

УДК 619:579.6

DOI 10.18286/1816-4501-2019-4-110-116

МАТЕРИАЛЫ К СОЗДАНИЮ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕСТ - СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДА *YERSINIA RUCKERI*

Воротников Антон Павлович, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

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

e-mail: dav_ul@mail.ru

Ключевые слова: *Yersinia ruckeri*, бактериологическая тест - система, идентификация, дифференциация.

В работе представлены результаты исследований по изучению базовых биологических свойств бактерий *Yersinia ruckeri* с последующим их отбором для создания бактериологической тест - системы по идентификации и дифференциации указанных микроорганизмов. Данная система необходима при проведении эпизоотологического мониторинга инфекции ERM (болезни красного рта) и при проведении ветеринарно - санитарной оценки пищевой продукции, получаемой в неблагополучных по данной инфекции рыбоводческих хозяйствах. Согласно результатам исследования, первоначально используя Иерсиния-агар совместно с агарами, содержащими лактозу в качестве источника углерода и инкубацию при низкой температуре (22° С), можно добиться приемлемого уровня специфичности данных по идентификации *Y. Ruckeri*. В ходе изучения сахаролитических свойств было установлено, что штаммы не ферментируют лактозу, сахарозу, дульцит, сорбит, но оказали ферментную активность на мальтозу, манит, и глюкозу. При изучении ферментной активности сделаны следующие выводы: штаммы не способны ферментировать малонат, но активно ферментируют лизин и мочевины. Реакцию на каталазу считаем положительной, на оксидазу - отрицательной. Полученные результаты актуальны для нашей страны, так как данный инфекционный агент и вызываемая им инфекция не входят в список существующих в РФ инфекционных нозоединиц.

Введение

Продукция рыбоводства остаётся одним из важнейших источников пищевого белка, жирных кислот, витаминов, минералов и необходимых микроэлементов для человеческого организма. Инфекционные болезни рыб с высокой летальностью являются значительным фактором, тормозящим как создание полноценного рациона в питании людей, так и значительным препятствием для развития экономики многих государств и народов. К настоящему времени описано около 25 бактериальных родов, обладающих вирулентными штаммами и представляющих опасность для жизнедеятельно-

сти морской и пресноводной рыбы [1]. В частности, из множества таксономических видов бактерий, патогенных для рыб, зарубежные исследователи отмечают как наиболее опасные 3 вида микроорганизмов, вызывающих заболевания, способные влиять на численность молоди рыб и, следовательно, популяций в целом. Это возбудители: фурункулеза — *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*, бактериальной почечной болезни — *Renibacterium salmoninarum* и болезни красного рта — *Yersinia ruckeri*. Желудочно-кишечная недостаточность (ERM, Иерсиниоз) является одним из наиболее значимых с этой точки зрения болезней [2-5].

Иерсиниоз или «красный рот» - хроническая болезнь, которая обычно вызывает стабильную летальность у инфицированных. Провоцировать данное заболевание, при наличии латентно скрытого возбудителя, может стресс, полученный при технологической обработке поголовья, дефицит кислорода в воде, изменении в неблагоприятную сторону (для жизнедеятельности рыб) других факторов внешней среды. Наиболее часто заражением микроорганизма *Y. ruckeri*, если он есть в «стаде», поражаются мальки, только что научившиеся принимать пищу. У рыбы, контаминированной *Y. ruckeri* и подвергнувшейся воздействию какого-либо стресс - фактора, болезнь переходит из латентной стадии в активную форму и вследствие этого показатель летальности возрастает до 75 % [6-8].

В нашей стране, по косвенным показателям, бактерия *Yersinia ruckeri* может инфицировать такие виды рыб, как: карп, сом, осетр, окунь и налим. Интересным фактом является то, что *Y. ruckeri* недавно был выделен как необычный микроорганизм при раневой инфекции у человека [9], а также из молока, сыра, курицы и фарша [10-15].

Тот факт, что *Yersinia ruckeri* была выделена из продуктов питания человека заставляет всерьез задуматься об изучении биологических особенностей культивирования, репродукции, особенностей развития и ареала распространения данного микроорганизма применительно к условиям природных регионов нашей страны.

Цель работы - изучение морфологических, тинкториальных, культуральных свойств *Yersinia ruckeri* по идентификации данного микроорганизма для целей изучения эпизоотологии заболевания и проведения ветеринарно-санитарной экспертизы продуктов питания человека и в целом создание базы для формирования бактериологической тест - системы по идентификации и дифференциации бактерий вида *Yersinia ruckeri*.

Объекты и методы исследований

Работы выполнялись на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы УлГАУ. В работе были использованы питательные среды: Нектоен (ректоеновый агар) (производство HiMedia Laboratories), ТСБС (тиосульфат-цитратный агар с сахарозой и желчью), VRBD (кристалльно-фиолетовый нейтрально-красный желчный декстрозный агар) (производство HiMedia Laboratories), XLD (Ксилозо-лизиновый дезоксихолатный агар) (производство HiMedia Laboratories), Висмут-сульфит агар) (производство HiMedia Laboratories), Иерсиния агар (производства Оболенск ФБУН ГНЦ ПМБ), Среда Кристенсена с мочевиной (Биотехновация), ПЖА 0,3%, среда лизин-контроль (производство HiMedia Laboratories), Сре-

да с лизином (производство HiMedia Laboratories), Среда с малонатом натрия (Биотехновация), Среда Симмонса, Среды Гисса : с глюкозой, с маннитом, с мальтозой, сорбитом, с дульцитом, с сахарозой, с лактозой; (Биотехновация) Эндо (Биотехновация), RVS (магниева среда Раппапорта-Вассилиадиса), бульон Мюллер Кауфман (производство HiMedia Laboratories), Забуферная-пептонная вода (Биотехновация), среда Кесслера (Биотехновация), бульон Кларка (производство HiMedia Laboratories). Дополнительные компоненты: 1% раствор тетраметил-р-фенилендиамин дигидрохлорид, индикатор метиловый красный, перекись водорода 3%, реагент А - приготовление: α -нафтол - 5 г, этиловый спирт (абсолютный) -100 мл., α -нафтол растворялся в небольшом объеме спирта а затем добавляли спирт до объема 100 мл (раствор должен быть почти бесцветным), раствор сохраняет стабильность 1 год, хранят в темной посуде при 2-8°C, реагент Б - КОН - 40 г, дистиллированная вода -100 мл, взвешивают КОН в мерной мензурке, добавляли немного воды и переносили мензурку в холодную водяную баню для предупреждения перегрева, после этого доводили объем до 100 мл, раствор сохраняет стабильность 1 год, хранили при комнатной температуре в полиэтиленовых или покрытых парафином стеклянных бутылках.

В исследованиях использовали штаммы: *Yersinia ruckeri*: № 58639, № 7957, № 46-123, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы УлГАУ. Инкубирование производилось при температуре 22°C в термостате ТСО-1/80. Все термостаты производства СКТБ-СПУ.

Результаты исследований

Показатели морфологии и тинкториальных свойств

Ввиду того, что клеточная стенка изучаемых штаммов не содержит магниево-соли рибонуклеиновой кислоты, с которой связана способность удерживать окраску, имеют внешнюю мембрану, препятствующую проникновению красителя внутрь клетки, все исследуемые штаммы показали себя как грамотрицательные палочки (рис. 1).

При изучении подвижности использовался 0,3% полужидкий агар, пробирки засеивали уколком, используя бактериологическую иглу. После 24ч инкубирования был отмечен диффузный рост в среде, что свидетельствует о подвижности исследуемых штаммов.

Ферментативные свойства. Результаты теста на наличие фермента каталазы. Реакцию ставили и на предметном стекле, петлей снимали бактериальную колонию и вносили в каплю перекиси водорода. Через 5 мин наблюдали за образова-

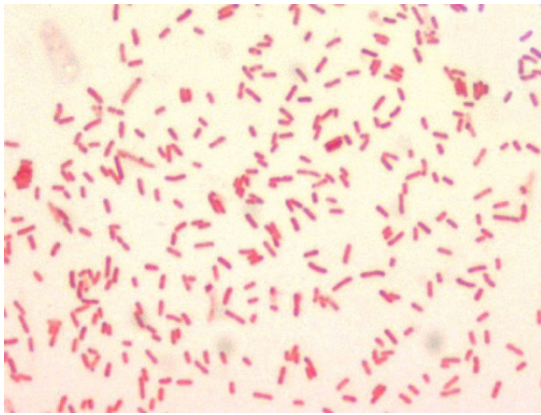


Рис. 1 - Микроскопическая картина клеток штамма *Yersinia ruckeri* № 58639, выращенные на МПА при 22 °С в течение 24 ч. (окраска по Граму; световой микроскоп Биомед 8 увеличение 1000 крат)

ем пузырьков, видно, что происходит разложение перекиси водорода, которое означает положительную реакцию.

Результаты теста на наличие фермента оксидазы. Помещали полоску (диск) фильтровальной бумаги в пустую чашку Петри и капали 1-2 капли реактива р-фенилендиамин дигидрохлорида и смачивали их деионизированной водой. Посевной петлей брали исследуемую колонию и размазывали ее по полоске. При положительной реакции через 10-30 сек. появляется окрашивание интенсивно синего или фиолетового цвета. При отрицательной реакции цвет не изменяется. Так как отчетливо видно, что не произошло изменения цвета индикатора, бесцветный краситель р-фенилендиамин дигидрохлорид, используемый как искусственный акцептор электронов, без участия оксидазы не окисляется и не образует окрашенное вещество индофенол синий. Реакцию на наличие у данного микроорганизма фермента цитохромоксидазы считаем отрицательной.

Результаты теста Фогес-Проскауэра. Пересевали бактерии изучаемых штаммов на бульон Кларка (5 мл), инкубировали при 28°C 48 часов, далее переносили 2,5 мл бульонной культуры в отдельную пробирку, добавляли 0,3 мл (6 капель) реагента А (α-нафтол), добавляли 0,1 мл (2 капли) реагента Б (40% КОН). Далее осторожно встряхивали пробирку и оставляли на 10-15 мин, а затем учитывали результат. Этот тест основан на выявлении ацетона (ацетил-метилкарбинол) – промежуточного продукта в превращении пировиноградной кислоты (образующейся при расщеплении глюкозы) по бутиленгликолевому пути. В присутствии кислорода и КОН ацетон окисляется в диацетил, образующий соединение красного цвета. Чувствительность

теста возрастает с добавлением α-нафтола перед добавлением КОН. В наших исследованиях через 15 минут окрашивание исследуемого субстрата не происходило, из чего следует, что все исследуемые штаммы *Yersinia ruckeri* № 58639, № 7957, № 46123 были отрицательными на реакцию Фогес-Проскауэра. При положительной реакции через 15 мин появляется красное окрашивание (оттенки до розового).

Результаты теста по реакции с метиловым красным. Этот количественный тест используется для определенной концентрации ионов (рН) в среде у ферментирующих глюкозу микроорганизмов. Все члены семейства *Enterobacteriaceae* преобразуют глюкозу в пировиноградную кислоту по метаболическому пути Эмбдена-Мейергофа. Дальнейшее преобразование пировиноградной кислоты у одних бактерий происходит по смешанному кислотному пути с образованием кислых продуктов (молочной, уксусной, кислоты), обеспечивающих кислый потенциал среды (рН<4,4), у других – по бутиленгликолевому пути с образованием нейтральных продуктов, ацетоина и бутанодиола, повышающих потенциал среды ближе к нейтральному (рН>6,0). Используемый в данном тесте индикатор метиловый красный окрашивает среду в красный цвет при рН<5,0 и в желтый цвет при рН>5,8. Большинство энтеробактерий используют какой-либо один путь конечного расщепления глюкозы, что позволяет дифференцировать их с помощью этого теста. Расплодку сеяли в МПБ (5 мл), инкубировали при 35°C 48 часов. Переносили 2,5 мл бульонной культуры в отдельную пробирку и добавляли 5 капель индикатора метиловый красный и наблюдали за изменением цвета. При положительном результате среда красного цвета; при отрицательном результате среда желто-оранжевого цвета. Все исследуемые штаммы *Yersinia ruckeri* № 58639, № 7957, № 46-123 дали положительную реакцию с метиловым красным.

Результаты теста на утилизацию цитрата. Когда в качестве источника углерода и энергии используется органическая кислота, такая как цитрат, в конечном итоге образуются щелочные карбонаты и бикарбонаты. Кроме того, гидроксид аммония образуется, когда соли аммония в среде используются в качестве единственного источника азота. Использование экзогенного цитрата требует присутствия транспортных белков цитрата (пермеазы). При поглощении клеткой цитрат расщепляется цитратлиазой до оксалоацетата и ацетата. Затем оксалоацетат метаболизируется до пирувата и CO₂. Рост обычно приводит к тому, что индикатор бромтимолового синего меняется с зеленого на синий. Индикатор рН бромтимолового синего - темно-зеленый при нейтральном рН. При увеличении среднего рН до 7,6

бромтимоловый синий становится синим. Засевали изолированную бактериальную колонию штрихами по скошенной поверхности агар, инкубировали при 22°C 24 часа и вплоть до 96 часов.

При положительном результате появляется рост на фоне интенсивного синего окрашивания скошенной поверхности агар. При отрицательном результате рост микроорганизмов отсутствует, и среда не изменяет цвет. Все исследуемые штаммы *Yersinia ruckeri* № 58639, № 7957, № 46-123 никакого изменения цвета не продуцировали; среда осталась темно-зеленым цветом интактного агара. Только бактерии, которые могут использовать цитрат в качестве единственного источника углерода и энергии, смогут расти на цитратной среде Симмонса, таким образом, исследуемые бактериальные штаммы по данному тесту считаем цитрат отрицательными.

Тинкториальные свойства бактерии *Yersinia ruckeri*.

На среде Мюллера-Кауфмана наблюдался обильный рост схожий с ростом сальмонелл. RVS бульон показал также обильный рост сходный с ростом сальмонелл на данной среде. Такие же результаты были на забуферной пептонной воде. Посевы на данных средах культивировании в течение 72ч при температуре 22°C.

На иерсиниозном агаре наблюдался рост с изменением цвета среды на желтый (рис. 2). Культивирование происходило в течение 72ч при температуре 22°C.

Бактериальный рост на среде Эндо. В засеянных чашках при культивировании в течение 72ч при температуре 22°C наблюдался рост исследуемых штаммов прозрачный слегка розовый без металлического блеска, без изменения среды: Все исследуемые штаммы *Yersinia ruckeri* № 58639, № 7957, № 46-123 дают хороший рост на Эндо как лактозоотрицательные бактерии. В первые сутки культивирования наблюдали прозрачный рост без изменения цвета среды. На вторые и третьи сутки наблюдали порозовение бактерий, без металлического блеска и изменения цвета среды.

Рост на среде TCBS. В засеянных чашках при культивировании в течение 72ч при температуре 22°C наблюдался рост исследуемых штаммов: № 58639 слабый, прозрачный без изменения цвета среды на первые сутки культивирования, через 48ч культивирования среда изменила цвет на желтоватый, через 72ч культивирования цвет среды салатно-желтый. Рост штамма № 7957 не наблюдался по истечении 72ч. Рост штамма № 46-123 слабый, прозрачный без изменения цвета среды в течение всего периода культивирования.

Среда висмут-сульфит агар (BSA). В засеян-

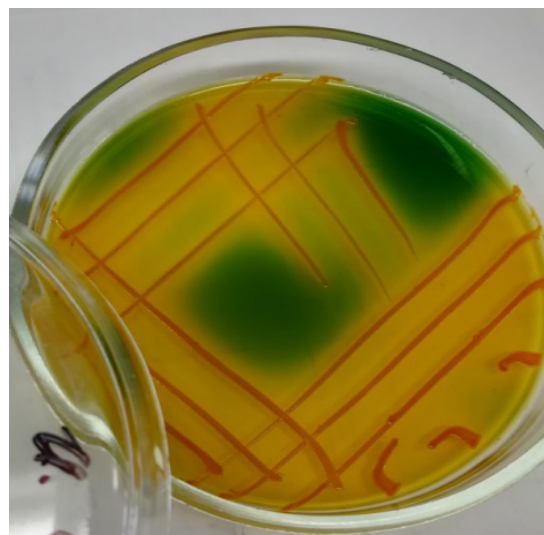


Рис. 2 - Рост штаммов *Yersinia ruckeri* на Иерсиния-агаре при культивировании 72ч с температурой 22 °C

ных чашках при культивировании в течение 72ч при температуре 22°C наблюдался рост исследуемых штаммов зелено-коричневого цвета, без изменения цвета среды. Все исследуемые штаммы *Yersinia ruckeri* № 58639, № 7957, № 46-123 дают хороший рост в первые сутки культивирования, что свойственно росту бактерий, которые неспособны образовывать сероводород.

Среда XLD. В засеянных чашках при культивировании в течение 72ч при температуре 22°C наблюдался рост исследуемых штаммов колонии мелкие прозрачно-серые (рис. 3). Все исследуемые штаммы *Yersinia ruckeri* № 58639, № 7957, № 46-123 дают рост на XLD агаре прозрачный, так как они не способны выделять сероводород.

Среда VRBD. В засеянных чашках при культивировании в течение 72ч при температуре 22°C наблюдался рост исследуемых штаммов темно-фиолетового цвета, с просветлением среды под ростом. Все исследуемые референс-штаммы *Yersinia ruckeri* № 58639, № 7957, № 46-123 росли на VRBD агаре, образуя темно-фиолетовые колонии (рис. 4). Хороший рост отмечен в первые сутки культивирования.

Среда Hektoen. В засеянных чашках при культивировании в течение 72ч при температуре 22°C наблюдался рост исследуемых штаммов прозрачно зеленый с изменением цвета среды на интенсивно зеленый. Все исследуемые штаммы *Yersinia ruckeri* № 58639, № 7957, № 46-123 росли на Hektoen агаре в виде зеленых колонии, изменяющих цвет среды на зеленый под ростом, это говорит о том, что штаммы не образуют сероводород, так как не наблюдали черного окрашивания среды и роста (рис. 5).

Среды Гисса. В засеянных пробирках со средой Гисса с лактозой при культивировании в течение

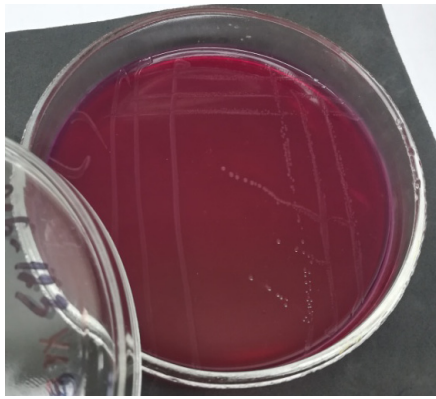


Рис. 3 - Рост штаммов *Yersinia ruckeri* на XLD агар при культивировании 72ч с температурой 22 °С

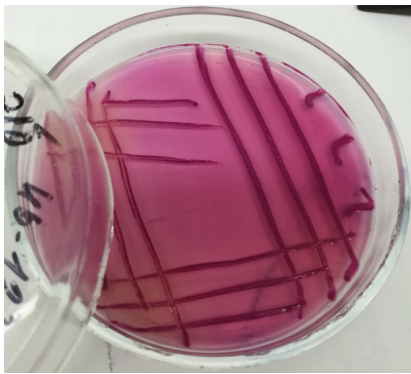


Рис. 4 - Рост штаммов *Yersinia ruckeri* на VRBD агар при культивировании 72ч с температурой 22 °С

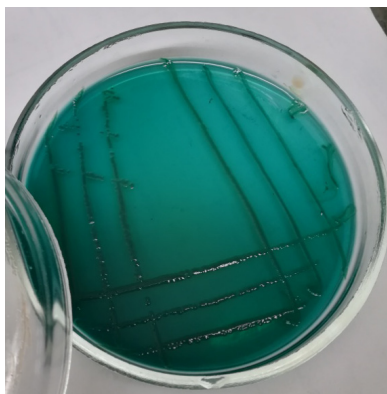


Рис. 5 - Рост штаммов *Yersinia ruckeri* на Hektoen агар при культивировании 72ч с температурой 22 °С

72ч при температуре 22°С не наблюдается изменение цвета среды, значит изучаемые нами штаммы не способны ферментировать лактозу в данных средах. Со средой Гисса с сахарозой при культивировании в течение 72ч при температуре 22°С не наблюдается изменение цвета среды, значит изучаемые нами штаммы не способны ферментировать сахарозу. В засеянных пробирках со средой Гисса с дульцитом при культивировании в течение

72ч при температуре 22°С не наблюдается изменение цвета среды, значит изучаемые нами штаммы не способны ферментировать дульцит. Со средой Гисса с сорбитом при культивировании в течение 72ч при температуре 22°С не наблюдается изменение цвета среды, значит изучаемые нами штаммы не способны ферментировать сорбит. Со средой Гисса с мальтозой при культивировании в течение 72ч при температуре 22°С наблюдается изменение цвета среды, с фиолетового на желтый, значит изучаемые нами штаммы способны ферментировать мальтозу. Со средой Гисса с маннитом при культивировании в течение 72ч при температуре 22°С наблюдается изменение цвета среды, с фиолетового на желтый, значит изучаемые нами штаммы способны ферментировать маннит. Со средой Гисса с глюкозой при культивировании в течение 72ч при температуре 22°С наблюдается изменение цвета среды, с фиолетового на желтый, значит изучаемые нами штаммы способны ферментировать глюкозу.

Среда с лизином. В засеянных пробирках со средой с лизином при культивировании в течение 24ч при температуре 22°С наблюдалось изменение цвета на желтый. При культивировании 48ч при температуре 22°С среда приобрела синий цвет на поверхности. При культивировании 72ч среда более интенсивно изменила цвет на синий. В засеянных пробирках со средой с лизин-контроль при культивировании в течении 72ч при температуре 22°С наблюдалось изменение цвета на желтый (рис. 6). Это означает лизин положительную активность *Y.ruckeri*.

Среда Кристенсена. В засеянных пробирках со средой Кристенсена с мочевиной при культивировании в течение 72ч при температуре 22°С наблюдался рост с изменением цвета среды на розово-красный, что означает расщепление мочевины штаммами *Y. ruckeri*.

Среда с малонатом натрия. В засеянных пробирках со средой с малонатом натрия при культивировании в течение 72ч при температуре 22°С наблюдалось диффузное помутнение среды без изменения цвета среды. Все исследуемые штаммы среагировали одинокого на среду с малонатом натрия. Микроорганизмы, утилизирующие малонат натрия приводят к изменению цвета среды с зеленого на синий. В нашем случае штаммы *Yersinia ruckeri* № 58639, № 7957, № 46-123 вызвали только помутнение среды, это говорит о том, что штаммы не способны утилизировать малонат натрия.

Создание бактериологической тест - системы для идентификации и дифференциации бактерий вида *Yersinia ruckeri*.

Исследуемый субстрат (почва, патологический материал, водная суспензия) резуспендируют

в соотношении 1:10 и культивируют при термостатировании в течение 72ч и температуре 22°C. В дальнейшем культивируемую бактериальную суспензию высевают на Иерсиния-агар и культивируют 72ч при температуре 22°C. Там, где наблюдался рост бактериальных колоний с изменением среды на желтый цвет под ростом бактерий, можно предположить, что идёт культивирование искомой бактерии. Это является одним из дифференциальных показателей. На данном агаре подобное жёлтое окрашивание могут давать только *Escherichia coli* и некоторые бактерии рода *Shigella*, поэтому в дальнейшем используем результаты следующих изученных нами и выше описанных бактериальных тестов. Пересеваем с используемой среды на следующие среды - маркёры с использованием полученных параметров культивирования. На среде VRBD характерный рост темно-фиолетовые колонии. На среде ВСА коричневые колонии без металлического блеска. В ходе изучения сахаролитических свойств желаемые для нас штаммы не ферментируют лактозу, сахарозу, дульцит, сорбит, штаммы не способны ферментировать малонат, но оказывают ферментную активность при культивировании с мальтозой, манитом, глюкозой, активно ферментируют лизин и мочевины. Реакцию на каталазу считаем положительной. Бактерии Грам отрицательны и подвижны.

Выводы

Согласно результатам исследования *Y. Ruckeri* грамотрицательная, подвижная палочка, хорошо растёт на всех основных диагностических средах. Поэтому можно, предположить, что первоначально используя Иерсиния-агар совместно с агарами, содержащими лактозу в качестве источника углерода, необходимыми для контроля за лактозоферментирующими бактериями, и инкубацию при низкой температуре (22° С), можно добиться приемлемого уровня специфичности данных по идентификации *Y. Ruckeri*.

На среде VRBD отмечен характерный рост - образуют темно-фиолетовые колонии, окруженные фиолетовыми ореолами. Иерсиния-агара *Y. Ruckeri* даёт заметное жёлтое окрашивание. Являясь лактозоотрицательной бактерией, на среде Эндо рост отмечен как прозрачный, без изменения цвета среды. На среде ВСА штаммы образовывали коричневые колонии без металлического блеска, без изменения цвета среды. Это говорит о том, что бактерия не образует сероводород.

В ходе изучения сахаролитических свойств было установлено: штаммы не ферментируют лактозу, сахарозу, дульцит, сорбит, но оказали ферментную активность на мальтозу, манит, и глюкозу.

При изучении ферментной активности сделаны следующие выводы: штаммы не способны

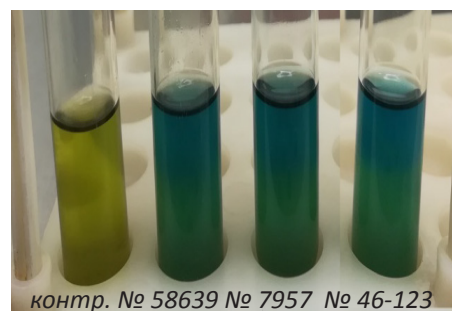


Рис. 6 - Ферментная активность штаммов № 58639, № 7957, № 46-123 на Среду с лизином при культивировании 72ч с температурой 22 °С

ферментировать малонат, но активно ферментируют лизин и мочевины. Реакцию на каталазу считаем положительной, оксидазу отрицательной.

Библиографический список

1. Waltman, W. D. A medium for by *Yersinia ruckeri* following exposure to copper. J. the isolation and differentiation of *Yersinia ruckeri* / W. D. Waltman, E. B. Shotts // Fish Dis. - 1984. – Vol. 4 - P. 33-40.
2. Kinkelin, de P. International veterinary guidelines for the transport of live fish or fish eggs / P. de Kinkelin, R. P. Hedrick // Annual Rev. of Fish Diseases. - 1991. - Vol. 1 - P. 27-40.
3. Hunter, V. A. Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson / V. A. Hunter, M. D. Knittcl, J. L. Fryer // Journal of Fish Diseases. – 1980. - Vol. 3. - P. 467 — 472.
4. *Yersinia ruckeri*, an unusual microorganism isolated from a human wound infection / S. De Keukeleire, Y. Jansen, M. Janssens, G. Wauters, D. Piérarda // New Microbes and New Infections. – 2014. – Vol. 2, Issue 4. - P. 134-135.
5. Özdemir, F. Genotypic and phenotypic virulence characteristics and antimicrobial resistance of *Yersinia* spp. isolated from meat and milk products / F. Özdemir, S. Arslan // Food science. - 2015. - Vol. 5, Issue 6. - P.1306-1313.
6. The repeat structure of two paralogous genes, *Yersinia ruckeri* invasin (*yrInv*) and a «*Y. ruckeri* invasin-like molecule», (*yrIIm*) sheds light on the evolution of adhesive capacities of a fish pathogen / A. Wrobel [et al.] // Struct Biol. – 2018. – Vol. 2. - P.76-83.
7. Wrobel, A. pYR4 From a Norwegian Isolate of *Yersinia ruckeri* Is a Putative Virulence Plasmid Encoding Both a Type IV Pilus and a Type IV Secretion System / A. Wrobel [et al.] // Front Cell Infect Microbiol. - 2018. - Vol. 8 - P. 340.
8. Akhlaghi, M. Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri*: the causative agent of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran / M. Akhlaghi, H.

Sharifi Yazdi // Iranian Journal of Veterinary Research. – 2008. – Vol. 9. - P.55-65.

9. Ingerslev, H. C. Diet type dictates the gut microbiota and the immune response against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / H. C. Ingerslev, Mikael Lenz Strube, Louise von Gersdorff Jørgensen, Inger H. Dalsgaard, Mette Boyé, Lone Madsen // Fish & shellfish immunology. – 2014. - Vol. 11 - P. - 73-80.

10. Andrew, R. Evidence of an Antimicrobial-Immunomodulatory Role of Atlantic Salmon Cathelicidins during Infection with *Yersinia ruckeri* / R. Andrew, Bridle, Elizabeth Nosworthy, Mark P. Polinski, Barbara S. Nowak // PLoS one. - 2011. Vol. 11 - P. - 36-42.

11. Martin, K. R. Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: effects of temperature on protection and gene expression / K. R. Martin // Kurt Buchmann Vaccine. - 2008. - Vol. 2 - P. - 79-96.

12. Huang, Y. Analysis of *Yersinia ruckeri* strains isolated from trout farms in northwest Germany / Y. Huang [et al.] // Diseases of aquatic organisms. Dis Aquat Org. – 2015. – Vol. 116. - P. 243–249.

13. Jeffrey, T. Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri* / T. Jeffrey, Fred LeJeune, R. Rurangirwa // J.Vet.Diagn.Invest. – 2000. - № 12. - P. 558-561.

14. Cerro del, A. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by Multiplex PCR / A. del Cerro, I. Marquez, J. A. Guijarro // J. App.&Env.Microbiol. – 2002. - Vol. 68, № 10. - P. 5177-5180.

15. Kotetishvili, M. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species / M. Kotetishvili [et al.] // Jour.of Clin.Microbiol. - 2005. - Vol. 43, № 6. - P. 2674-2684.

MATERIALS FOR DEVELOPMENT OF A BACTERIOLOGICAL TEST - SYSTEM FOR IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF *YERSINIA RUCKERI* BACTERIA

Vorotnikov A.P., Vasiliev D.A.

FSBEI HE Ulyanovsk State Agrarian University

432017, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1; 8 (8422) 55-95-47

e-mail: dav_ul@mail.ru

Key words: *Yersinia ruckeri*, bacteriological test - system, identification, differentiation.

The article presents results of studies on basic biological properties of *Yersinia ruckeri* bacteria with their subsequent selection to create a bacteriological test system for identification and differentiation of these microorganisms. This system is necessary for conducting epizootological monitoring of ERM infection (enteric redmouth disease) and for conducting veterinary and sanitary assessment of food products obtained on fish farms with this infection. According to results of the study, initially using *Yersinia* agar together with agar containing lactose as a carbon source and incubation at low temperature (22 °C), an acceptable level of specificity of *Y. Ruckeri* identification data can be achieved. When studying the saccharolytic properties, it was found that the strains do not ferment lactose, sucrose, dulcitol, sorbitol. But they had enzymatic activity on maltose, mannitol, and glucose. When studying enzymatic activity, the following conclusions were made: the strains are not able to ferment malonate, but they actively ferment lysine and urea. We consider the reaction to catalase to be positive, and the oxidase to be negative. The proposed research material was first carried out in our country, since this infectious agent and the infection it causes are not included in the list of infectious noso-units existing in the Russian Federation.

Bibliography

1. Waltman, W. D. A medium for by *Yersinia ruckeri* following exposure to copper. J. the isolation and differentiation of *Yersinia ruckeri* / W. D. Waltman, E. B. Shotts // Fish Dis. - 1984. – Vol. 4 - P. 33-40.
2. Kinkelin, de P. International veterinary guidelines for the transport of live fish or fish eggs / P. de Kinkelin, R. P. Hedrick // Annual Rev. of Fish Diseases. - 1991. - Vol. 1 - P. 27-40.
3. Hunter, V. A. Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson / V. A. Hunter, M. D. Knittcl, J. L. Fryer // Journal of Fish Diseases. – 1980. - Vol. 3. - P. 467 – 472.
4. *Yersinia ruckeri*, an unusual microorganism isolated from a human wound infection / S. De Keukeleire, Y. Jansenb, M. Janssensc, G. Wautersc, D. Piérarda // New Microbes and New Infections. – 2014. – Vol. 2, Issue 4. - P. 134-135.
5. Özdemir, F. Genotypic and phenotypic virulence characteristics and antimicrobial resistance of *Yersinia* spp. isolated from meat and milk products / F. Özdemir, S. Arslan // Food science. - 2015. - Vol. 5, Issue 6. - P.1306-1313.
6. The repeat structure of two paralogous genes, *Yersinia ruckeri* *invasin* (*yrInV*) and a «*Y. ruckeri* *invasin*-like molecule», (*yrIIm*) sheds light on the evolution of adhesive capacities of a fish pathogen / A. Wrobel [et al.] // Struct Biol. – 2018. – Vol. 2. - P.76-83.
7. Wrobel, A. *pYR4* From a Norwegian Isolate of *Yersinia ruckeri* Is a Putative Virulence Plasmid Encoding Both a Type IV Pilus and a Type IV Secretion System / A. Wrobel [et al.] // Front Cell Infect Microbiol. - 2018. - Vol. 8 - P. 340.
8. Akhlaghi, M. Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri*: the causative agent of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran / M. Akhlaghi, H. Sharifi Yazdi // Iranian Journal of Veterinary Research. – 2008. – Vol. 9. - P.55-65.
9. Ingerslev, H. C. Diet type dictates the gut microbiota and the immune response against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / H. C. Ingerslev, Mikael Lenz Strube, Louise von Gersdorff Jørgensen, Inger H. Dalsgaard, Mette Boyé, Lone Madsen // Fish & shellfish immunology. – 2014. - Vol. 11 - P. - 73-80.
10. Andrew, R. Evidence of an Antimicrobial-Immunomodulatory Role of Atlantic Salmon Cathelicidins during Infection with *Yersinia ruckeri* / R. Andrew, Bridle, Elizabeth Nosworthy, Mark P. Polinski, Barbara S. Nowak // PLoS one. - 2011. Vol. 11 - P. - 36-42.
11. Martin, K. R. Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: effects of temperature on protection and gene expression / K. R. Martin // Kurt Buchmann Vaccine. - 2008. - Vol. 2 - P. - 79-96.
12. Huang, Y. Analysis of *Yersinia ruckeri* strains isolated from trout farms in northwest Germany / Y. Huang [et al.] // Diseases of aquatic organisms. Dis Aquat Org. – 2015. – Vol. 116. - P. 243–249.
13. Jeffrey, T. Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri* / T. Jeffrey, Fred LeJeune, R. Rurangirwa // J.Vet.Diagn.Invest. – 2000. - № 12. - P. 558-561.
14. Cerro del, A. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by Multiplex PCR / A. del Cerro, I. Marquez, J. A. Guijarro // J. App.&Env.Microbiol. – 2002. - Vol. 68, № 10. - P. 5177-5180.
15. Kotetishvili, M. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species / M. Kotetishvili [et al.] // Jour.of Clin.Microbiol. - 2005. - Vol. 43, № 6. - P. 2674-2684.