

УДК 579.695

## СХЕМА ВЫДЕЛЕНИЯ И ТИПИРОВАНИЯ *RALSTONIA SOLANACEARUM*

*К.В. Шокина, магистрант, 8(8422) 55-95-47, shokina-k93@mail.ru,  
П.С. Майоров, аспирант, 8(8422) 55-95-47, pavelmayorovv@yandex.ru,  
Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент,  
8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru,  
Саппаров К.Н., студент, 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru,  
Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,  
8(8422)55-95-47, dav\_ul@mail.ru  
ФГБОУ ВО УльяновскаяГСХА*

**Ключевые слова:** бактерия *Ralstonia solanacearum*, картофель, схема выделение бактерий, биохимические и бактериологические тесты, бурая гниль, идентификация

В данной статье рассмотрена схема выделения бактерий *Ralstonia solanacearum* и методы ее типирования с применением биохимических тестов. Установлено, что для исследований необходимо значительное количество расходных материалов и необходима модификация методики.

Картофель является популярной продовольственной культурой мира и занимает четвертое место по значимости после риса, пшеницы и кукурузы. Но темпы роста урожайности картофеля сталкиваются с определенными трудностями. Одной из них является заболевание - бактериальное увядание или бурая гниль. Вызывает данное заболевание «бурю гниль» *Ralstonia solanacearum*.

Микроорганизм *Ralstonia solanacearum* первоначально был описан Smith E.F.(1986) и известен ранее как *Pseudomonas solanacearum*. Указанный микроорганизм *Ralstonia solanacearum* поражает более 200 видов растений, принадлежащих к 53 различным ботаническим семействам, но наиболее чувствительны к патогену представители семейства пасленовых. Бактерия *Ralstonia solanacearum* широко распространена и приводит к бактериальному увяданию наиболее важных сельскохозяйственных культур в мире, таких как картофель, томаты, перец, баклажан и др. [1-2].

Потери урожая могут достигать 30-5% в зависимости от устойчивости сортов картофеля. При хранении потери могут превышать 40 процентов. Экономический ущерб в России от бурой гнили картофеля, вызываемой *Ralstonia solanacearum*, составляет 25,9 млрд. рублей.

Способность бактерий инфицировать большое количество хозяев затрудняет ее контроль. На сегодняшний день ни один метод контроля не является достаточно эффективным. Устойчивые сорта, полевая гигиена, севооборот и использование бактерицидов приносят лишь ограниченные успехи [3].

Цель настоящей работы состояла в сравнительном анализе идентификации микроорганизма *Ralstonia solanacearum* методами классических бактериологических тестов.

Методы изучения биологических свойств выделенных бактерий классические [4-8].

Клубни картофеля тщательно промывали водопроводной водой, а затем последовательно стерилизовали сначала 1% - ным раствором гипохлорита натрия, потом 70 % этанолом и обжигали над пламенем горелки. Клубни разрезали на небольшие кусочки, захватывая сосудистое кольцо, и помещали их в пробирки с питательной средой следующего состава: гидролизат казеина – 1 г, пептон – 10 г, глюкоза – 5 г, вода – 1 литр. Пробирки выдерживали в термостате 48 часов, после чего из них брали суспензию и высевали на среду Кельмана с ТТХ и на картофельный агар с генциан-виолетом.

Среди выросших колоний отбирали наиболее характерные колонии по внешнему виду: маслянистые, розово-красные с небольшими голубоватыми краями и инкубировали на отдельных чашках Петри со средой Кельмана в течение 24 часов.

Выделенные чистые культуры засевали на следующие рекомендуемые среды: скошенный мясо-пептонный агар, картофельный агар с генциан-виолетом, сахарозно-пептонную среду, среду с L-тирозином [5].

Штаммы чистых культур изучались по следующим признакам: окраска по Грамму и микроскопия, тест на подвижность, тест на гидролиз желатиназы, тест на каталазу, тест на оксидазу, выделение газа из глюкозы и лактозы, тест на уреазу, индолообразование, рост при 1 – 2 % концентрации соли, тест на гидролиз эскулина, изучалось производство флуоресцирующих пигментов, тест на активность аргинин дигидролазы, редуцирование нитрата, тест на липазу, тест на утилизацию натрия цитрата, тест на утилизацию фенилаланинацетата, тест на липазу, гидролиз твин-80, производство левана, среды Гисса с сахарами: адонит, салицин, изонит, маннит, сорбит, L-арабиноза, манноза, рамноза, мелибиоза, инулин, трегалоза, мальтоза, D-ксилоза, целлобиоза, глюкоза, лактоза, галактоза, фруктоза, тест на окисление 3-х % этанола и глицерина, выявление фенилаланиндезаниназы, высева на бульон с яичным желтком (таблица 1) [7, 8].

Таблица 1 – Биохимические свойства бактерии *Ralstonia solanacearum*

Биологические свойства	Результат	Биологические свойства	Результат
1. Наличие гранул поли- $\beta$ -гидроксibuтирата	+	21. Тесты с сахарами:	
2. Тест на оксидазу	+	1) Адонит	-
3. Тест на уреазу	+	2) Салицин	-
4. Гидролиз эскулина	-	3) Изонит	-
5. Гидролиз крахмала	-	4) Маннит	-
6. Рост при 40°C	-	5) Сорбит	-
7. Производство флуоресцирующих пигментов	-	6) L-Арабиноза	-
8. Активность каталазы	+	7) Манноза	+
9. Рост в 1% NaCl	+	8) Рамноза	-
10. Рост в 2% NaCl	-	9) Мелибиоза	-
11. Тест на активность аргинин дигидролазы	-	10) Инулин	-
12. Редуцирование нитрата	+	11) Трегалоза	+
13. Тест на липазу	-	12) Мальтоза	+
14. Определение подвижности	+	13) D-Ксилоза	-
15. Расжижение желатина	-	14) Целлобиоза	-
16. Тест на утилизацию натрия цитрата	+	15) Глюкоза	+
17. Образование индола	-	16) Лактоза	+
18. Тест на утилизацию фенилаланинацетата	-	17) Галактоза	-
19. Гидролиз твин-80	-	18) Фруктоза	+
20. Производство левана	-	22. Тест на окисление	
		-3% этанола	+
		- глицерина	+
		23. Выявление фенилаланиндезаниназы	-
		24. Реакция с яичным желтком	-

Анализ биологических свойств бактерий *Ralstonia solanacearum* (утилизация сахара, продуцирование оксидазы, каталазы, использование натрия цитрата в качестве источника углерода, образование коричневого пигмента, бактерии были подвижными и окрашивались по Грамму отрицательно и т.п.) показал, что для типирования применяется значительное количество реактивов и других расходных материалов. Это свидетельствует о том, что необходимо разработать новую систему идентификации вышеназванных бактерий, например при помощи бактериофагов. Работа будет иметь дальнейшие достижения, исследо-

вания и результаты по бактериологическому типированию изучаемых объектов и только совместное использование этих методов позволит поднять специфичность выявления данного возбудителя.

#### Библиографический список

1. Alka, Grover. Chakrabarti-Rapid Method for Isolation of PCR Amplifiable Genomic DNA of *Ralstonia solanacearum* Infested in Potato Tubers / Grover Alka, K. Swarup // *Advances in Microbiolog.* – 2012. - № 2. - P.441-446.
2. Hayward, A. C. Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum* / A.C. Hayward // *Annual Review of Phytopathology.* – 1991. - Vol.29. – P. 65-87.
3. Kelman, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium / A. Kelman // *Phytopathol.* – 1954. - № 44. – P. 693–695.
4. Smith, E.F. A bacterial disease of the tomato, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.) / E.F Smith // *Div. Veg. Phys. and Path.* – 2014. - Bul. 12. U. S. Dept. Agr. – P. 1896.
5. Васильев, Д.А. Методы общей бактериологии / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин. - Ульяновск, 2006. – 238с.
6. Желдакова, Р.А. Фитопатогенные микроорганизмы. Учебно-метод. пособ. / Р.А. Желдакова, В.Е. Мямин. – Минск: БГУ, 2006. - 116с.
7. Каримова, Е.В. Микроорганизмы, вызывающие карантинные для Российской Федерации бактериальные болезни растений / Е.В. Каримова, Ю.А. Шнейдер, В.Г. Заец [и др.] // *Вестник Российского университета дружбы народов. Агрономия и животноводство.* – 2013. - № 2. – С. 31-33.
8. Лазарев, А.М. Методы изучения бактериозов картофеля / А.М. Лазарев. - С.-Пб., 2001. - 27с.

## SCHEME OF ALLOCATION AND TYPING OF RALSTONIA SOLANACEARUM

*K. V. Shokina, P. S. Mayorov, N. A. Feoktistova, K. N. Sapparov, D. A. Vasilyev*

**Keywords:** *Ralstonia solanacearum* bacterium, potatoes, scheme allocation of bacteria, biochemical and bacteriological tests, brown decay, identification

*In this article the scheme of allocation of bacteria *Ralstonia solanacearum* and methods of its typing with application of biochemical tests is considered. It is established that researches require a significant amount of expendables and modification of a technique is necessary.*