ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина»

04201355687

Барт Наталья Геннадьевна

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ ФАГОВОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ

БАКТЕРИЙ РОДА PROVIDENCIA

на правах рукописи

03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии) 03.02.03 - микробиология

диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор Золотухин С.Н. доктор биологических наук, профессор Васильев Д.А.

Ульяновск - 2012

СОДЕРЖАНИЕ

Список условных сокращений 4

ВВЕДЕНИЕ 5

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 12

1.1. История открытия и токсономическая характеристика

бактерий рода Providencia 12

1.2. Биологические свойства бактерий рода Providencia 14

1.2.1. Морфология 14

1.2.2. Культуральные свойства 14

1.2.3. Биохимические свойства 15

1.2.4. Антигенная структура и серологическая идентификация 17

1.2.5. Патогенность 18

1.2.6. Резервуар и распространение инфекционного агента 20

1.2.7. Устойчивость к физико-химическим факторам 24

1.3. Лабораторная идентификация бактерий рода Providencia 25

1.4. Бактериофаги и их применение в лабораторной практике 29

1.4.1. Взаимодействие бактериофагов с клеткой-хозяином 29

1.4.2. Фагоидентификация бактерий и фаготипирование 32

1.4.3. Реакция нарастания титра фага (РНФ) 37

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ 43

2.1. Объект, материалы и методы 43

2.1.1. Материалы 43

2.1.1. Методы 47

2.2. Результаты собственных исследований 48

2.2.1. Выделение бактерий рода Providencia из объектов ветеринарного надзора и патологического материала 48

2.2.2. Выделение бактериофагов Providencia

и селекция клонов фагов 52

2.2.3. Характеристика фагов бактерий рода Providencia 58

2.2.3.1. Морфология негативных колоний 58

2.2.3.2. Литическая активность бактериофагов Providencia 60

2.2.3.3. Спектр литической активности бактериофагов Providencia 63

2.2.3.4. Специфичность действия бактериофагов рода Providencia 66

2.2.3.5. Температурная устойчивость бактериофагов

рода Providencia 67

2.2.3.6. Устойчивость бактериофагов рода Providencia

к воздействию хлороформа 69

2.3. Разработка технологических параметров изготовления и контроля

индикаторных фагов Providencia 70

2.4. Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий рода

Providencia 80

2.5. Разработка оптимальных условий постановки РНФ 85

2.5.1. Определение количественного показателя РНФ,

имеющего диагностическое значение 85

2.5.2. Установление оптимального времени, обеспечивающее наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями 88

2.5.3. Разработка схемы постановки РНФ для индикации

бактерий рода Providencia в объектах ветеринарного надзора 92

 Исследование водопроводной воды, контаминированной бактериями рода Providencia с помощью РНФ 92

 Исследование комбикорма, контаминированного бактериями рода Providencia с помощью РНФ 94

 Исследование фекалий, контаминированных бактериями

рода Providencia с помощью РНФ 95

 Исследование мяса, контаминированного бактериями

рода Providencia с помощью РНФ 97

 Исследование фекалий больных диареей телят на присутствие бактерий Providencia с использованием РНФ 99

Заключение 107

Выводы 114

Практические предложения 115

Список использованных литературных источников 116

Приложения 140

Выводы

1. В объектах ветеринарного надзора и патологическом материале Providencia обнаружены в 8 из 18 хозяйств, неблагополучных по желудочно- кишечным заболеваниям молодняка животных. Изолировано и идентифицировано 26 штаммов Providencia rettgeri.

2. Из 120 проб объектов внешней среды было выделено и селекционировано 14 бактериофагов, активных в отношении бактерий рода Providencia.

3. Выделенные фаги имеют литическую активность от 10"5 до 10"10 по Аппельману и от 4,2 х 107 ± 0,1 х 107 до 8,3 х 109 ± 0,2 х 109 фаговых корпускул в 1 мл по Грациа. Установлено, что два бактериофага отличались широким диапазоном литической активности: F-87 УГСХА лизировал 82,1 % штаммов бактерий рода Providencia, F-67 УГСХА - 85,7 %, а в сумме фаги лизировали 96,4 % всех исследованных культур. Они обладали строгой специфичностью: не лизировали бактерии других родов и семейств.

4. Разработанные биотехнологические параметры изготовления и контроля бактериофагов Providencia позволяют получить специфический диагностический препарат штаммов F-87 УГСХА и F-67 УГСХА с высокой литической активностью. Разработанная схема с применением фагов F-87 УГСХА и F-67 УГСХА, позволяет выделить и идентифицировать бактерии рода Providencia за 48 часов.

5. Штаммы фагов F-87 УГСХА и F-67 УГСХА были устойчивы к воздействию высокой температуры. Нижний порог термоинактивации составляет 67 °С, верхний - 88° С. Фаги не меняют литической активности при воздействии хлороформа в течение 40 минут.

6. Разработанные технологические параметры ускоренной индикации бактерий рода Providencia в объектах ветеринарного надзора и в патологическом материале с помощью РНФ с использованием индикаторных бактериофагов (F-87 УГСХА и F-67 УГСХА), позволяют обнаружить бактерии рода Providencia в концентрации 103 м.к./мл (г) исследуемого субстрата за 18-22 часа.