a polyphage biological product in RSF, including all the above-mentioned bacteriophages, it was found that the results obtained in the studies of the river water sample were similar to the experimental data on cucumber seed sample. Concentration of detected *Pseudomonas syringae* bacteria was 103 m.k./ml. It was experimentally established that reducing the initial titer of polyphage biopreparation to a concentration of 102 BFU / ml allowed for the indication of *Pseudomonas syringae* bacteria in a soil sample at a concentration of 103 mk/g.

Bibliography

1. Krugova, E. D. Specific strategies of nodule and phytopathogenic bacteria in plant infection / E. D. Krugova // *Physiology and biochemistry of cultivated plants*. - 2009. - V. 41, № 1. - P. 3-15.
2. Burov, V. N. Use of immune inducers in plant protection / V. N. Burov, V. I. Dolzhenko // *Plant protection and quarantine*. - 2008. - № 8. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/ispolzovanie-induktorov-immuniteta-v-zaschite-rasteniy> (reference data: 25.05.2020).
3. The relationship of host range, physiology, and genotype to virulence on cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from cantaloupe blight epidemics in France / C. E. Morris [and oth.] // *Phytopathology*. - 2000. - Vol. 90. - P. 636-646.
4. Panycheva, Yu. S. Selection of sugar beet plants for resistance to bacteriosis: problems and solutions / Yu. S. Panycheva // *Progress of modern science*. - 2017. - V. 1, № 10. - P. 90-93.
5. Palyka, V. P. Phytopathogenic bacteria in contemporary agriculture / V. P. Palyka // *Microbiological journal*. - 2016. - № 78 (6). - P. 71-83.
6. Kotlyarov, V. V. Study of bacterial diseases of grain crops and development of ways to protect crops from them / V. V. Kotlyarov, A. A. Dyachenko, Yu. P. Fedulov // *Works of KubSAU. Krasnodar*, 2005. Pub. 2. P. 197-206.
7. Shpanev, A. M. The threat millet crops / A. M. Shpanev // *Plant protection and quarantine*. - 2003. - № 6. - P. 40.
8. Area and zones of harmfulness of bacterial burn of peas (scientific and analytical review) / A. M. Lazarev, V. A. Korobov, I. N. Nadtochy, E. N. Mysnik // *Scientific reports BelSU. Series: Natural sciences*. - 2015. - № 15(212). - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/areal-i-zony-vredonosnosti-bakterialnogo-ozhoga-goroha-nauchno-analiticheskiy-obzor> (Reference data: 25.05.2020).
9. Ignatov, A. N. Spread of bacterial and phytoplasmic plant diseases in Russia / A. N. Ignatov, M. S. Egorova, M. V. Khodykina // *Plant protection and quarantine*. - 2015. - № 5. - P. 6-10
10. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rasprostranenie-bakterialnyh-i-fitoplazmennyh-bolezney-rasteniy-v-rossii> (reference data: 25.05.2020).
11. Xin, X. F. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen / X. F. Xin, B. Kvitko, S. Y. He // *Nature Reviews Microbiology*. - 2018. - Vol. 16, № 5. - P. 316.
12. *Bacterial diseases of cabbage and measures to control them: guidelines* / edited by V. A. Pavlyushin. - Saint-Petersburg, 2004. - 56 p.
13. Bacterial diseases of sunflower / S. G. Borodin, I. A. Kotlyarova, G. A. Tereshenko, N. V. Pashayan // *Oil cultures*. - 2012. - № 1(150). - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/bakterialnye-bolezni-podsolnechnika> (reference data: 05.05.2020).
14. Ignatov, A. N. Spread of causative agents of dangerous bacterial diseases of plants in the Russian Federation / A. N. Ignatov // *Potato protection*. - 2014. - № 2. - P. 53-57.
15. Tomato wall-associated kinase SlWak1 depends on Fls2/Fls3 to promote apoplastic immune responses to *Pseudomonas syringae* / N. Zhang, M. A. Pombo, H. G. Rosli, G. B. Martin // *Plant physiology*. - 2020. - Vol. 183, № 4. - P. 1869-1882.
16. Kosova, V. N. Protection of cucumber from angular and olive spots in the Kurgan region / V. N. Kosova // *Vestnik of Kurgan SAA*. - 2018. - № 3 (27). - P. 29-35.
17. Red light delays programmed cell death in non-host interaction between *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 and tobacco plants / L. Moyano, M. P. López-Fernández, A. Carrau [et al.] // *Plant Science*. - 2020. - Vol. 291. - P. 110361.
18. Krzysztof, K. Kosakoniacowanii as the New Bacterial Pathogen Affecting Soybean (*Glycine max* Willd.) / K. Krzysztof, B. F. Natasza // *European Journal of Plant Pathology*. - 2020. - V. 157, № 1. - P. 173-183.
19. Genome-wide identification and expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes in apple (*Malus domestica*) / C. Li, D. Meng, J. Zhang, L. Cheng // *Plant Physiology and Biochemistry*. - 2019. - Vol. 139. - P. 600-612.
20. Fadeev, I. A. Artificial forest stands of the Volgograd region and their condition / I. A. Fadeev, S. V. Kolmukidy // *Current directions of scientific research in the XXI century: theory and practice*. - 2015. - V. 3, № 4-2. - P. 129-132.
21. Kulbanska, I. M. Ecological and forestry factors and their influence on the spread of tuberculosis of common ash in the Western Podillya of Ukraine / I. M. Kulbanskaya // *Scientific bulletin of NFTU of Ukraine*. - 2015. - № 6. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/ekologo-lisivnichi-chinniki-ta-yihniy-vpliv-na-poshirennya-tuberkulozu-yasena-zvichaynogo-v-zahidnomu-podilli-ukrayini> (reference data: 25.05.2020).
22. Isolation and characterization of bacteriophages of phytopathogenic bacteria / N. I. Girilovich, P. I. Orlovskaya, T. A. Pilipchuk [et al.] // *Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects*. - 2019. - P. 71-81.
23. Ecological features of phages of phytopathogenic bacteria *Pseudomonas* on sugar beet crops / E. N. Andriychuk, L. I. Semchuk, S. A. Romashev, T. A. Ignatenko // *Current problems of botany, ecology and biotechnology* (27-30 September, 2006, m. Kiev). - Kiev: Phytosocenter, 2006. - P. 129.
24. Gerasimovich, A. D. Characteristics of bacteriophages of phytopathogenic bacteria / A. D. Gerasimovich, G. I. Novik, E. I. Kolomiets // *Microbial technologies: fundamental and applied aspects*. - 2012. - V. 4. - P. 140-153.
25. Sadrdinova, G. R. Bioindication of *Klebsiella oxytoca* bacteria in objects of veterinary and sanitary control / G. R. Sadrdinova // *Current issues of veterinary biology*. - 2017. - № 4(36). - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/bioindikatsiya-bakteriy-vida-klebsiella-oxytoca-v-obektah-veterinarno-sanitarnogo-nadzora> (reference data: 25.05.2020).
26. Chugunova, E. O. Application of bacteriophages for detection of bacteria (literature review) / E. O. Chugunova, N. A. Tatarnikova // *Perm agrarian vestnik*. - 2016. - № 4 (16). - P. 121-126.
27. Pimenov, N. V. Phage indication of *Staphylococcus aureus* in milk samples / N. V. Pimenov, E. A. Glazunov, E. E. Novikova // *Veterinary, zootechnics and biology*. - 2019. - № 8. - P. 31-39.