УДК 619:616.93:579.673.21:636
© 2010

П.О. ДАВИДЕНКО,
аспірант

ЛІПІДНИЙ СКЛАД M. BOVIS, БАГАТОРАЗОВО ПАСАЖОВАНИХ ЧЕРЕЗ ЩІЛЬНЕ ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ З pH 7,1

Установлено, що зі збільшенням кількості пасажів змінюється ліпідний склад, який супроводжується тенденційним зниженням вмісту загальних ліпідів, фракції діацилгліцеролів, стеринів та вільних жирних кислот; на фоні збільшення коротколанцюгових та насичених жирних кислот відмічається досить велика кількість ненасичених жирних кислот та зменшення вмісту довголанцюгових жирних кислот. Це підтверджує, що M. bovis швидкорослого штаму з часом пристосувалися до умов культивування. У морських свинок виявлено патолого-анатомічні зміни, властиві туберкульозу, без збереження сенсибілізувальних властивостей.

Ліпідний склад мікобактерій, що володіє комплексною біологічною дією, яка виражається в їх токсичності, здатності спричиняти специфічні зміни в тканинах, характеризується вірулентними властивостями. Особлива біологічна роль бактеріальних жирних кислот підкреслює різницю між складом ліпідів бактерій і мікобактерій. Жирні кислоти мікобактерій значно складнішы, ніж у бактерій, що обумовлює і специфічні властивості ліпідів у цих мікроорганізмів. У зв'язку з цим вивчення ліпідів мікобактерій викликає значні труднощі через їх складну структуру [4, 6].

Обмеженість даних з хімічної структури мікобактерій у ветеринарній науці вказує на необхідність вивчення цього питання, зокрема ліпідного складу на фоні впливу деяких факторів середовища.

З літературних даних [1, 2, 7] відомо, що культивування *M. bovis* на штучному живильному середовищі з pH 6,5 за багаторазових пасажів сприяє суттєвим змінам морфологічних ознак, вірулентних, сенсибілізувальних, біохімічних властивостей та ліпідного складу. Досліджень *M. bovis*, які культивуються на штучному живильному середовищі з pH 7,1, у літературі не знайдено.

Метою роботи було вивчення сенсибілізувальних, вірулентних властивостей та ліпідного складу M. bovis.

Матеріал та методи дослідження. Роботу проводили в навчально-дослідній лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб ДДАУ і в НДІ біології ДНУ ім. О. Гончара.

Ліпідний склад штаму *M. bovis* вивчали в порівняльному аспекті зразків різних пасажів (контроль – *M. bovis* 59 пасажу та дослід – 100 і 124 пасажs культивували на щільному яєчному живильному середовищі з pH 7,1). Культуру *M. bovis* усіх пасажів накопичували на щільному яєчному середовищі з pH 7,1 в термостаті за температури 37 ºС протягом 30 діб від початку росту колоній. За станом посівів спостерігали щоденно, відмічаючи ріст колоній, його інтенсивність та культуральні ознаки.

Знімали культури досліджуваних штамів мікобактерій стерильною бактеріологічною петлею, зважували на аналітичних вагах і переносили біомасу в попередньо висушений та зважений стерильний пеніциліновий флакон. Після зняття культури флакон закривали та зважували і запаювали парафіном [8].

Загальні ліпіди з досліджуваних зразків біологічної маси мікобактерій виділяли за методикою Фолча в модифікації Блайя-Дайєра, а їх вміст і фракційний склад вивчали методом тонкошарової хроматографії на селі-кагелевих пластинках *Silufol* з подальшим кількісним денситометруванням [3].

Компонентний склад фракції вільних жирних кислот мікобактерій визначали методом газорідинної хроматографії на газовому хроматографі Chrom 5 (Чехія) після

106

попередньої етерифікації [3]. Якісний аналіз метилових ефірів 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.

Вірулентні та сенсибілізувальні властивості у вихідних і пасажованих мікобактерій бичачого виду досліджували на морських свинках за традиційною у ветеринарній медицині методикою [5].

Результати досліджень. *M. bovis* 100 пасажу містять невелику кількість загальних ліпідів відносно до 59 та 124 пасажів (табл. 1). Загальна кількість ліпідів у контрольному зразку біомаси *M. bovis* становила 13,1 % від суми; в дослідному 100-му пасажі вона була в 2,34 раза, а в 124 пасажі в 3,2 рази менше за контроль.

Отже, значна кількість загальних ліпідів у вихідному штамі *M. bovis* може свідчити про його більш високу вірулентність, оскільки відомо, що вміст ліпідів обумовлює патогенність мікобактерій.

Відзначимо, що фракція полярних ліпідів (фосфоліпідів) зі збільшенням кількості пасажів має тенденцію збільшуватися. Таке саме спостерігалося і з фракцією ефірів стеринів. У зразка, пасажованого 124 рази, вона була в 0,69 раза більше, ніж у контролі .

Вміст діацилгліцеролів, стеринів та вільних жирних кислот, навпаки, мав тенденцію до поступового зменшення, а саме: у 100 та 124 пасажах діацилгліцеролів було відповідно в 1,13 та 1,17 раза, у стеринів – у 1,36 та 1,32 раза, у ВЖК – в 1,08 та 1,05 раза менше порівнянно з їх кількістю в 59 пасажі.

Відмічалося збільшення триацилгліцеролів у мікобактерій 124 пасажу в 0,86 раза.

Зіставляючи наведені результати цих і попередніх дослідженнь *M. bovis*, відзначимо відмінність змін у ліпідному складі клітинної оболонки за пасажування на середовищі з pH 6,5 до 150 пасажу, де спостерігалася тенденція до зниження фракцій фосфоліпідів, триацилгліцеролів та ефірів стеринів, а також збільшення фракцій діацилгліцеролів, стеринів та вільних жирних кислот.

Визначення жирнокислотного складу фракції вільних жирних кислот показало високий вміст суми ненасичених жирних кислот у досліджуваних зразках (табл. 2), хоча велику частку в них складають насичені жирні кислоти. Відмічено високий вміст таких насичених жирних кислот, як $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{22:0}$, $C_{25:0}$ у всіх зразках. На 100 пасажі перевищувала кількість маргаринової, нонадеканової, арахінової кислот, а на 124 пасажі – пентаде-

1. Вміст та фракційний склад загальних ліпідів у зразках M. bovis, % від суми

Пасаж	Вміст загальних ліпідів, % на наважку	Фракція загальних ліпідів						
		фосфоліпіди	діацилгліцероли	стерини	ВЖК	триацилгліцероли	ефіри стеринів	Σ ліпідів
59	13,10± 0,67	20,59± 1,49	17,60± 1,67	19,85± 1,03	16,86± 1,18	14,23± 0,61	10,87± 1,00	100
100	5,60± 0,77**	21,29± 0,41	15,55± 0,28	14,59± 0,23**	15,55± 0,28	16,99± 0,11*	16,03± 0,67*	100
124	4,10± 0,64***	22,09± 0,57	14,96± 0,23	14,96± 0,23**	15,92± 0,17	16,39± 0,40*	15,68± 0,41*	100
Тут і далі: * $P \le 0,05$; ** $P \le 0,01$; *** $P \le 0,001$.								

107

канової, стеаринової, генейкозанової.

У дослідах зареєстровано також, що кількість ненасичених жирних кислот була досить великою протягом 124 пасажів, на відміну від пасажування *M. bovis* через щільне середовище з pH 6,5. Це вказує на посилені адаптивні фізіологічні процеси мікробної клітини до pH живильного середовища та несприятливих умов, зокрема, до постійних тривалих пересівів.

Збільшення кількості пересівів мікобактерій суттєво знижувало вміст довголанцюгових і підвищувало вміст коротколанцюгових жирних кислот. Співвідношення цих кислот у мікобактерій контролю становило 1:4,89, а у пасажованих 100 та 124 рази – 1:9,62 та 1:10,33 відповідно, оскільки взагалі зникли такі довголанцюгові кислоти, як C_{26}, C_{27}, та виявлено у дуже малій кількості кислоти C_{23}, C_{24}. За даними М. Зеленської [2], при пасажуванні мікобактерій на такому ж самому середовищі з pH 7,1 до 40 пасажу, навпаки, відмічалась як велика кількість коротколанцюгових жирних кислот, так і довголанцюгових (1:5,62) у *M. bovis*.

Вочевидь, pH середовища визначає інтен-

2. Вміст вільних жирних кислот у M. bovis за багаторазового пасажування, % від суми

Вільна жирна кислота	Код	Пасаж		
		59	100	124
Лауринова	$C_{12:0}$	0,16±0,10	0,10±0,05	0,03±0,006
Тридеканова	$C_{13:0}$	0,69±0,07	0,48±0,06	0,28±0,08**
Миристинова	$C_{14:0}$	0,41±0,17	0,36±0,09	0,25±0,06
Пентадеканова	$C_{15:0}$	0,46±0,17	0,24±0,06	1,04±0,12*
Пальмітолеїнова	$C_{16:1}$	1,28±0,28	0,84±0,23	1,41±0,54
Пальмітинова	$C_{16:0}$	29,19±1,78	26,98±0,56	28,41±0,59
Маргаринова	$C_{17:0}$	0,92±0,24	1,78±0,13*	0,17±0,06*
Олеїнова	$C_{18:1}$	34,97±1,61	40,64±0,41*	38,98±0,60
Стеаринова	$C_{18:0}$	10,10±0,84	14,06±0,25*	16,77±0,31**
Лінолева + ліноленова	$C_{18:2} + C_{18:3}$	4,13±0,96	1,19±0,32*	1,56±0,59*
Нонадеканова	$C_{19:0}$	0,73±0,23	3,68±0,32**	2,25±0,63
Арахінова	$C_{20:0}$	сліди	0,24±0,06*	0,02±0,006
Генейкозанова	$C_{21:0}$	0,55±0,32	0,72±0,39	0,83±0,46
Бегенова	$C_{22:0}$	7,11±0,70	2,63±0,43**	3,08±0,37**
Трикозанова	$C_{23:0}$	сліди	0,30±0,29	0,03±0,006
Тетракозанова	$C_{24:0}$	1,28±0,52	0,09±0,05	0,03±0,006
Пентакозанова	$C_{25:0}$	7,43±0,62	5,67±0,77	4,86±0,66*
Гексакозанова	$C_{26:0}$	0,59±0,32	-	-
∑ ненасичених		40,38±1,08	42,67±1,13	41,95±1,21
∑ насичених		59,62±1,32	57,33±1,23	58,05±1,31

1. $C_{A:0}$ – насичена жирна кислота (А – кількість атомів вуглецю);
2. $C_{A:H}$ – ненасичена жирна кислота (Н – кількість подвійних зв'язків);
3. Сліди – наявність кислоти менше 0,01 %.

сивність ступеня адаптивності та особливості біологічних властивостей *M. bovis* взагалі за багаточисельних пересівів. Дослідження мікроорганізму згаданого штаму, пасажованого 150 разів на такому ж самому середовищі, але з pH 6,5, засвідчило подібну тенденцію: зниження вмісту довголанцюгових і підвищення коротколанцюгових вільних жирних кислот, але сумарне їх співвідношення значно відрізнялося – на середовищі з pH 7,1 (100 та 124 пересіви) 1 : 10; з pH 6,5 (130 та 150 пересів) – 1 : 6,5 [7]. Ці дані свідчать про те, що більш інтенсивно адаптивно змінюється ліпідний склад мікобактерій (у 1,5 раза), які пасажувалися через щільне живильне середовище з pH 7,1, ніж мікобактерій, які пасажувалися на середовищі з pH 6,5. Це підтверджує і якісний склад мікобактерій одного штаму, досліджених на середовищі з різним pH. Якщо на середовищі з pH 6,5 до 130 пересіву мікобактерії вміщували на діагностичному рівні тільки три довголанцюгових жирних кислоти (C_{21}; C_{22}; C_{25}) зі семи наявних у вихідного варіанта збудника, то у мікобактерій 124 пересіву на середовищі з pH 7,1 їх налічувалося в 1,66 раза більше (тобто п'ять із семи).

Більш широкий якісний набір довголанцюгових жирних кислот у мікобактерій переконує, що вони володіють більш вираженою вірулентністю, яка у мікобактерій, що пасажувалися через штучне живильне середовище з pH 6,5, не виявлялася вже на 100 пересіві [6]. Це показали досліди на морських свинках, яких заражали мікобактеріями 124 пересіву, накопиченими на середовищі з pH 7,1. Зареєстровано загибель дослідних тварин з типовими патолого-анатомічними ознаками на 45 (одна) та на 52 (одна) добу дослідження. Алергічної реакції у морських свинок на ППД-туберкулін для ссавців (на 30 добу досліду) не виявлено.

Висновки

1. Зі збільшенням кількості пасажів M. bovis через середовище з pH 7,1 змінюється ліпідний склад, який супроводжується тенденційним зниженням вмісту загальних ліпідів, фракцій діацилгліцеролів, стеринів та вільних жирних кислот. На 124 пересіві у мікобактерій знизився вміст довголанцюгових та підвищився вміст коротколанцюгових вільних жирних кислот: не діагностувалася C_{26}, яка вміщувалася в клітинній стінці мікобактерій 59 пасажу.

2. Вірулетність M. bovis, багаторазово пасажованих через середовище з pH 7,1, практично не змінилася, а сенсибілізувальна здатність не виявлена.

Бібліографія

1. Вплив пасажування на біохімічний склад епізоотичного швидкорослого штаму *M. bovis* / [М.В. Зеленська, Л.О. Ковальова, Л.В. Кравцова, О. А. Ткаченко] // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. – 2005. – № 2. – С. 158–160.

2. *Зеленська М.В.* Ліпідний склад та вірулентність *Mycobacterium bovis*, виділених від великої рогатої худоби степової зони України: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук: спец. 16.00.03 "Ветеринарна мікробіологія та вірусологія" / М.В. Зеленська. – Одеса, 2006. – 18 с.

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

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

5. *Манченко В.М.* Настанова по діагностиці туберкульозу / В.М. Манченко, З.Р. Троценко, М.С. Павленко. – К., 1994. – 39 с.

6. *Ткаченко О.* Вільні жирні кислоти – фактори патогенності M. bovis / О. Ткаченко, М. Зеленська, Л. Ковальова // Збірник наукових праць Луганського НАУ. – Ветеринарні науки № 78/101. – Луганськ, 2007. – С. 613–620.

7. *Ткаченко О.* Ліпідний склад *M.bovis* за тривалого пасажу швидкорослого штаму на щільному живильному середовищі з pH 6,5/ О. Ткаченко, М. Білан // Ветеринарна медицина України. – 2009. – № 4. – С. 34–36.

8. *Ященко Т.Н.* Руководство по лабораторным исследованиям при туберкулёзе / Т.Н. Ященко, И.С. Мечева. – М. : Медицина, 1973. – 260 с.