

УДК 619:616.93:579.673.21:636
© 2011

П.О. ДАВИДЕНКО,
аспірант

**ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУР
КУЛЬТИВУВАННЯ НА
ЛІПІДНИЙ СКЛАД *M. BOVIS*
ДИСОЦІАТИВНИХ ФОРМ,
ПАСАЖОВАНИХ ЧЕРЕЗ
СЕРЕДОВИЩЕ З рН 7,1**

*Представлено результати досліджень ліпідного складу *M. bovis* дисоціативних форм, у т. ч. і L-форм, культивованих за різних температур. Установлено, що дисоціація мікобактерій на фоні стабільності набору вільних жирних кислот супроводжується синтезом нової кислоти – ундеканової (C11:0), що може бути характерним для дисоціативних форм. Виявлено, що вміст загальних ліпідів у *M. bovis* дисоціативних форм значно нижчий за усіх температур культивування, ніж у контрольного зразка.*

Збудник туберкульозу характеризується великою стійкістю до дії різних фізичних та хімічних факторів унаслідок великого вмісту в бактеріальній клітині ліпідних речовин та особливостей будови клітинних структур. З наукових літературних джерел відомо, що культивування *M. bovis* на штучному живильному середовищі з рН 6,5 за багаторазових пасажів призводить до суттєвих змін морфологічних ознак, вірулентних, сенсibiliзуювальних, біохімічних властивостей та ліпідного складу. Однак досліджень *M. bovis*, які культивуються на штучному живильному середовищі з рН 7,1, у літературі не знайдено [1–3].

Обмеженість даних щодо структури мікобактерій у ветеринарній науці взагалі, і особливо у вітчизняній, вказує на необхідність вивчення цього питання, зокрема ліпідного складу на фоні впливу факторів довкілля, у тому числі й температури.

Мета роботи – вивчення ліпідного складу дисоціативних форм *M. bovis*, які культивовані за різних температур.

Матеріали і методи дослідження. Робота проводилася у навчально-дослідній лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпропетровського державного аграрного університету і в НДІ біології Дніпропетровського національного університету. Досліджували ліпіди

дисоціативних форм *M. bovis* 117,а, б, в і 118 пасажів, які культивували на щільному живильному середовищі з рН 7,1. Накопичували культури *M. bovis* усіх пасажів досліджу на щільному яєчному середовищі з рН 7,1 у термостаті за температур 3, 20 та 37 °С протягом 30 діб від початку росту колоній. За станом посівів спостерігали щоденно, відмічаючи ріст колоній, його інтенсивність та культуральні властивості. Знімали культури досліджуваних штамів мікобактерій стерильним шпателем, зважували на аналітичних вагах і переносили біомасу в попередньо висушений та зважений стерильний пеніциліновий флакон. Після зняття культури флакон закривали та зважували на аналітичних вагах і запаювали парафіном [3, 9].

Для порівняння якісних і кількісних показників ліпідів дисоціативних форм *M. bovis* використали попередні усереднені дані досліджень материнської культури (пасаж 100–124) кислотостійких, вірулентних, типових морфологічних ознак паличок [6].

Загальні ліпіди з досліджуваних зразків біологічної маси мікобактерій виділяли за методикою Фолча в модифікації Блайя-Дайера, а їх вміст і фракційний склад вивчали методом тонкошарової хроматографії на силікагелевих пластинках *Silufol* з

кількісним денситометруванням [3].

Компонентний склад фракції вільних жирних кислот мікобактерій визначали методом газорідинної хроматографії на газовому хроматографі Chrom 5 (Чехія) після попередньої етерифікації [3, 5]. Якісний аналіз метилових естерів жирних кислот проводили шляхом порівняння із часом утримання стандартів, а кількісний склад розраховували за площею піків і визначали їх у відсотках від загальної площі піків, яку брали за 100 %. Обчислення і статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою ПК в електронних таблицях Excel.

Результати досліджень та їх обговорення. Дані, наведені в таблиці, свідчать про те, що *M. bovis* дисоціативних форм містять невелику кількість (в 1,3–3,7 рази менше) загальних ліпідів порівнянно з їхньою кількістю на контрольному варіанті мікобактерій (100 + 124 пасаж/ 2), який культивовано за температури 37 °С.

Дисоціативні форми *M. bovis* трьох варіантів з чотирьох з підвищенням температури культивування тенденційно підвищували вміст загальних ліпідів. *M. bovis* 117,б пасажу мали зворотну закономірність. Якщо у мікобактерій 117,а і 117,в з підвищенням температури культивування відмічалось незначне збільшення вмісту загальних ліпідів, то у мікобактерій 118 пересіву така тенденція була досить суттєвою, тобто втричі більшою, ніж за температури культивування 3 °С [7, 8].

Така відмінність вмісту й динаміки загальних ліпідів у мікобактерій дисоціативних форм зумовлена культуральними властивостями, морфологічними формами, а отже, й біохімічним, у тому числі ліпідним, складом клітинної оболонки. Мікобактерії 117,б пересіву, маючи явно виражену здатність формувати помаранчевий пігмент, з підвищенням температури культивування знижують вміст загальних ліпідів; мікобактерії 118 пересіву, типові представники *L*-форм (сферопласти) [4] з вірогідним вмістом елементарних тілець

(гранул), розмножуючись за більш оптимальної температури, можливо, інтенсивно накопичують ліпіди. Останнє стосується не самих *L*-форм, а гранул, які вміщуються в них у вигляді кулястих утворень. Якщо *L*-форми, що культивувалися за 3 °С, вміщували тільки поодинокі в полі зору мікроскопа червоні гранули, то за 37 °С вони значно частіше виявлялися не тільки всередині кулястих утворень, а й на межі виходу та поряд із сферопластами.

Що стосується фракційного складу загальних ліпідів дослідних і контрольних зразків мікобактерій, то привертає увагу той факт, що мікобактерії дисоціативних форм усіх 4-х варіантів вміщували нижчий рівень фосфоліпідів, ніж мікроорганізми контролю, проте з достовірною різницею лише в п'яти випадках із 12. Вміст діацилгліцеролів у контрольному зразку мікобактерій певною мірою дорівнював їх вмісту в дисоціативних формах мікобактерій. В останніх їх вміст був вищим або нижчим. І тільки у мікобактерій 118 пересіву вміст діацилгліцеролів суттєво перевищував їх вміст у мікобактерій контролю: достовірна різниця аналізованих показників відмічена у 3-х випадках (за 3, 20 та 37 °С).

Вміст стеринів у мікобактерій контролю був значно нижчим, ніж у мікобактерій 117,а та 117,в варіантів з достовірною різницею в усіх 6 випадках. Мікобактерії 117,б варіанта та 118 пересіву вміщували однакову кількість стеринів порівнянно з мікобактеріями контролю. Суттєвої різниці не відмічено у вмісті ВЖК мікобактерій контрольного та дослідного зразків за всіх температур культивування. Практично однаковий вміст триацилгліцеролів відмічено в контрольному та дослідному зразках мікобактерій за винятком 117,а варіанта, де встановлено достовірне підвищення вмісту цієї аналізованої фракції за температури культивування 20 і 37 °С та мікобактерій 118 пересіву за температури 37 °С.

Естери стеринів значно менше вміщували мікобактерії 118 пересіву, ніж мікобактерії контролю, та мікобактерії 117,а вари-

анта за температури 37 °С – 117,б варіанта за температури 3 і 20 °С та 117,в варіант за температури 3 °С культивування.

Отже, вірулентні мікобактерії мають такий самий якісний фракційний склад клітинної оболонки, що і мікобактерії дисоціативних форм. Найбільш суттєві відмінності в кількісному фракційному складі встановлені між мікобактеріями 118 пересіву і мікобактеріями контролю (естери стеринів та діацилгліцероли): за всіх температур культивування згадані фракції дисоціативних форм мали вищий показник, ніж у контролі. Достовірні відмінності, тільки за іншою фракцією – стеринів, за всіх температур культивування встановлено у мікобактерій 117,а і 117,в варіантів.

Відносно вмісту в клітинній оболонці ВЖК досліджуваних варіантів дисоціативних форм *M. bovis*, то в порівняльному аспекті з усередненими даними 100 та 124 пересівів (материнська культура) відзначимо: в усіх дослідних зразках виявлено нову ундеканову кислоту $C_{11:0}$, що реєструвалася за усіх температурних режимів культивування; у контрольному зразку згадана кислота не реєструвалася. Разом з цим у жодному з досліджуваних варіантів мікобактерій не зафіксовано таку кислоту, як гексаказанова $C_{26:0}$, яка не виділена і в контрольному зразку 100–124 пересів.

Наголосимо, що аналізована ВЖК у материнській культурі цього ж варіанту *M. bovis* не реєструвалася вже з 100 пересіву за рН 7,1, хоча в 59 субкультурі ця кислота містилася ($0,59 \pm 0,32$) [6].

Аналізуючи вміст основних, скелетних ВЖК мікобактерій контрольних зразків встановлено, що ці кислоти (пальмітинова $C_{16:0}$, олеїнова $C_{18:1}$, стеаринова $C_{18:0}$) залишилися основними скелетними ВЖК і в дисоціативних формах мікобактерій, у тому числі і *L*-формах 118 субкультури. Це свідчить про те, що, незважаючи на зміну морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей (втрата кислотостійкості), наявність згаданих кислот в дисоціативних формах мікобактерій на найвищому рівні залишається постійною, їх рівень взагалі значно вищий, ніж у субкультурах мікобактерій 100 та 124 пересівів. Хоча встановлено деякі відмінності в бік зниження аналізованих кислот. Так, достовірне зниження пальмітинової кислоти відмічено у мікобактерій (*L*-форм 118 субкультури) під час культивування за усіх температурних режимів. Вміст олеїнової кислоти достовірно був нижчим у 117,а субкультури за всіх температурних режимів; у 117,б та 117,в субкультур нижчий за температури 20 і 37 °С культивування. Вміст стеаринової кислоти у мікобактерій 117,б субкультури

Загальні ліпіди дисоціативних форм *M. bovis*, культивованих за різних температур, % на наважку

Контроль (100+124 пасаж/2); температура культивування 37 °С	Температура культивування	Пасаж			
		117,а	117,б	117,в	118
4,85±0,45	3	2,31±0,11**	2,96±0,37*	2,38±0,14**	1,20±0,50**
	20	1,30±0,27**	1,53±0,48**	2,37±0,44*	1,49±0,51**
	37	2,40±0,26**	2,2±0,31**	2,6±0,32*	3,63±0,55

* P≤0,05; ** P≤0,01.

3 °С, 117,в – 3 °С і 118 – 3 °С був нижчим, а в деяких випадках і достовірним (117,б – 3 °С; 118 – 3 та 20 °С).

Водночас суттєві зрушення на окремих етапах досліджень дисоціативних форм встановлені й у вмісті інших ВЖК. Вміст маргаринової кислоти $C_{17:0}$ у субкультури 117,а пересіву перевищував вміст у контрольному зразку у 8,3 та 11,6 раза. Збільшення вмісту цієї кислоти у 8,8 раза відмічено і у 118 пересіві за температури культивування 20 °С. Досить показове підвищення рівня вмісту лінолевої + ліноленової кислоти відмічено в усіх досліджуваних мікобактерій (117,а, 117,б, 117,в та 118 пересіву), причому тільки за температури культивування 37 °С. Досить суттєві, щоб звернути на це увагу, зрушення цих кислот відмічено у мікобактерій 117,а та 118 субкультур за температури 20 °С, де аналізовані показники становили $(7,07 \pm 0,56)$, $(8,69 \pm 0,44)$ % відповідно. У мікобактерій 117,б, 117,в та 118 субкультур не виявлено нонадеканової та арахінової кислот за температур культивування 37, 20 та 3 °С відповідно. Лауринова ВЖК не реєструвалася у мікобактерій дослідних зразків. На межі слідів вона виявлена тільки за температури культивування 3 °С у 117,а та 117,б субкультур. Поряд з цим необхідно зазначити, що температура культивування 20 °С виявилася оптимальною для синтезу мікобактеріями неідентифікованої ВЖК, яка не реєструвалася у мікобактерій контрольного зразка.

За нашими даними [3], характерною особливістю є те, що за пасажування мікобактерій цього варіанта тільки через середовище з рН 6,5 фракція ВЖК у динаміці пасажів *M. bovis* мала загальну тенденцію до вірогідного підвищення їх рівня, з суттєвою зміною їх якісного та кількісного складу. Так, якщо у *M. bovis* вихідного варіанта виділяли 19 ВЖК, то на 130 пасажі їх кількість зменшилася до 14, а на 150 – до 10. У них, як і у мікобактерій дисоціативних форм, були встановлені авірулентні властивості [3].

Отже, аналіз вмісту ВЖК у дисоціатив-

них форм мікобактерій засвідчив, що їх клітинна оболонка має такий самий якісний і в цілому кількісний склад ВЖК, як і мікобактерії материнської субкультури. Пальмітинова, олеїнова, стеаринова кислоти, які є базовими ВЖК патогенних мікобактерій [2], містяться і в дисоціативних формах, зазвичай з деякими відхиленнями у вмісті. Того ж часу дисоціація мікобактерій супроводжувалась й синтезом нових кислот, які раніше не фіксувалися в материнській культурі, зокрема ундеканова ($C_{11:0}$).

Аналізуючи вміст довго- та коротколанцюгових вільних жирних кислот клітинної стінки мікобактерій, встановлено, що довголанцюгові жирні кислоти у контролі в сумі склали 9,11 %, а коротколанцюгові – 90,89 %, у форм мікобактерій дослідних зразків 117,а, б, в за температури 3 °С ці показники становили 3,41 та 96,59 %; 6,46 і 93,54; 4,03 і 95,97 % відповідно. Виняток склали L-форми 118 пересіву, в яких співвідношення коротколанцюгових і довголанцюгових жирних кислот було чи не у 2 рази більшим, ніж у мікобактерій контролю (1:10; 1:5,5 відповідно). Така ж тенденція спостерігається і за температури культивування 37 °С. За температури 20 °С вміст довго- та коротколанцюгових вільних жирних кислот був таким самим, як і у мікобактерій контролю.

Сума ненасичених жирних кислот (пальмітолеїнової, олеїнової, лінолевої та ліноленової) у мікобактерій кожного варіанта суттєво відрізнялася. Так, найбільше відхилення спостерігалось у мікобактерій 117,а варіанта за температури культивування 3 °С та L-форм 118 пересіву.

У цілому сума ненасичених жирних кислот у мікобактерій контролю тільки дещо нижча (42,32 %), ніж у форм мікобактерій дослідних варіантів (43,68; 42,96; 51,28 %) за температури культивування 3 °С. Стосовно температури культивування 20 °С, то найбільше відхилення спостерігалось у L-форм 118 пересіву, де переважала Σ ненасичених жирних кислот над

Σ насичених: 50,42 та 49,58 % відповідно. Але вміст Σ ненасичених жирних кислот був значно нижчим у 117,а, б, в варіантів порівняно з контролем: 22,48; 19,33; 15,15 %, що відповідно в 1,89; 2,18; 2,79 раза менше, аніж у контролі.

За температури культивування 37 °С сума ненасичених жирних кислот у 117,а, б, в варіантів була в 1,42; 1,29; 2,55 раза меншою за суму на контролі, тоді як у L-форм 118 пересіву вона була на рівні з контрольною.

Висновки

1. Кількісний вміст загальних ліпідів у *M. bovis* дисоціативних форм значно нижчий за усіх температур культивування, ніж у контролі (*M. bovis* вірулентного штаму).

2. Якісний фракційний склад мікобактерій дисоціативних варіантів незмінний, проте кількісний відрізнявся від вихідних форм. Так, мікобактерії 118 пересіву за всіх температур культивування містили більше естерів стеринів та діацилгліцеро-

лів, ніж мікобактерії материнської культури.

3. Дисоціація мікобактерій, на фоні стабільності набору вільних жирних кислот, супроводжується синтезом нової кислоти: ундеканової (C_{11:0}), що може бути характерним для дисоціативних форм. Виявлена особливість може використовуватися для ідентифікації та диференціації *M. bovis* патогенних та дисоціативних (апатогенних) форм.

Бібліографія

1. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. – М. : Мир, 1975. – 322 с.

2. Коронелли Т.В. Липиды микобактерий и родственных микроорганизмов / Т.В. Коронелли. – М. : Изд-во МГУ, 1984. – 160 с.

3. Лабораторна діагностика туберкульозу тварин: практичний посібник / [Ткаченко О.А., Білан М.В., Зажарський В.В., Ковальова Л.О.]. – Дніпропетровськ : Вид-во “Свідлер А.Л.”, 2010. – 208 с.

4. Прозоровський С.В. L-форми бактерій / Прозоровський С.В., Кац Л.Н., Каган Г.Я. – М. : Медицина, 1981. – 239 с.

5. Савчин М.М. Сучасна українська номенклатура неорганічних та органічних речовин / Савчин М.М. – Львів : ВНТЛ, 1999. – 24 с.

6. Ткаченко О.А. Сенсibiliзувальні властивості та ліпідний склад *M. bovis*,

багаторазово пасажованих через щільне живильне середовище з рН 7,1 / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, П.О. Давиденко // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 2. – С. 20–22.

7. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості за температур 3 і 37 °С / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Зажарський [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 12. – С. 27–30.

8. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: культуральні особливості за температур 3 і 37 °С / О.А. Ткаченко, М.В. Білан [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 3. – С. 33–35.

9. Яценко Т.Н. Руководство по лабораторным исследованиям при туберкулезе / Яценко Т.Н., Мечева И.С. – М. : Медицина, 1973. – 260 с.