

# ЛІПІДНИЙ СКЛАД *M. BOVIS* ЗА ТРИВАЛОГО ПАСАЖУ ШВИДКОРОСЛОГО ШТАМУ НА ЩІЛЬНОМУ ЖИВИЛЬНОМУ СЕРЕДОВИЩІ З pH 6,5

**О.А. ТКАЧЕНКО**, доктор ветеринарних наук, професор  
**М.В. БІЛАН**, кандидат ветеринарних наук  
**Л.О. КОВАЛЬОВА**, здобувач  
**В.В. ЗАЖАРСЬКИЙ**, кандидат ветеринарних наук, доцент  
 Дніпропетровський державний аграрний університет

відповідно в 2 та 2,2 раза нижче за вихідний рівень.

Розподіл загальних ліпідів на фракції у *M. bovis*, які пасажувалися 130 і 150 разів, виявив динамічні зміни (рис. 2) в усіх досліджених шести фракціях. Динаміка зрушень виявилася неоднозначною: вміст одних фракцій підвищувався, інші знижувався. Так, рівень фосфоліпідів, триацилгліцеролів, ефірів стеринів вірогідно знизився (порівняно з вихідними даними) у 1,2 раза, а вільних жирних кислот, діацилгліцеролів, стеринів вірогідно підвищився у 1,1–1,3 раза.

В цілому фракція вільних жирних кислот у динаміці пасажів *M. bovis* мала тенденцію до вірогідного підвищення їх рівня, також суттєво змінився її якісний та кількісний склад (рис. 3). Так, якщо у *M. bovis* вихідного варіанта виділяли 19 вільних жирних кислот, то на 130-му пасажі їх кількість зменшилася практично до 14, а на 150-му – до десяти.

Варто відзначити, що на 150-му пасажі абсолютно зникли зі складу клітинної оболонки такі кислоти, як тридеканова, гексакозанова та гептокозанова. Останні дві не виявлялися вже на 130-му пасажі. Проте кількісний склад окремих вільних жирних кислот мав тенденцію до підвищення або зниження. При цьому динаміка останніх суттєво переважала. На загальному фоні зниження кількість кислот, таких як пальмітинова, олеїнова та стеаринова, суттєво підвищилася на 130-му і 150-му пасажі порівняно з вихідним (другим) у 1,1–1,9 раза.

Отримані дані свідчать, що пасажі *M. bovis* через ячне живильне середовище з pH 6,5 суттєво впливають на їх кількісний та якісний склад. Це може призводити до зміни біологічної активності мікроорганізму.

Адаптивні фізіологічні процеси мікробної клітини зумовлюють зміни співвідношення суми насичених й ненасичених жирних кислот. Як видно з

нах Silufol (Чехія) з наступним кількісним денситометруванням [8].

Визначали компонентний склад фракцій вільних жирних кислот методом газорідної хроматографії на газовому хроматографі Chrom-5 (Чехія) після попереднього метилювання [8]. Якісний аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили шляхом порівняння з часом утримання стандартів, а кількісний – розраховуючи площі піків та визначаючи їх відсотки від загальної площі, яку приймали за 100%. Обчислення і статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою персонального комп'ютера в електронних таблицях Excel програмного пакета Office XP Professional.

Вірулентні властивості у вихідних і пасажованих мікобактерій досліджували на морських свинках за традиційною у ветеринарній медицині методикою [9].

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Результати досліджень загальних ліпідів мікобактерій засвідчили їх тенденцію до зниження в динаміці пасажів. У мікобактерій другого пасажу вміст загальних ліпідів виявився вірогідно вищим, ніж у таких, пасажованих 130 і 150 разів (рис. 1), що



**1. Вміст загальних ліпідів у *M. bovis* (% на наважку)**

**Ф**енотипові зміни мікобактерій, зумовлені адаптивними процесами фізіологічних властивостей, визначаються хімічною будовою, зокрема ліпідами. Кількісний та якісний склад останніх під впливом різних чинників, за повідомленнями певних дослідників [1–7], суттєво змінюється, визначаючи ступінь адаптації до виживання у навколишньому середовищі, антигенні, сенсibiliзувальні та вірулентні властивості, тобто біологічну активність мікобактерій того чи іншого штаму.

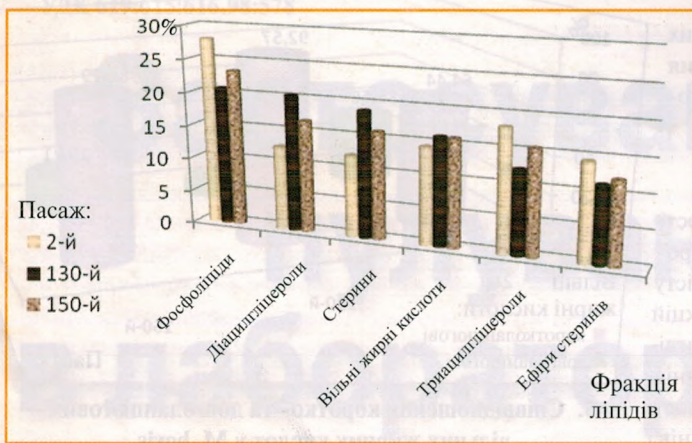
**МЕТОЮ РОБОТИ** було вивчення ліпідного складу *M. bovis*, пасаж якого здійснювався багато разів на штучному живильному середовищі з pH 6,5.

## МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ

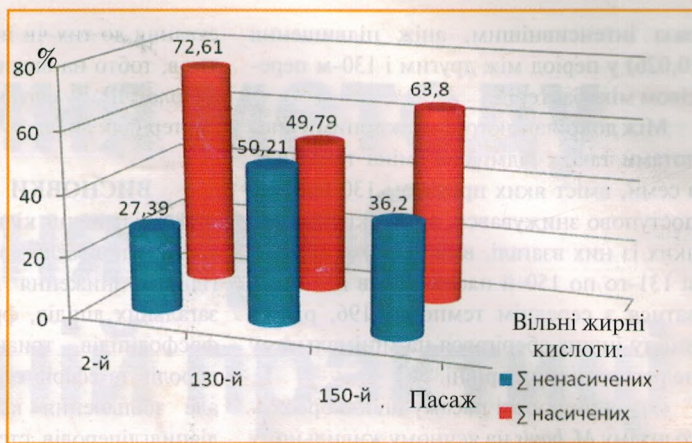
Роботу виконували у навчально-дослідній лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпропетровського державного аграрного університету і в НДІ біології Дніпропетровського національного університету.

Досліджували біомасу *M. bovis* після багаторазового пасажу на ячному живильному середовищі. Для цього використовували культуру, яку проводили 2, 130 та 150 разів і накопичували на ячному живильному середовищі для культивування мікобактерій з pH 6,5. Процес тривав протягом 30 днів за  $t\ 37^{\circ}\text{C}$ . За станом посівів спостерігали щоденно, відмічаючи початок росту, його інтенсивність, культуральні ознаки.

Виділення загальних ліпідів здійснювали за методикою Фолча в модифікації Блайя–Дайера, а їх фракційний склад вивчали методом тонкошарової хроматографії на силікагелевих пласти-



2. Динаміка вмісту фракцій ліпідів у *M. bovis*



4. Співвідношення ненасичених та насичених жирних кислот у *M. bovis*

рис. 4, численні пасажі суттєво вплинули на збільшення вмісту ненасичених кислот – насичених. Якщо перших на початку досліджень виявлено 27,39%, то на 130–150-му пасажах – 43,2%, що в 1,6 раза більше, ніж у мікобактерій вихідного варіанта.

Підвищення вмісту ненасичених жирних кислот може свідчити про посилення адаптивних фізіологічних процесів у мікробній клітині за несприятливих умов, зокрема постійних тривалих пересівів. Хоча слід відзначити, що це досить умовний висновок, оскільки вивчення характеру та строків формування колоній на середовищах із різним значенням рН свідчить про досить оптимальні умови середовища з рН 6,5 для розмноження мікобактерій. Це, напевно, обмежено певною

потенційною здатністю, бо зі 120-го пересіву мікобактерії втратили вихідну властивість – швидкість розмноження.

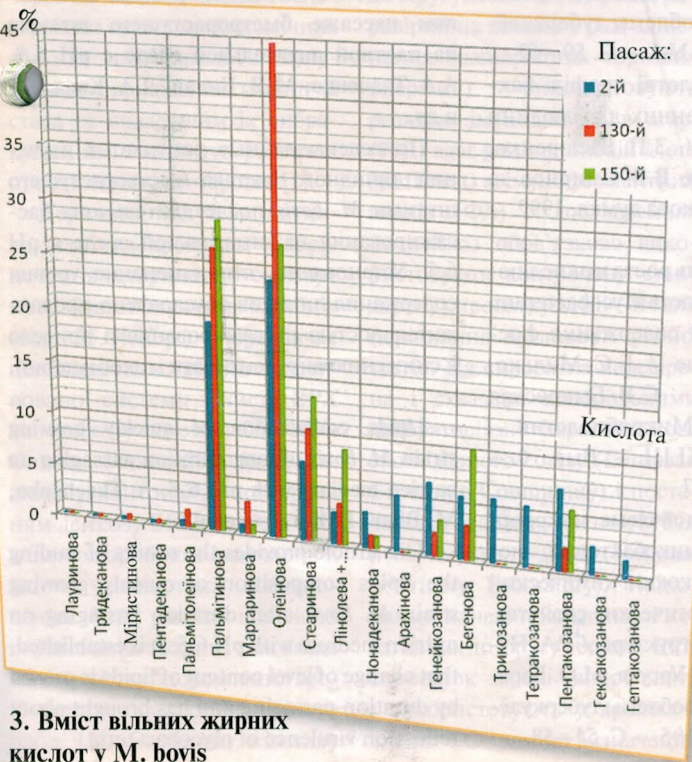
Зі збільшенням кількості пересівів мікобактерій суттєво знижується вміст довголанцюгових і підвищується – коротколанцюгових жирних кислот (рис. 5). Так, якщо співвідношення цих кислот у вихідному зразку мікобактерій становило 1:1,8, то у пасажах 130 і 150 разів – 1:6,5. Така тенденція до збільшення кількості коротколанцюгових жирних кислот відмічалась і на 40-му та 80-му пасажах досліджуваного швидкорослого штаму *M. bovis* [10].

Без сумніву, зниження вмісту довголанцюгових жирних кислот на фоні підвищення вмісту коротколанцюгових свідчить не лише про адаптивні фізіологічні процеси

пасажів через штучне живильне середовище значною мірою залежать від інтенсивності адаптивних процесів з перебудови мікобактерій. Зокрема, це стосується швидкості розмноження мікобактерій на штучному живильному середовищі. До 123-го пересіву досліджуваний штам *M. bovis* формував колонії на другий-третій день з дня висіву завісі мікобактерій з подальшим сповільненням характеризованої властивості, тобто на 8–15-й день культивування. У зв'язку з цим доцільним виявився аналіз даних тенденції підвищення або ж зниження вмісту вільних жирних кислот.

Результати засвідчили (див. таблицю), що швидкість розмноження мікобактерій тісно пов'язана з темпом зміни вмісту вільних жирних кислот. Так, до 130-го пасажу практично всі (окрім  $C_{19:0}$ ,  $C_{20:0}$ ) коротколанцюгові кислоти ( $C_{12:0}$ – $C_{18:2}$ + $C_{18:3}$ ) мали тенденцію до підвищення з темпом за кожного пасажу 0,026; довголанцюгові, навпаки, мали тенденцію до зниження із середнім темпом 0,14. Тобто темп зниження останніх виявився інтенсивнішим у 5,38 раза порівняно з темпом підвищення вмісту коротколанцюгових вільних жирних кислот.

На стадії сповільнення процесу розмноження мікобактерій, від 131-го до 150-го пересіву, на відміну від попередньої (2–130) відмічено порушення виявленої закономірності щодо підвищення та зниження вмісту вільних жирних кислот. Так, вміст переважної більшості коротколанцюгових кислот (вісім із 12) почав знижуватися з темпом 0,139 за кожного пасажу, інші три ( $C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}$ ,  $C_{18:2}$ + $C_{18:3}$ ) продовжували підвищуватися з темпом 0,177, тільки вміст арахідової жирної кислоти стабільно лишався на мініальному рівні у вигляді слідів (менше 0,01%). При цьому темп зниження виявився у 5,35



3. Вміст вільних жирних кислот у *M. bovis*

паза інтенсивнішим, аніж підвищення (0,026) у період між другим і 130-м перевітом мікобактерій.

Між довголанцюговими жирними кислотами також відмічена зміна тенденції: з семи, вміст яких протягом 130 пасажів поступово знижувався, до зникнення деяких із них взагалі, вміст трьох (42,85%) зі 131-го по 150-й пасаж почав підвищуватися з середнім темпом 0,196, рівень вмісту інших зберігався на мінімальному недиагностичному рівні.

Отже, у процесі пасажу швидкорослого штаму *M. bovis* на яєчному живильному середовищі з рН 6,5 було виявлено зміни як у загальному, так і у фракційному складі ліпідів та вільних жирних кислот.

Зі зміною швидкості розмноження мікобактерій суттєво змінюється напрямок тенденції та темп зниження чи підвищення вмісту вільних жирних кислот.

Проаналізовані показники ліпідного складу в динаміці численних пересівів взаємопов'язані та спрямовані на присто-

сування до тих чи інших умов, тобто на виживання у біологічному світі мікобактерій як виду.

### ВИСНОВКИ

1. Збільшення кількості пасажів призвело до вірогідного зниження вмісту загальних ліпідів, фракцій фосфоліпідів, триацилгліцеролів та ефірів стеринів, але збільшення кількості діацилгліцеролів, стеринів і вільних жирних кислот.

2. Сповільнення розмноження мікобактерій супроводжується суттєвою зміною напрямку тенденції та темпу зниження чи підвищення вмісту вільних жирних кислот як коротко-, так і довголанцюгових.

3. Тенденція до зниження ненасичених та довголанцюгових жирних кислот на фоні збільшення насичених і коротколанцюгових вказує на адаптивні фізіологічні процеси у мікобактерій за тривалого пасажу на живильному середовищі та втрату вірулентності.



5. Співвідношення коротко- та довголанцюгових вільних жирних кислот у *M. bovis*

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

7. Петровская В.Г. Проблема вирулентности бактерий (химические, метаболические, экологические и генетические аспекты). – Л.: Медицина, 1967. – 264 с.

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

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

10. Бусол В.О., Зеленська М.В., Ковальова Л.О. та ін. Біохімічний склад швидкорослого штаму *M. bovis* в залежності від тривалості пасажування // Ветеринарна медицина України. – 2006. – №2. – С. 20–22.

### РЕЗЮМЕ

Липидный состав *M. bovis* при длительном пассаже быстрорастущего штамма на плотной питательной среде с рН 6,5. А.А. Ткаченко, М.В. Билан, Л.А. Ковалева и др.

Приведены данные результатов изучения липидного состава быстрорастущего штамма *M. bovis* после длительного пассажирования на питательной среде с рН 6,5. Установлено, что изменение уровня содержания липидов обусловлено продолжительностью пассажирования и привело к снижению вирулентности микобактерий.

Lipids composition of quickly growing strain *M. bovis* of long duration passaging on nutrient medium with pH 6,5. A. Tkachenko, M. Bilan, L. Kovaleva et al.

This article provides the results of studying the lipids composition of quickly growing strain *M. bovis* after duration passaging on nutrient medium with pH 6,5. It is established, that change of level content of lipids is caused by duration passaging and has brought about reduction virulence of mycobacteria.

### Темп зниження (підвищення) вмісту вільних жирних кислот мікобактерій за тривалого пасажу штаму

Вільна жирна кислота	Код	Темп, %	
		від 2 до 130	від 131 до 150
Лауринова	C <sub>12:0</sub>	0,00046	0,00495
Тридеканова	C <sub>13:0</sub>	0,0003	0,007
Міристинова	C <sub>14:0</sub>	0,001	0,025
Пентадеканова	C <sub>15:0</sub>	0,0008	0,016
Пальмітолеїнова	C <sub>16:1</sub>	0,008	0,077
Пальмітинова	C <sub>16:0</sub>	0,052	0,127
Маргарінова	C <sub>17:0</sub>	0,017	0,107
Олеїнова	C <sub>18:1</sub>	0,160	0,878
Стеаринова	C <sub>18:0</sub>	0,024	0,150
Лінолева + ліноленова	C <sub>18:2</sub> +C <sub>18:3</sub>	0,006	0,255
Нонадеканова	C <sub>19:0</sub>	0,016	0,004
Арахінова	C <sub>20:0</sub>	0,040	—
Гейкозанова	C <sub>21:0</sub>	0,035	0,062
Бегенова	C <sub>22:0</sub>	0,020	0,35
Трикозанова	C <sub>23:0</sub>	0,45	—
Тетракозанова	C <sub>24:0</sub>	0,42	—
Пентакозанова	C <sub>25:0</sub>	0,040	0,176
Гексакозанова	C <sub>26:0</sub>	0,019	—
Гептакозанова	C <sub>27:0</sub>	0,012	—
Середнє		0,069	0,159
Σ ненасичених		0,175	0,700
Σ насичених		0,175	0,700
Σ коротколанцюгових	C <sub>12:0</sub> +C <sub>20:0</sub>	0,216	0,589
Σ довголанцюгових	C <sub>21:0</sub> +C <sub>27:0</sub>	0,216	0,589

Примітки: C<sub>A:0</sub> – насичена жирна кислота (А – кількість атомів вуглецю); C<sub>A:H</sub> – ненасичена жирна кислота (Н – кількість подвійних зв'язків); сліди – наявність кислоти менше 0,01%

### ЛІТЕРАТУРА

1. Вейсфейлер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулёза и атипичные микобактерии. – Будапешт: Изд-во АН Венгрии, 1975. – 336 с.

2. Гизатулина Н.М. Липидные и углеводные компоненты микобактерий и методы их определения // Проблемы туберкулёза. – 1996. – №4. – С. 59–62.

3. Жирнокислотні профілі бактерій, патогенних для людини та тварин / З.П. Васюренко, А.Ф. Фролов, В.В. Смирнов та ін. – К.: Наукова думка, 1992. – 264 с.

4. Зависимость роста и окисляющая способность *Mycobacterium lacticolum* от содержания фосфора в среде / Е.С. Милько, Н.С. Егоров, С.В. Быковская и др. // Микробиология. – 1974. – Т. XLIII. – Вып. 6. – С. 1022–1027.

5. Кислотоустойчивые микроорганизмы – микобактерии, нокардии, родококки: химический состав, биологические свойства, антигенная структура / Р.А. Нуратинов, К.Р. Ургув, М.О. Баратов и др. // Проблемы туберкулёза. – 2001. – №5. – С. 54–58.