DOI 10.33952/2542-0720-2020-2-22-134-142
УДК 579.22

Рыскалиева Б. Ж., Васильев Д. А., Феоктистова Н. А., Ляшенко Е. А.

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина»

Реферат. *Бактерии Pectobacterium carotovorum – факультативные патогены, штаммы которых вызывают заболевания различных видов растений, во многих случаях нанося большой экономический ущерб. Цель исследований – разработать бактериологическую схему выделения из объектов фитосанитарного надзора и идентификации фитопатогенных бактерий Pectobacterium carotovorum. Экспериментальные работы выполняли в ФГБОУ ВО «Ульяновский ГАУ имени П. А. Столыпина» в 2017–2019 гг. В качестве тестовых компонентов разрабатываемого алгоритма идентификации использованы данные, представленные в справочнике «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria». Изучение биологических свойств бактерии вида Pectobacterium carotovorum проводили классическими методиками. Модельными микроорганизмами для подбора параметров исследований и бактериологических тестов были референс-штаммы Pectobacterium carotovorum B-3455, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов, и Pectobacterium carotovorum 333 из коллекции музея НИИЦМиБ Ульяновского ГАУ. В исследованиях использованы пробы почвы, вода открытых водоемов, сточные воды, растительные остатки с признаками поражения мягкой гнилью. Из 123 проб объектов фитосанитарного надзора и окружающей среды выделено 14 штаммов, которые отнесены к Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum. Полученные результаты исследований по изучению биологических свойств выделенных нами бактерий в основном не расходятся с данными референс-штаммов. На основании разработанной бактериологической схемы идентификации бактерий Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum, включающей 27 показателей, выделено 14 штаммов, типированных как Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum. Установлено, что в течение 168 часов, применяя разработанную схему выделения и бактериологической идентификации бактерий Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum, можно на основании 27 тестов типировать вышеназванные бактерии.*

Ключевые слова: *Pectobacterium carotovorum, бактериологическая схема, признак, тест, идентификация, бактерии, проба.*

Введение

Ожидается, что к 2050 г. численность населения Земли достигнет 9,6 млрд человек, что приведет к увеличению спроса на продукты питания. Предполагается, что для удовлетворения этих потребностей мировое предложение продовольствия может возрасти на 70 %. Подсчитано, что по меньшей мере 10 % мирового производства продовольствия теряется из-за болезней растений. Бактерии рода *Pectobacterium* – важные фитопатогены, имеющие широкий спектр хозяев и глобальное распространение [1]. По данным научных исследований, любое растение может поражать несколько патогенов: *Pectobacterium, Pseudomonas, Xanthomonas, Clavibacterium, Erwinia, Bacillus* и др. [2].

Фитопатогенные бактерии *Pectobacterium spp.* семейства Pectobacteriaceae – грамотрицательные, пектинолитические, некротрофные бактериальные патогены растений, вызывающие мягкую гниль, черную ножку и стеблевое увядание, что приводит к значительным экономическим потерям во всем мире [3–7]. Бактерии рода

Pectobacterium продуцируют ферменты, разрушающие клеточную стенку и вызывающие мацерирование растительной ткани [8].

По данным комиссии ООН в вопросах продовольствия и сельского хозяйства доля бактериальных болезней в среднегодовых потерях урожая сельскохозяйственных культур составляет около 30 %. Род *Pectobacterium* включает 11 видов, обладающих схожими физиологическими и генетическими признаками. Из-за отсутствия эффективных химических и агротехнических мер борьбы с бактериозами и недостатка устойчивых сортов, ранняя диагностика бактериального заражения семян и посадочного материала является ключевым способом снижения вредоносности заболеваний [9].

Мягкие гнили, возбудителями которых являются бактерии вида *Pectobacterium carotovorum* (*Pca*), ранее известные как *Erwinia carotovora subsp. carotovora* [10, 11], развиваются в поле на участках с избыточной влажностью. При этом следует отметить, что наибольший ущерб возбудители мягкой гнили причиняют в период хранения картофеля, что обусловлено его неправильным режимом: недостаточной вентиляцией, влажностью выше 90 % и температурой воздуха выше 15–18 °С [12]. Из *Pectobacterium spp.* опасными для картофеля являются подвиды *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* и *Pectobacterium carotovorum subsp. brasileinsis* [13].

Бактерии рода *Pectobacterium*, которых традиционно считали причиной гнилостного повреждения картофеля, остаются наиболее распространенными патогенами и в настоящее время. Заболевания картофеля, вызванные возбудителями данного вида, обнаружены в ряде областей России [14, 15].

Диагностика и идентификация патогенов важны в медицине, во многих отраслях сельского хозяйства (растениеводстве, животноводстве и ветеринарии), при контроле за состоянием окружающей среды. Основной метод осуществления контроля – высокоспецифичная, эффективная диагностика и идентификация фитопатогенов [16, 17].

Основные факторы патогенности – экзоферменты, разрушающие компоненты клеточной стенки растительной клетки (пектиназы, целлюлазы, протеазы) [18].

Немаловажное значение для современного состояния сельского хозяйства имеет отрасль микробиологии, непосредственно занимающаяся методами индикации, идентификации и профилактики фитопатологий, вызванных патогенными для растительной ткани видами бактерии. В связи с существующими сложностями микробиологической дифференциации представителей рода *Erwinia* становится очевидной необходимость разработки современных схем бактериологической индикации и идентификации фитопатогенных эрвиний [19].

Цель исследований – разработать бактериологическую схему выделения из объектов фитосанитарного надзора и идентификации бактерий *Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum.*

Материалы и методы исследований

Экспериментальные работы выполняли в ФГБОУ ВО «Ульяновский ГАУ имени П. А. Столыпина» в 2016–2019 гг. В качестве тестовых компонентов разрабатываемого алгоритма идентификации были использованы данные, представленные в справочнике «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» (2015) [20]. Изучение биологических свойств проводили классическими методиками [21–23]. Модельными микроорганизмами для подбора параметров исследований и бактериологических тестов были референс-штаммы *Pectobacterium carotovorum* В-3455, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов и *Pectobacterium carotovorum* 333 из коллекции музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВО «Ульяновский ГАУ имени П. А. Столыпина». В исследованиях использованы 123 пробы с объектов фитосанитарного надзора и окружающей среды, из которых 56 – пробы почвы, семь – воды открытых водоемов и сточных вод, 60 – растительных остатков с признаками поражения мягкой гнилью.

Питательные среды: питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-бульон), питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар), SL-CVP$_{AG366}$ (agdia bioforbs); среда Кинг В; набор реагентов для окраски микроорганизмов по методу Грама (Микро-ГРАМ-НИЦФ, ООО«НИЦФ», РФ); полужидкая среда для определения подвижности, индола и орнитиндекарбоксилазы, питательный желатин, оксидазные диски («HiMedia», Индия); перекись водорода 3 % (ООО «Росбио»); цитратный агар Симмонса (ФГУП «НПО Микроген», РФ); среды Гисса с сорбитом, сахарозой, лактозой, раффинозой, рамнозой, мальтозой (ООО «Биотехновация», РФ); среда Гисса с трегалозой; диски с эритромицином, 15 мкг (ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»); пептон ферментативный (пгт. Оболенск); среда для O/F теста, среда Кларка, яично-желточная плотная среда; K_2HPO_4 (безв.), $MgSO_4 \times 7H_2O$, NaCl, K_2HP0_4, бромтимоловый синий, 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид, натрий хлористый (УлХИМ); стерильное вазелиновое масло; обезжиренное молоко; глицерин.

Результаты и их обсуждение

При разработке схемы выделения и бактериологической идентификации микроорганизмов важно подобрать селективную среду, характерный рост на которой мог бы стать первичным дифференциальным показателем. С этой целью проанализирован рост бактерий на следующих средах: SL-CVP$_{AG366}$, картофельный агар с 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом (ТТХ). Установлено, что среда с пектатом SL-CVP$_{AG-366}$ дает наилучший результат для выделения *Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum*, так как культуры образуют чашевидные углубления, вызывая разжижение пектата. По данным исследований M. C. M. Perombelon, J. M. Van Der Wolf (2002) при формировании полостей на среде CVP можно предположительно идентифицировать как наиболее распространённые бактерии мягкой гнили *Erwinia carotovora* [24].

Первый день. Подготовку проб осуществляли следующим образом: образцы суспендировали в стерильной воде в пропорции 1:10. Далее проводили посев на среду с пектатом SL-CVP$_{AG-366}$. Инкубировали при 28 °С 48–72 ч.

Третий день. На чашках отмечали чашевидные лунки, вызвавшие разжижение пектата. При отсутствии возможности провести отбор изолированных колоний, производили повторный высев. Одиночные серовато-светло-сиреневые колонии в чашевидных углублениях отвивали и пересевали в мясопептонный бульон.

Четвертый день. Окраска по Граму (грамотрицательные короткие палочки, прямые, с округлыми краями, одиночные, соединенные попарно).

Проводили посев на картофельный агар с 2,3,5-ТТХ, так как, кроме возбудителей мягких гнилей, размягчение тканей могут вызывать и некоторые другие пектолитические бактерии родов *Pseudomonas* и *Bacillus*. Учет проводили через 48 ч.

Тест на патогенность. Оптимальным вариантом проверки мацерирующей способности бактерий является метод с использованием растения-хозяина [25]. Поэтому изоляты проверяли на ломтиках картофеля на размягчение ткани. Время культивирования в термостате при 28 °С – 24–48 ч.

Далее осуществляли посев на следующие среды: среда Кинг В; чашки с мясопептонным агаром (для определения чувствительности к эритромицину, каталазной и оксидазной активности, роста при 37 °С и 40 °С); картофельный агар с генцианвиолетом; среда для определения подвижности, индола и орнитин-декарбоксилазы; яично-желточная среда; обезжиренное молоко; среда для O/F теста, среда Кларка, агар с 5 % хлористым натрием, питательный желатин; цитратный агар Симмонса; среды Гисса с сорбитом, сахарозой, лактозой, раффинозой, рамнозой, мальтозой, трегалозой.

Пятый день. Наблюдали размягчение тканей картофеля при прикосновении к картофельным дискам бактериологической петлей. На мясопептонном агаре бактерии

образовывали колонии округлой формы с ровными краями, бежево-кремового цвета, гладкие, блестящие, умеренно ослизненные, приподнятые.

Рост на среде Кинга В происходил без образования зеленого пигмента. На картофельном агаре с генцианвиолетом микроорганизмы образовывали блестящие, гладкие колонии серовато-белого цвета.

Подвижность, индол и орнитин декарбоксилазу определяли в полужидкой среде в одной пробирке. Микроорганизмы дают помутнение среды вокруг линии укола, что указывает на подвижность. При отрицательной реакции на орнитиндекарбоксилазу среда выглядит желтой или имеет лиловую полоску в верхней части столбика, что мы и наблюдали в ходе исследования.

При определении каталазы каплю перекиси водорода (3 % раствор) наносили на колонии. О присутствии каталазы свидетельствовали пузырьки водорода.

При определении оксидазы микробную колонию растирали по оксидазному диску. Учет реакции вели в течение 5–10 секунд при 25–30 °С. Отсутствие изменения цвета на диске или развитие окраски через 60 и более секунд расценивали, как отрицательную реакцию.

Исследуемые культуры дали положительную реакцию при определении казеиназы, об этом судили по сгусткам казеина, то есть произошло свертывание среды.

По результатам отношения исследуемых культур к температурам отмечали следующие данные: при 37 °С рост был замедленным, а рост при 40 °С вовсе отсутствовал.

На цитратном агаре Симмонса наблюдали изменение цвета индикатора с зеленого на синий, что показывает использование цитрата в качестве источника углерода.

При определении чувствительности к эритромицину регистрировали рост бактерии вокруг дисков, пропитанных антибиотиком эритромицином.

При посеве на агар с яичным желтком появление зоны просветления в толще агара и формирование на поверхности среды небольшого ореола, отливающего металлическим блеском, свидетельствует о положительной реакции. В нашем случае цвет среды вокруг колонии не изменился, то есть, реакция отрицательная.

Шестой день. Темно-красные колонии наблюдали на картофельном агаре с 2,3,5-ТТХ. При добавлении реактива Ковача получили отрицательную реакцию на наличие индола. В процессе роста культуры в питательном желатине наблюдали разжижение столбика желатина. При определении устойчивости к хлористому натрию регистрировали рост исследуемых микроорганизмов.

При определении окислительного или ферментативного образования кислоты из углеводов исследуемые микроорганизмы сеяли уколом в две пробирки параллельно. Одну пробирку заливали стерильным вазелиновым маслом. Исследуемые микроорганизмы образовали кислоту в обеих пробирках, об этом судили по изменению окраски индикатора. При выявлении сахаролитических свойств бактерий результаты учитывали через 1, 2, 3 суток, отмечая визуально кислотообразование.

Седьмой день. Определение образования кислоты из глюкозы (тест с метиловым красным или MR-тест) определяли в среде Кларка. В результате расщепления глюкозы в среде с исследуемыми культурами произошло кислотообразование, выявленное с помощью индикатора метилового красного, имеющего красное окрашивание.

Полученные результаты исследований по изучению биологических свойств выделенных бактерий не расходятся с данными референс-штаммов *Pectobacterium carotovorum B-3455* и *Pectobacterium carotovorum 333* (таблица 1).

Таблица 1 – Сводные данные об основных свойствах бактерий *Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum*

Характеристика	Основные свойства бактерий по “Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria”		Результат исследований 14 штаммов	
	Pectobacterium carotovorum B-3455	*Pectobacterium carotovorum 333*	+	–
Картофельный агар с 2,3,5-ТТХ	+	+	14	
Образование пигмента на Кинг В	–	–		14
Рост на средеSLCVP$_{AG366}$	+	+	14	
Проверка фитопатогенности	+	+	14	
Окраска по Граму	Гр-	Гр-		14
Орнитиндекарбоксилаза	–	–		14
Индол	–	–		14
Подвижность	+	+	14	
O/F тест	F	F	14F	
Рост при 40 °С	–	–		14
Чувствительность к эритромицину	–	–		14
Оксидаза	–	–		14
Каталаза	+	+	14	
Лецитиназа	–	–		14
Желатиназа	+	+	14	
Рост при 5 % NaCL	–	–		14
Рост при 37 °С	+	+	14	
Цитрат Симмонса	+	+	14	
Казеиназа	+	+	14	
Метиловый красный	+	+	14	
Образование кислот из:				
Сорбита	–	–		14
Сахарозы	+	+	14	
Лактозы	+	+	14	
Рафинозы	+	+	14	
Рамнозы	+	+	14	
Мальтозы	–	–		14
Трегалозы	+	+	14	

Примечание. «+» – положительный результат, «–» – отрицательный результат.

Схема выделения и бактериологическая идентификация фитопатогенных бактерий *Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum* показана на рисунке 1.

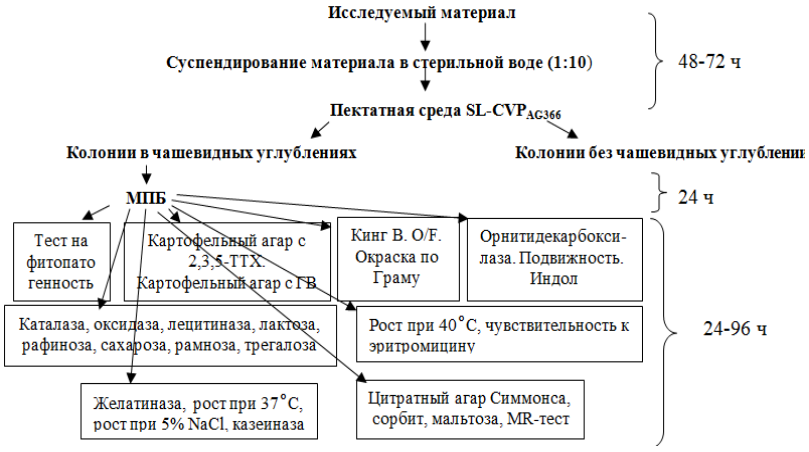

Рисунок 1 – Схема выделения и бактериологической идентификации фитопатогенных бактерий *Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum*, составленная на основании полученных результатов исследований

Выводы

Представлена авторская схема выделения и бактериологической идентификации фитопатогенных бактерий *Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum*. Из 123 проб объектов фитосанитарного надзора и окружающей среды на основании разработанной бактериологической схемы идентификации бактерий *Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum* выделено 14 штаммов. Полученные результаты исследований по изучению биологических свойств не расходятся с данными референс-штаммов.

Установлено, что в течение 168 часов, применяя разработанную схему, на основании 27 тестов можно типировать вышеназванные бактерии.

Исследования проводили в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполненных ФГБОУ «ВО Ульяновский ГАУ» по заданию МСХ РФ в 2018 г.

Литература

1. Buttimer C., McAuliffe O., Ross R. P., Hill C., Jim O., Coffey A. Bacteriophages and bacterial plant diseases // Frontiers in microbiology. 2018. Vol. 8. P. 34.
2. Лазарев А. М. Перечень научных литературных источников по исследованию бактериозов растений и биологических свойств их возбудителей. Санкт- Петербург: ВИР, 2019. 28 с.
3. Li X., Ma Y., Liang S., Tian Y., Yin S., Xie S., Xie H. Comparative genomics of 84 *Pectobacterium* genomes reveals the variations related to a pathogenic lifestyle // BMC genomics. 2018. Vol. 19. P. 889.
4. Charkowski A. O. Biology and control of *Pectobacterium* in potato // American Journal of Potato Research. 2015. Vol. 92. No. 2. P. 223–229.
5. Yasuhara-Bell J., Marrero G., Arif M., de Silva A., Alvarez A. M. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Dickeya* spp. // Phytopathology. 2017. Vol. 107. No. 11. P. 1339–1345.
6. Charkowski A. O. The changing face of bacterial soft-rot diseases // Annual review of phytopathology. 2018. Vol. 56. P. 269–288.
7. Bellieny-Rabelo D., Tanui C. K., Miguel N., Kwenda S., Shyntum D. Y., Moleleki L. N. Transcriptome and comparative genomics analyses reveal new functional insights on key determinants of pathogenesis and interbacterial competition in *Pectobacterium* and *Dickeya spp.* // Appl. Environ. Microbiol. 2019. Vol. 85. No. 2. Art. No. e02050-18. DOI: 10.1128/AEM.02050-18.
8. Lim J. A., Heu S., Park J., Roh E. Genomic characterization of bacteriophage vB_PcaP_PP2 infecting *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, a new member of a proposed genus in the subfamily Autographivirinae // Archives of virology. 2017. Vol. 162. No. 8. P. 2441–2444.
9. Фальковская У. В. Сидоренко А. В., Новик Г. И. Генетическая характеристика фитопатогенных бактерий из фонда Белорусской коллекций непатогенных микроорганизмов // Сборник трудов Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы». Саратов: Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова, 2014. С. 81–85.
10. Hauben L., Moore E. R., Vauterin L., Steenackers M., Mergaert J., Verdonck L., Swings J. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae* // Syst. Appl. Microbiol. 1998. Vol. 3. P. 384–397.
11. Gardan L., Cecile G., Christen R., Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. // International J. of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2003. Vol. 53. P. 381–391.
12. Иванюк В. Г., Ерчик В. М., Райко А. М. Бактериальные гнили клубней картофеля при хранении // Сборник научных трудов конференции «Сельское хозяйство – проблемы и перспективы». Т. 4. Ч. 1. Гродно: Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Учреждение Образования «Гродненский государственный аграрный университет», 2005. С. 287–290.
13. Ерохова М. Д. «Черная ножка» и бактериальная мягкая гниль картофеля: факты и новейшие сведения // Защита картофеля. 2016. № 2. С. 31–33.
14. Комар Е. И., Шавель М. И. Штаммы *Pectobacterium*, вызывающие гнили картофеля в Беларуси // Сборник работ 70-ой научной конференции студентов и аспирантов Белорусского государственного университета. Ч. 1. Минск: Белорусский государственный университет, 2013. С. 21–25.

[Электронный ресурс]. Режим доступа: http://elib.bsu.by/bitstream/123456789/95088/1/21-25.pdf (дата обращения 01.12.2019).

15. Черпаков В. В. Этиология бактериальной водянки древесных растений // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2017. № 220. С. 125–139.

16. Рязанцев Д. Ю., Абрамов Д. Д., Завриев С. К. Диагностика карантинных фитопатогенов методом ПЦР в формате flash // Сельскохозяйственная биология. 2009. № 3. С.14–17.

17. Карлов А. Н. Диагностика черной ножки картофеля, вызываемой бактериями рода *Dickeya* и генетический полиморфизм штаммов возбудителей. Автореф. дисс. … канд. биол. наук. М.: Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева, 2011. 22 с.

18. Скобляков С. А., Дементей А. Ю., Мямин В. Е, Песнякевич А. Г. Направленная инактивация детерминант потенциальных факторов патогенности *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://lomonosovmsu.Ru/archive/Lomonosov_2007/02/skobliakov sergey@mail.ru.doc.pdf (дата обращения 03.07.2019).

19. Мастиленко А. В., Черных А. А., Молофеева Н. И. Васильев Д. А. Изучение культуральных свойств бактерий *Erwinia herbicola* // Сборник трудов Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения». Ульяновск: Ульяновский ГАУ, 2013. С. 203–205.

20. Whitman W. B. Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria. Iss. 410. Hoboken, NJ: Wiley, 2015. P. 1–24.

21. Лабинская А. С., Блинкова Л. П., Ещина А. С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследовании. М.: Медицина, 2004. 576 с.

22. Bradbury J. F. Guide to plant pathogenic bacteria. Wallingford, UK: CABI, 1986. 99 p.

23. Бельтюкова К. И., Матышевская М. С., Куликовская М. Д., Сидоренко С. С. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений. К.: Наукова думка, 1968. 316 с.

24. Perombelon M. C. M., Van Der Wolf J. M. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual // Scottish crop research institute annual report. 2002. Vol. 10. P. 17–22.

25. Желдакова Р. А., Мямин В. Е. Фитопатогенные микроорганизмы. Минск: БГУ, 2006. 88 с.

References

1. Buttimer C., McAuliffe O., Ross R.P., Hill C., Jim O., Coffey A. Bacteriophages and bacterial plant diseases // Frontiers in microbiology. 2018. Vol. 8. P. 34.

2. Lazarev A. M. List of literary information on the study of bacterioses of plants and of the biological properties of their pathogens. Saint-Petersburg, VIR, 2019. 28 p.

3. Li X., Ma Y., Liang S., Tian Y., Yin S., Xie S., Xie H. Comparative genomics of 84 *Pectobacterium* genomes reveals the variations related to a pathogenic lifestyle // BMC genomics. 2018. Vol. 19. P. 889.

4. Charkowski A. O. Biology and control of *Pectobacterium* in potato // American Journal of Potato Research. 2015. Vol. 92. No. 2. P. 223–229.

5. Yasuhara-Bell J., Marrero G., Arif M., de Silva A., Alvarez A. M. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Dickeya* spp. // Phytopathology. 2017. Vol. 107. No. 11. P. 1339–1345.

6. Charkowski A. O. The changing face of bacterial soft-rot diseases // Annual review of phytopathology. 2018. Vol. 56. P. 269–288.

7. Bellieny-Rabelo D., Tanui C. K., Miguel N., Kwenda S., Shyntum D. Y., Moleleki L. N. Transcriptome and comparative genomics analyses reveal new functional insights on key determinants of pathogenesis and interbacterial competition in *Pectobacterium* and *Dickeya spp.* // Appl. Environ. Microbiol. 2019. Vol. 85. No. 2. Art. No. e02050-18. DOI: 10.1128/AEM.02050-18.

8. Lim J. A., Heu S., Park J., Roh E. Genomic characterization of bacteriophage vB_PcaP_PP2 infecting *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, a new member of a proposed genus in the subfamily Autographivirinae // Archives of virology. 2017. Vol. 162. No. 8. P. 2441–2444.

9. Falkovskaya U. V. Sidorenko A. V., Novik G. I. Genetic characteristics of phytopathogenic bacteria from the collection of the Belarusian collections of non-pathogenic microorganisms // Proceedings of the International scientific-practical conference "Biotechnology: reality and prospects". Saratov: Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov. 2014. P. 81–85.

10. Hauben L., Moore E. R., Vauterin L., Steenackers M., Mergaert J., Verdonck L., Swings J. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae* // Syst. Appl. Microbiol. 1998. Vol. 3. P. 384–397.

11. Gardan L., Cecile G., Christen R., Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov.

and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. // International J. of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2003. Vol. 53. P. 381–391.

12. Ivanyuk V. G., Yerchik V. M., Raiko A. M. Bacterial rot of potato tubers during storage // Proceedings of conference "Agriculture - Problems and Prospects". Vol. 4. Part 1. Grodno: Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus, Grodno State Agrarian University. 2005. P. 287–290.

13. Erokhova M. D. "Black leg" and bacterial soft rot of potatoes: facts and the latest information // Zashchita kartofelya. 2016. No. 2. P. 31–33.

14. Komar E. I., Shavel M. I. *Pectobacterium* strains causing rot of potatoes in Belarus // Proceedings of the 70th scientific conference of undergraduate and graduate students of Belarusian State University. Part 1. Minsk: Belarusian State University, 2013. P. 21–25. [Electronic resource]. Access point: http://elib.bsu.by/bitstream/123456789/95088/1/21-25.pdf (reference's date 01.12.2019).

15. Cherpakov V. V. Etiology of bacterial dropsy of woody plants // Proceedings of the Saint Petersburg forestry Academy. 2017. No. 220. P. 125–139.

16. Ryazantsev D. Yu., Abramov D. D., Zavriev S. K. Diagnosis of quarantine phytopathogens by the PCR method in the flash format // Sel'skokhozyaistvennaya Biologia [Agricultural Biology]. 2009. No. 3. P. 114–117.

17. Karlov A. N. Diagnostics of the black leg of potatoes caused by bacteria of the genus *Dickeya* and genetic polymorphism of pathogen strains. Author's abstract diss. … Cand. Sc. (Biol.). Moscow: Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 2011. 22 p.

18. Skoblyakov S. A., DementeyA. Yu., Myamin V. E., Pesnyakevich A. G. Targeted inactivation of the determinants of potential pathogenicity factors *Erwinia carotovora subsp. atroseptica*. [Electronic resource]. Access point: https://lomonosovmsu.Ru/archive/ Lomonosov_2007/02/skobliakovsergey@mail.ru. doc.pdf (reference's date 03.07.2019).

19. Mastilenko A. V., Chernykh A. A., Molofeeva N. I., Vasiliev D. A. Study of the cultural properties of *Erwinia herbicola* bacteria // Proceedings of the international scientific and practical conference "Agricultural science and education at the present stage of development: experience, problems and solutions". Ulyanovsk: Ulyanovsk State Agrarian University named after P. A. Stolypin, 2013. P. 203–205.

20. Whitman W. B. Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria. Hoboken, NJ: Wiley, 2015. T. 410. P. 1–24.

21. Labinskaya A. S., Blinkova L. P., Yeshchina A. S. General and sanitary microbiology with the technique of microbiological research. Moscow: Meditsina, 2004. 576 p.

22. Bradbury J. F. Guide to plant pathogenic bacteria. Wallingford, UK: CABI, 1986. 99 p.

23. Beltyukova K. I., Matyshevskaya M. S., Kulikovskaya M. D., Sidorenko S. S. Research methods for pathogens of bacterial diseases of plants. Kiev: Naukova Dumka, 1968. 316 p.

24. Perombelon M. C. M., Van Der Wolf J. M. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual // Scottish crop research institute annual report. 2002. Vol. 10. P. 17–22.

25. Zheldakova R. A., Myamin V. E. Phytopathogenic microorganisms. Minsk: BSU, 2006. 88 p.

UDC 579.22

Ryskaliyeva B. Zh., Vasilyev D. A., Feoktistova N. A., Lyashenko E. A.

DEVELOPMENT AND TESTING OF THE BACTERIOLOGICAL SCHEME OF IDENTIFICATION OF BACTERIA *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

Summary. *Bacteria Pectobacterium carotovorum are optional pathogens, strains of which cause diseases of various plant species and, therefore, large economic losses. The purpose of the research was to develop a bacteriological scheme for isolating phytopathogenic bacteria Pectobacterium carotovorum from the objects of phytosanitary surveillance and identification. The experimental work was carried out at the FSBEI HE "Ulyanovsk State Agrarian University named after P. A. Stolypin" in 2017–2019. Data presented in the reference book "Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria" were used as test components of the developed identification algorithm. We studied biological properties of bacteria of the species Pectobacterium carotovorum by classical methods. Reference strains Pectobacterium carotovorum B-3455 obtained from the All-Russian Collection of Microorganisms and Pectobacterium carotovorum 333 from the collection of the museum of the Research Institute of Microbiology of the Ulyanovsk State Agrarian University named after P. A. Stolypin were model microorganisms for the*

selecting research parameters and bacteriological tests. Soil samples, water from open reservoirs, waste water, plant residues with signs of soft rot damage were used in our studies. From 123 samples of phytosanitary surveillance objects and the environment, we identified 14 strains that were assigned to Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum. Obtained research results basically do not differ from the data of reference strains. Based on the developed bacteriological scheme of identification of bacteria Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum, including 27 indicators, we isolated 14 strains typed as Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum. It was found that within 168 hours, using the developed scheme for the isolation and bacteriological identification of bacteria Pectobacterium carotovorum spp. carotovorum, it is possible to type the abovementioned bacteria on the basis of 27 tests. However, the duration and material consumption of studies do not allow us to argue that this method is effective for routine research.

***Keywords**: Pectobacterium carotovorum, bacteriological scheme, symptom, test, identification, bacteria, sampling.*

Рыскалиева Балдай Жанайдаровна, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза» ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина»; 432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; e-mail: bryskalieva@mail.ru.

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»; ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина»; 432017; e-mail: dav_ul@mail.ru.

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза» ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина»; 432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец; e-mail: feokna@yandex.ru.

Ляшенко Елена Анатольевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза» ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина»; 432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец; e-mail: elena-l18@mail.ru.

Ryskaliyeva Balday Zhanaydarovna, graduate student of the Department of microbiology, virology, epizootology and veterinary sanitary expertise, Ulyanovsk State Agrarian University named after P. A. Stolypin; 1, Novy Venets boulevard, Ulyanovsk, 432017; e-mail: bryskalieva@mail.ru.

Vasilyev Dmitry Arkadievich, Dr. Sc. (Biol.), Professor of the Department of microbiology, virology, epizootology and veterinary sanitary expertise, Ulyanovsk State Agrarian University named after P. A. Stolypin; 1, Novy Venets boulevard, Ulyanovsk, 432017; e-mail: dav_ul@mail.ru.

Feoktistova Natalya Aleksandrovna, Cand. Sc. (Biol.), associate professor of the Department of microbiology, virology, epizootology and veterinary sanitary expertise, Ulyanovsk State Agrarian University named after P. A. Stolypin; 1, Novy Venets boulevard, Ulyanovsk, 432017; e-mail: feokna@yandex.ru.

Lyashenko Elena Anatolyevna, Cand. Sc. (Biol.), associate professor of the Department of microbiology, virology, epizootology and veterinary sanitary expertise, Ulyanovsk State Agrarian University named after P. A. Stolypin; 1, Novy Venets boulevard, Ulyanovsk, 432017; e-mail: elena-l18@mail.ru.

Дата поступления в редакцию – 15.02.2020.
Дата принятия к печати – 30.05.2020.