

## 06.02.00 ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ

06.02.02 – ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ, ЭПИЗООТОЛОГИЯ, МИКОЛОГИЯ  
С МИКОТОКСИКОЛОГИЕЙ И ИММУНОЛОГИЯ (БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ)

УДК 632.35:579.64

DOI 10.18286/1816-4501-2021-2-148-156

### РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* И ЕЕ АПРОБАЦИИ

**Феоктистова Наталья Александровна**<sup>1</sup>, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Беккалиева Айдын Канатовна**<sup>2</sup>, магистр Высшей школы технологии производства продукции растениеводства Института агротехнологии

**Васильев Дмитрий Аркадьевич**<sup>1</sup>, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Сулдына Екатерина Владимировна**<sup>1</sup>, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47; e-mail: feokna@yandex.ru

<sup>2</sup>НАО ЗКАТУ имени Жангир хан

090009, Республика Казахстан, г.Уральск, улица Жангир хана, 51; 8(7112)501374; aidyn\_kanatovna@mail.ru

**Ключевые слова:** бактериологическая схема, *Pseudomonas syringae*, бактериоз, свойства, культура, идентификация

В статье представлены результаты исследований по разработке схемы выделения и бактериологической идентификации бактерий *Pseudomonas syringae* и ее апробации. Во введении статьи описаны объекты контаминации *Pseudomonas syringae* – плодовые деревья и кустарники, сельскохозяйственные растения, что доказывает актуальность исследований в области расширения лабораторных методов идентификации фитопатогенных микроорганизмов. Авторская бактериологическая схема включает использование в качестве селективной среды – среду Кинг Б (*King B Medium (Pseudomonas F Agar; Pronadisa 1532)*). Первоначально проводится дифференцирование выделенных бактерий до рода *Pseudomonas*, изучаются следующие показатели: анаэробная ферментация, продукция ферментов каталазы, лецитиназы, липазы; гидролиз крахмала и желатина; ферментация глюкозы и лактозы, ставится тест на мацерацию. Второй этап исследований включает изучение роста бактериальных культур на МПА при 41°C и при 5 % NaCl; продукцию оксидазы, аргинингидролазы; ферментацию маннозы и сорбита; образование левана, сероводорода и индола, эскулина, ставится реакция гиперчувствительность. Определяемые показатели позволяют типировать представителей рода до вида *Pseudomonas syringae* в течение 192 часов. При выполнении исследований была сформирована коллекция из 12 штаммов бактерий *Pseudomonas syringae*, выделенных из 97 объектов фитосанитарного надзора и идентифицированных по разработанной методике. Предлагаемая бактериологическая схема позволяет на основании анализа 25 показателей дифференцировать вышеуказанные микроорганизмы. Применение фагового биопрепарата в качестве диагностикума (по методу Отто) расширяет спектр анализируемых биологических свойств выделенных и идентифицируемых бактерий *Pseudomonas syringae*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Ульяновской области РФ в рамках научного проекта № 19-44-730014.

## Введение

Бактерии – представители вида *Pseudomonas syringae* являются патогенами растений и возбудителями бактериального некроза яблони, приводящего к потере урожайности, качества продукции, снижению продуктивности садов и их гибели [1], вызывают бактериальные болезни пшеницы и ржи, а также сопутствующих сорняков в агрофитоценозе [2-3]. Бактерии *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* вызывают заболевания груш, айвы, сирени, сливы, фасоли, капусты белокочанной, подсолнечника, томатов, земляники [4-7]. Бактериальная пятнистость листьев сахарной свеклы вызывается биоварами бактерий вида *Pseudomonas syringae*: *Pseudomonas syringae* bv. *Syringae* и *Pseudomonas syringae* bv. *aptata*. *Pseudomonas syringae*. Данные бактерии иницируют у растений бурое слизетечение, повреждение корнеплодов и пятнистость листьев [8].

Бактериальные штаммы вида *Pseudomonas syringae* секретируют специфический фитотоксин – сирингомицин. Инфицированию растений способствуют повышенная влажность и прохладная погода. Определенное время многие из представителей данного рода рассматривались как самостоятельные виды. Активное внедрение молекулярно-генетических методов в лабораторную практику позволило определить принадлежность многих из них к виду *Pseudomonas syringae* [9 - 10]. С помощью PCR - и RFLP - анализов было изучено генетическое разнообразие полевых штаммов *Pseudomonas syringae* и подобраны специфические праймеры, позволяющие их идентифицировать [11]. Расширение арсенала лаборатории за счет использования новых методологических приемов не снижает значимости максимально достоверных бактериологических методов идентификации микроорганизмов, поэтому разработка ускоренной схемы выделения и бактериологической идентификации бактерий *Pseudomonas syringae* и ее апробация – это актуальная цель исследований, достижение которой позволит провести скрининг объектов фитосанитарного надзора на наличие вышеназванного патогена и подобрать коллекцию «полевых» бактериальных штаммов.

## Материалы и методы исследований

Было проанализировано на наличие бактерий *Pseudomonas syringae* 157 проб объектов внешней среды и санитарного надзора: 97 пробы почвы, 15 - вода открытых водоемов, сточные воды, 45 – сельскохозяйственные рас-

тения), полученных на территории Ульяновской области (Чердаклинский, Старомаинский, Маинский, Инзенский, Ульяновский, Барышский, Новоспасский, Николаевский, Павловский, Кузоватовский, Сурский и Цильнинский районы), Самарская область (Елховский и Кошкинский районы).

Выделение и идентификация *Pseudomonas syringae* проводились с применением следующих методов и подходов: выделение чистых культур по Дригальскому; тинкториальные свойства - окраска мазков по Граму и по Трухильо, микроскопия; морфология бактерий - культивирование *Pseudomonas syringae* на цетримидном агаре, картофельном агаре с ТТХ и среде Кинг Б (King B Medium (*Pseudomonas* F Agar; Pronadisa 1532); идентификация по биохимическим свойствам - отношение бактерий к окраске по Граму, подвижность, наличие спор, флуоресценция, продукция оксидазы, каталазы, аргинингидролазы, образование левана, индола и сероводорода, гидролиз желатина и крахмала, О/Ф тест, липолитическая (ТВИНазная) и лецитиназная активность; ферментация глюкозы, лактозы, сахарозы, маннозы и сорбита; рост бактерий на МПА при температуре 41 °С; рост бактерий на МПА с 5% NaCl; тест на мацерацию и гиперчувствительность. Бактериологическая схема идентификации проводилась по общеизвестным бактериологическим тестам, указанным в литературных источниках [12 - 14].

Фагочувствительность определялась с использованием полифагового биопрепарата, состоявшего из двух бактериофагов - Ps.s-7 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ (индикаторная культура *Pseudomonas syringae* Ps.s № 3; показатель литической активности  $1,0 \pm 0,2 \times 10^9$  БОЕ/мл) по методу Отто – «стекающая капля» [15].

Апробация бактериологической схемы осуществлялась на референс-штаммах *Pseudomonas syringae* №3 (получен из коллекции микроорганизмов кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновского ГАУ) и *Pseudomonas syringae* В-10917 (получен из БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика).

## Результаты исследований

На основании данных, полученных при изучении биологических свойств вышеназванных референс-штаммов *Pseudomonas syringae*, была разработана схема бактериологической идентификации данных бактерий, включающая подготовку пробы (гомогенизация, разведение в стерильном МПБ в соотношении 1:10, термостатирование пробы при температуре 28 °С) и

ее посев на селективную среду (была выбрана из трех питательных сред - цетримидного агара, картофельного агара с ТТХ и среды Кинг Б). На МПА проявлялся рост в виде хорошо растущих мелких белых колоний с ровными краями. На среде Кинг Б рост бактерий проявлялся следующим образом - мелкие круглые колонии со слабой флуоресценцией в проходящем УФ свете. На среде с картофельным агаром и ТТХ мы наблюдали слабый бактериальный рост, мелкие плохо заметные колонии. На цетримидном агаре бактерии *Pseudomonas syringae* растут в виде разреженных мелких белых флуоресцирующих с четкими краями колоний. В качестве селективной среды было принято решение применять среду Кинг Б. Этап выделения и очистки бактериальной культуры занимает 48 часов.

В основу разработки схемы бактериологической идентификации было положено изучение следующих показателей:

- отношение бактерий к окраске по Граму;
- подвижность;
- наличие спор;
- флуоресценция;
- продукция оксидазы, каталазы, аргинин-гидролазы;
- образование левана, индола и сероводорода;
- гидролиз желатина и крахмала;
- О/Ф тест,
- липолитическая (ТВИНазная) и лецити-



**Рис. 1 – Рост *Pseudomonas syringae* В-10917 на среде Кинг Б в течение 24 часов при температуре 28°C (под УФ лучами виден флуоресцирующий оттенок)**

назная активность;

- ферментация глюкозы, лактозы, сахарозы, маннозы и сорбита;
- рост бактерий на МПА при температуре 41 °С;
- рост бактерий на МПА с 5% NaCl;
- тест на мацерацию и гиперчувствительность;
- применение специфических бактериофагов.

Время исследований составляет 144 часа.

Разрабатываемая схема позволяет первоначально дифференцировать бактерии до рода *Pseudomonas*, изучая следующие показатели: анаэробная ферментация, продукция ферментов каталазы, лецитиназы, липазы, гидролиз крахмала и желатина, ферментация глюкозы и лактозы, тест на мацерацию. Второй этап исследований включает изучение роста бактериальных культур на МПА при 41°C и при 5 % NaCl; продукция оксидазы, аргинингидролазы, ферментация маннозы, сорбита, образование левана, сероводороды и индола, эскулина, гиперчувствительность. Определяемые показатели позволяют типировать представителей рода до вида *Pseudomonas syringae*.

В таблице 1 систематизированы данные, полученные при апробации схемы бактериологической идентификации на референс-штаммах *Pseudomonas syringae*. Были зафиксированы отрицательные результаты по тестам на оксидазу и аргинингидролазу, определена продукция каталазы. По литературным данным бактерий *Pseudomonas syringae* гидролизуют желатин variably [12-14], по нашим исследованиям оба референс-штамма не разжижают желатин. О/Ф тест положительный. Липолитическая (твиназная) активность регистрировалась, лецитиназная активность не фиксировалась. Изучаемые бактериальные штаммы образуют леван, индол не выделяют, не растут на МПА при температуре 41 °С. Ферментируют глюкозу, сахарозу, маннозу и сорбит. Тест на мацерацию ткани картофеля через 24 часа – результат отрицателен. Реакция на гиперчувствительность положительная, что соответствует литературным данным [12-14, 16-17]. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что референс-штаммы *Pseudomonas syringae* обладают характерными для вида свойствами.

Апробация разработанной схемы бактериологической идентификации бактерий *Pseudomonas syringae* позволила сформировать коллекцию из 12 штаммов бактерий. Результаты

Биологические свойства референс-штаммов *Pseudomonas syringae*

№	Показатель	Литературные данные [12-14, 16-17]	Штаммы бактерий <i>Pseudomonas syringae</i>	
			В-10917	№ 3
1	Окраска по Граму	гр-	гр-	гр-
2	Подвижность	+	+	+
3	Наличие спор	-	-	-
4	Флуоресценция	+	+	+
5	Оксидаза	-	-	-
6	Каталаза	+	+	+
7	Аргинингидролаза	-	-	-
8	Гидролиз: желатина	В	-	-
9	крахмала	-	-	-
10	О/Ф тест	О	О	О
11	Липолитическая (ТВИНазная) активность	+	+	+
12	Лецитиназная активность	-	-	-
13	Образование левана	+	+	+
14	индола	-	-	-
15	сероводорода	-	-	-
16	Ферментация глюкозы	+	+	+
17	лактозы	-	-	-
18	сахарозы	+	+	+
19	маннозы	+	+	+
20	сорбита	+	+	-
21	Рост на МПА при 41°C на МПА	-	-	-
22	Рост в МПА с 5% NaCl	-	-	-
23	Тест на мацерацию ткани картофеля	-	-	-
24	Гиперчувствительность	+	+	+
25	Эскулин	+	+	+

Примечание: «+» - положительная реакция,  
«-» - отрицательная реакция;  
«гр-» - грамотрицательный.

изучения их биологических свойств представлены в таблице 2.

Выделенные бактериальные культуры - грамотрицательные подвижные, не образующие споро, флуоресцирующие штаммы, у которых фиксировалась отрицательная реакция на оксидазу, на каталазу – положительная (рис. 2).

Определено, что бактериальный штамм *Pseudomonas syringae* Ps.s № 11 желатин разжижает медленно в течение 3 суток, а остальные 11 выделенных бактериальных культур не способны к гидролизу желатина (срок наблюдения 7 суток). Также в ходе исследований было выявлено что все выделенные нами штаммы не гидролизуют крахмал (рис. 3), дают отрицательный результат на индол, отсутствует лецитиназная активность, не образуют сероводород, не используют лактозу.

Анаэробная ферментация у всех выделенных штаммов фиксировалась аналогичным



Рис. 2 – Каталазная реакция штамма *Pseudomonas syringae* Ps.s №33 (на штамм бактерий, выращенный на МПА при 28°C в течение 24 часов нанесен 3% раствор перекиси водорода)

Биологические свойства выделенных штаммов *Pseudomonas syringae*

№	Показатель	Полевые штаммы											
		36	56	66	11	7	23	4	33	35	37	38	77
1	Окраска по Граму	гр-	гр-	гр-	гр-	гр-	гр-	гр-	гр-	гр-	гр-	гр-	гр-
2	Подвижность	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Споры	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Флуоресценция	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Оксидаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Аргинингидралаза	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Гидролиз: желатина	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	крахмала	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	О/Ф тест	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О
11	Липолитическая (твиназная) активность	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Лецитиназная активность	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Образование левана	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	индола	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	сероводорода	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Ферментация глюкозы	+	+	+	+	+	±	±	±	-	+	+	±
17	лактозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	сахарозы	±	+	±	+	±	±	±	±	+	+	+	±
19	маннозы	+	+	+	+	-	±	-	±	+	+	-	-
20	сорбита	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Рост на МПА при 41°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	Рост в МПА с 5% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Тест на мацерацию ткани картофеля	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Гиперчувствительность	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	Эскулин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	Фагочувствительность	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+» - положительная реакция,  
«-» - отрицательная реакция;  
«±» - вариабельный результат;  
«гр-» - грамотрицательный.

образом, то есть бактерий под вазелиновым маслом не росли, то есть было доказано, что выделенные и первично идентифицированные штаммы бактерий *Pseudomonas syringae* являются аэробами и у них идет окислительная реакция (рис. 4). Все изучаемые бактериальные штаммы образуют левансахаразу, что можно визуально определить следующим образом: у всех культур на среде с 5% сахарозой образуются белые, мукоидные, тянущиеся колонии (рис. 5). Также все 12 штаммов являются липолитически активными (рис. 6) и относятся к аэробам, что объясняется окислительной реакцией.

Сахаролитические свойства – определено, что глюкозу ферментируют 11 выделенных штаммов бактерий, кроме штамма Ps.s № 35, из 11 штаммов изменилась окраска среды на вторые сутки у штаммов Ps.s №23, Ps.s №4, Ps.s №33, Ps.s №77; сахарозу ферментируют все выделенные штаммы; маннозу - все штаммы кроме Ps.s №7, Ps.s №4, Ps.s №38, Ps.s №77; сорбит - только 3 штамма – Ps.s № 56, Ps.s № 66, Ps.s № 11; эмпирически утановлено, что все выделенные бактериальные культуры лактозоотрицательны.

Проведенные нами эксперименты позво-

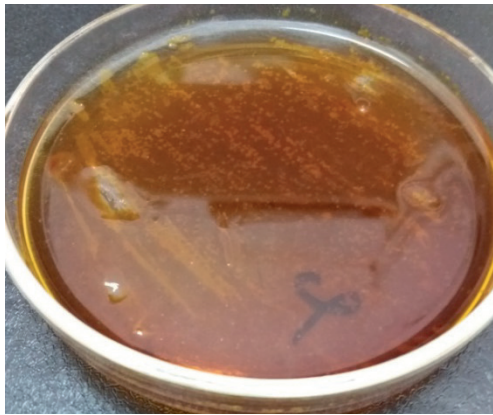


Рис. 3 – Определение гидролиза крахмала (на штамм *Ps.s* №23, выращенного на картофельном агаре при 28°C в течение 24 часов, был нанесен раствор Люголя)

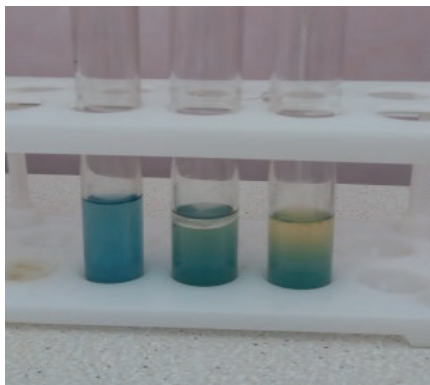


Рис. 4 - O/F тест (определение анаэробной ферментации) слева пробирка контроль, по середине пробирка с вазелиновым маслом (штамм №7), справа пробирка без вазелинового масла (штамм №7)



Рис. 5 – Образование левансахаразы выделеными бактериями (время экспозиции 24 часа при температуре 28°C) первый сектор (по часовой стрелке) штамм *Ps.s* № 3б, второй сектор штамм *Ps.s* № 4, третий сектор штамм *Ps.s* № 38)

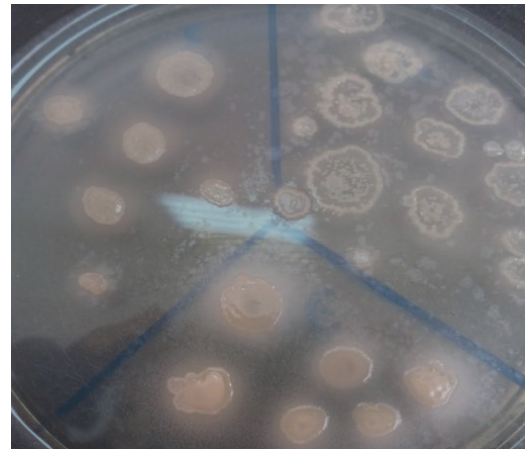


Рис. 6 – Липолитическая (ТВИНазная) активность *Pseudomonas syringae* (время экспозиции 72 часа при температуре 28°C) (первый сектор (по часовой стрелке) штамм *Ps.s* № 6б, второй сектор штамм *Ps.s* 33, третий сектор штамм *Ps.s* 77)

ляют утверждать, что все выделенные 12 штаммов бактерий не выделяют сероводород, некоторые штаммы *Ps.s* № 5б, *Ps.s* № 6б, *Ps.s* № 11 проявили аргининдегидролазную активность, им было характерно свойство флуоресценции при воздействии УФЛ (рис. 7), лецитиназная активность не была установлена ни у одного бактериального штамма. Определено, что изучаемые штаммы бактерий не растут на МПА при температуре 41°C и на МПА с 5% NaCl при температуре 28°C. Тест на мацерацию дал отрицательный результат, реакция на гиперчувствительность дала положительные результаты на всех выделенных штаммах бактерий. Определение фагочувствительности выделенных бактерий методом Отто (на газон изучаемой бактериальной культуры наносится 1 капля фагового биопрепарата и 1 капля стерильного мясopептонного бульона (контроль), чашка Петри наклоняется, затем посеы инкубируются в условиях термостата в течение 24 часов при температуре 28 °C) показало, что рекомендованный для применения в качестве диагностикума полифаговый биопрепарат *Pseudomonas syringae* образовывал зоны лизиса на газоне всех 12 изучаемых бактериальных культур, что подтверждает его специфичность.

#### Обсуждение

По литературным данным бактериальные болезни у растений менее распространены, чем вызываемые микроскопическими грибами, однако при интенсивном развитии могут причинить серьезный ущерб, приводя к экономическим потерям [2, 6-7]. Среди бактериальных

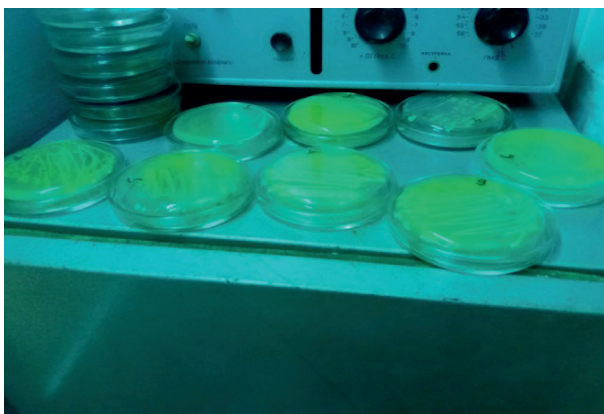


Рис. 8 – Рост выделенных из окружающей среды бактерий *Pseudomonas syringae* на среде Кинг Б в течение 24 часов при температуре 28°C (под УФ лучами виден флуоресцирующий оттенок)

болезней распространение получила бактериальная пятнистость листьев, вызываемая биоварами бактерий вида *Pseudomonas syringae*. Данные бактерии вызывают у растений бурое слизетечение, повреждения корнеплодов и пятнистость листьев.

В статье изложен экспериментальный материал по разработке схемы выделения и бактериологической идентификации бактерий *Pseudomonas syringae* и описаны результаты ее апробации на 157 объектах фитосанитарного надзора. В ходе исследований нами была сформирована коллекция из 12 штаммов бактерий *Pseudomonas syringae*, идентификация которых осуществлялась по разработанной авторской бактериологической схеме в течение 192 часов, включающей использование в качестве селективной среды – среду Кинг Б (King B Medium (*Pseudomonas* F Agar; Pronadisa 1532) и изучение тинкториальных, морфологических и биохимических свойств типизируемых бактерий в 2 этапа. Первый этап исследований позволяет дифференцировать бактерий рода *Pseudomonas*, второй – идентифицировать представителей вида *Pseudomonas syringae*. Предлагаемая бактериологическая схема позволяет на основании анализа 25 показателей дифференцировать выше-названные микроорганизмы. Введение в авторскую бактериологическую схему теста на фагочувствительность с использованием авторского фагового биопрепарата в качестве диагностикума (по методу Отто) расширяет спектр анализируемых биологических свойств выделенных и идентифицируемых бактерий *Pseudomonas syringae*. Бактериофаги могут также применять-

ся не только в лабораторной практике, но и как экологически чистые препараты с максимально пролонгированным действием для защиты сельскохозяйственных культур от бактериозов, вызываемых *Pseudomonas syringae* [16-20].

#### Заключение

Разработанная бактериологическая схема выделения и идентификации бактерий *Pseudomonas syringae* позволяет конкретизировать количество тестов для типирования выше-названных бактерий, которые описаны в Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [12-14], снизив тем самым материальные затраты на исследования, а также провести скрининг объектов фитосанитарного надзора на наличие выше-названного патогена в течение 192 часов. Применение фагового биопрепарата для определения фагочувствительности выделенных бактерий и получение положительного результата в эксперименте может быть использовано в перспективе при подборе агротехнологических приемов выращивания сельскохозяйственных культур.

#### Библиографический список

1. Маслова, М. В. Устойчивость подвойных форм и сортов яблони к токсинам возбудителя бактериального некроза плодовых культур *Pseudomonas syringae* van Hall / М. В. Маслова // Приоритетные направления развития садоводства : I Потаповские чтения. – 2019. – С. 122-125.
2. *Pseudomonas syringae* в агрофитоценозе пшеницы / Л. А. Пасичник, Е. А. Савенко, Л. Н. Буценко, В. Ф. Патыка // Наука и Мир. – 2014. – Т. 1, № 4. – С. 52-56.
3. Здоровенко, Г. М. Особенности состава, строения и биологические свойства липополисахаридов из различных штаммов *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* / Г. М. Здоровенко, Е. Л. Здоровенко, Л. Д. Варбанец // Микробиология. – 2007. – Т. 76, №. 6. – С. 774-789.
4. Козаева, М. И. Влияние токсинов эндофитной бактерии *Pseudomonas syringae* на различные по устойчивости сорта и формы земляники / М. И. Козаева // Colloquium-journal. – Голопристанський міськрайонний центр зайнятості= Голопристанский районный центр занятости, 2019. – № 6-3. – С. 22-23.
5. Джаймурзина, А. А. Чувствительность фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora* и *Pseudomonas syringae* к медьсодержащим фунгицидам / А. А. Джаймурзина, М. М. Исин, Ж. З. Умиралиева // Защита картофеля. – 2014. – № 2. – С. 33-35.

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

7. 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.

8. 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.

9. Cornelis, Pierre. *Pseudomonas*: Genomic and Molecular Biology / Pierre Cornelis // Norfolk, UK. – 2008. – P. 1–19.

10. Хусейн, А. С. ПЦР-идентификация бактерий рода *Pseudomonas* / А. С. Хусейн, А. А. Налбандян, Г. А. Селиванова // Научно-практический журнал. – 2017. – С. 20.

11. The application of polymerase chain reaction for characterizing strains of *Pseudomonas syringae* isolated from New Zealand rivers / J. Van Neste, D. Cornish, J. Yu, C. Morris // Plant Diseases. – 2009. – Vol. 62. – P. 256–261.

12. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – Springer. - 2001. – Vol. 3. – 1450 p.

13. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – Springer. - 2005. – Vol. 2. – 1106 p.

14. Bergey's Manual of Systematic

Bacteriology – Springer. - 2007. – Vol. 2. – 1136 p.

15. Бактериофаги *Bacillus subtilis*: выделение и изучение свойств / Н. А. Феоктистова, Д. А. Васильев, Д. Д. Хусаинова, Е. В. Сайгушева, Г. З. Балтаева, М. И. Сулейманова // Актуальные проблемы аграрной науки: состояние и тенденции развития: материалы Национальной научно-практической конференции. - 2019. - С. 153-156.

16. 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.

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

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

19. Krzysztof, K. *Kosakonia cowanii* 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.

20. 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.

## DEVELOPMENT OF ISOLATION SCHEME AND BACTERIOLOGICAL IDENTIFICATION OF PSEUDOMONAS SYRINGAE BACTERIA AND ITS APPROBATION

Feoktistova N. A.<sup>1</sup>, Bekkalieva A. K.<sup>2</sup>, Vasiliev D. A.<sup>1</sup>, Suldina E. V.<sup>1</sup>  
1FSBEI HE Ulyanovsk SAU

2NJSC West Kazakhstan Agrarian Technical University named after Zhangir Khan

<sup>1</sup>432017, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1; 8 (8422) 55-95-47; e-mail: feokna@yandex.ru

<sup>2</sup>090009, Republic of Kazakhstan, Uralsk, Zhangir Khan street, 51; 8 (7112) 501374; aidyn\_kanatovna@mail.ru

*Key words:* bacteriological scheme, *Pseudomonas syringae*, bacteriosis, properties, culture, identification

The article presents results of studies on development of isolation scheme and bacteriological identification of *Pseudomonas syringae* bacteria and its approbation. The introduction of the article describes the objects of *Pseudomonas syringae* contamination - fruit trees and shrubs, agricultural plants, which proves the relevance of the research in the field of expanding of laboratory methods for identifying phytopathogenic microorganisms. The author's bacteriological scheme includes the use of King B Medium (*Pseudomonas* F Agar; Pronadisa 1532) as a selective medium. Initially, the isolated bacteria are differentiated to *Pseudomonas* genus, the following parameters are studied: anaerobic fermentation, production of enzymes catalase, lecithinase, lipase; hydrolysis of starch and gelatin; fermentation of glucose and lactose, also, a test for maceration is put. The second stage of the research includes the study of the growth of bacterial cultures on meat-and-peptone agar at 41 °C and at 5% of NaCl; oxidase production, arginine hydrolase; fermentation of mannose and sorbitol; formation of levan, hydrogen sulfide and indole, esculin, a hypersensitivity reaction is set. The determined parameters allow to type the representatives of the genus to *Pseudomonas syringae* species within 192 hours. During the research, a collection of 12 strains of *Pseudomonas syringae* bacteria was formed, isolated from 97 objects of phytosanitary supervision and identified according to the developed technique. The proposed bacteriological scheme allows to differentiate the above microorganisms on the basis of the analysis of 25 parameters. The application of a phage biological product as a diagnosticum (according to the Otto method) expands the spectrum of the analyzed biological properties of the isolated and identified *Pseudomonas syringae* bacteria.

*Bibliography:*

1. Maslova, M.V. Resistance of rootstock forms and varieties of apple to toxins of the causative agent of bacterial necrosis of fruit crops *Pseudomonas syringae* van Hall / M.V. Maslova // Priority directions of gardening development: I Potapov's readings. - 2019. - P. 122-125.

2. *Pseudomonas syringae* in wheat agrophytocenosis / L. A. Pasichnik, E. A. Savenko, L. N. Butsenko, V. F. Patyka // Science and World. - 2014. - Vol. 1, № 4. - P. 52-56.



3. Zdorovenko, G.M. Features of composition, structure and biological properties of lipopolysaccharides from various strains of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* / G. M. Zdorovenko, E. L. Zdorovenko, L. D. Varbanets // *Microbiology*. - 2007. - Vol. 76, № 6. - P. 774-789.
4. Kozaeva, M.I. Influence of toxins of endophytic *Pseudomonas syringae* bacterium on different varieties and forms of strawberries / M.I. Kozaeva // *Colloquium-journal*. - Holopristsansky regional employment center, 2019. - № 6-3. - P. 22-23.
5. Dzhaimurzina, A.A. Sensitivity of phytopathogenic *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae* bacteria to copper-containing fungicides / A.A. Dzhaimurzina, M.M. Isin, Zh. Z. Umiraliyeva // *Potato protection*. - 2014. - № 2. - P. 33-35.
6. Bacterial diseases of cabbage and measures to combat them: guidelines / edited by V. A. Pavlyushin. - St. Petersburg, 2004. - 56 p.
7. Bacterial diseases of sunflower / S. G. Borodin, I. A. Kotlyarova, G. A. Tereshchenko, N. V. Pashayan // *Oil crops*. - 2012. - No. 1 (150). - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/bakterialnye-bolezni-podsolnechnika> - date of access: 05.05.2020.
8. 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.
9. Cornelis, Pierre. *Pseudomonas: Genomic and Molecular Biology* / Pierre Cornelis // Norfolk, UK. - 2008. - P. 1–19.
10. Khussein, A.S. PCR identification of *Pseudomonas* genus bacteria / A.S. Khussein, A.A. Nalbandyan, G.A. Selivanova // *Scientific and practical journal*. - 2017. - P. 20.
11. The application of polymerase chain reaction for characterizing strains of *Pseudomonas syringae* isolated from New Zealand rivers / J. Vanneste, D. Cornish, J. Yu, C. Morris // *Plant Diseases*. - 2009. - Vol. 62. - P. 256–261.
12. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* - Springer. - 2001. - Vol. 3. - 1450 p.
13. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* - Springer. - 2005. - Vol. 2. - 1106 p.
14. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* - Springer. - 2007. - Vol. 2. - 1136 p.
15. *Bacillus subtilis* bacteriophages: isolation and study of properties / N. A. Feoktistova, D. A. Vasiliev, D. D. Khusainova, E. V. Saygusheva, G. Z. Baltaeva, M. I. Suleimanova // *Current problems of agricultural science: state and development trends: materials of National Scientific and Practical Conference*. - 2019. - P. 153-156.
16. 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.
17. The relationship of host range, physiology, and genotype to virulence on cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from cantaloupe blight epidemics in France / C. E. Morris [et al.] // *Phytopathology*. - 2000. - Vol. 90. - P. 636-646.
18. Patyka, V. P. Phytopathogenic bacteria in contemporary agriculture / V. P. Patyka // *Microbiological journal*. - 2016. - № 78 (6). - P. 71-83.
19. Krzysztof, K. *Kosakonia cowanii* as the New Bacterial Pathogen Affecting Soybean (*Glycine max* Willd.) / K. Krzysztof, B. F. Natasza // *European Journal of Plant Pathology*. - 2020. - Vol. 157, № 1. - P. 173-183.
20. 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.