УДК 619:616.93:579.673.21:636

ВПЛИВ pH ШТУЧНОГО ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА БІОХІМІЧНИЙ СКЛАД ШВИДКОРОСЛОГО ШТАМУ M. BOVIS

Марина ЗЕЛЕНСЬКА, Геннадій ХІЛЬЧЕНКО, аспіранти
Людмила КРАВЦОВА, кандидат біологічних наук
Олексій ТКАЧЕНКО, доктор ветеринарних наук
Дніпропетровський державний аграрний університет

У світі прокаріотів мікобактерії займають особливе місце, бо їх ліпіди надзвичайно різноманітні й складні. Загальний склад ліпідів у клітинах мікобактерій становить 10–60%, у той час як у клітинах інших прокаріотів не перевищує 5% [4, 8, 9]. Високий вміст загальних ліпідів обумовлений високою стійкістю мікобактерій до несприятливих умов навколишнього середовища.

Основну масу ліпідів у мікобактерій сконцентровано в оболонці клітини, яка за складністю організації є унікальним утворенням і не має аналогів серед інших прокаріотичних клітин [5, 8].

Саме клітинна стінка мікобактерій туберкульозу становить певний інтерес, бо в першу чергу стикається із тканинами макроорганізму. Нині знання ультраструктури компонентів клітинної стінки необхідні для більш глибокого розуміння тих змін, які відбуваються в ній за трансформації в умовах живого організму, і розробки заходів боротьби з туберкульозом [2]. Актуальними в цьому плані є порівняльні дослідження хімічного складу мікобактерій, культивованих на середовищах із різним pH, оскільки на таких, з більш підвищеним вмістом кислотних грам-еквівалентів, відмічається значно вища адаптивна здатність збудника туберкульозу [1]. Особливо важливими можуть виявитися дослідження мікобактерій зі зміненими властивостями, що може поглибити знання патогенезу хвороби [10].

МЕТОЮ РОБОТИ було вивчення хімічного складу ліпідів швидкорослого штаму M. bovis, пасажованого через штучне живильне середовище з різним pH.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

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

Для дослідження використовували біомасу епізоотичного штаму M. bovis (друга генерація штаму мікобактерій вихідної культури, зразок 1), виділеного з лімфатичних вузлів реагуючої на туберкулін корови та накопиченого на вдосконаленому кафедрою епізоотології ДДАУ живильному середовищі для культивування мікобактерій (pH 6,5) при температурі 37°C протягом 30 діб. Із третього пасажу даний штам почав формувати колонії на другу добу після посіву.

У подальшому мікобактерії швидкорослого штаму накопичували протягом 30 діб на тому ж середовищі тільки з pH 7,1 (зразок 2) та з pH 6,5 (зразок 3) при температурі 37°C. Результати досліджень хімічного складу порівнювали з вихідною культурою.

Виділення загальних ліпідів із досліджуваних зразків проводили за методикою Фолча в модифікації Блая-Дайєра, а їх вміст і фракційний склад вивчали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на силікагелевих пластинах Silufol (Чехія) з наступним кількісним денситометруванням [3].

Компонентний склад фракцій вільних жирних кислот (ВЖК) у біомасі зразків визначали методом газорідинної хроматографії (ГРХ) на газовому хроматографі Chrom-5 (Чехія) після попереднього метилювання, бо тільки у вигляді ефірів ВЖК можна аналізувати ГРХ-методом [3]. Якісний аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили шляхом порівняння із часом утримання стандартів, а кількісний – розрахуванням площі піків та визначенням їх відсотка від загальної площі піків, яку приймали за 100%. Обчислення та статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою персонального комп'ютера в електронних таблицях Excel програмного пакета Office XP Professional.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

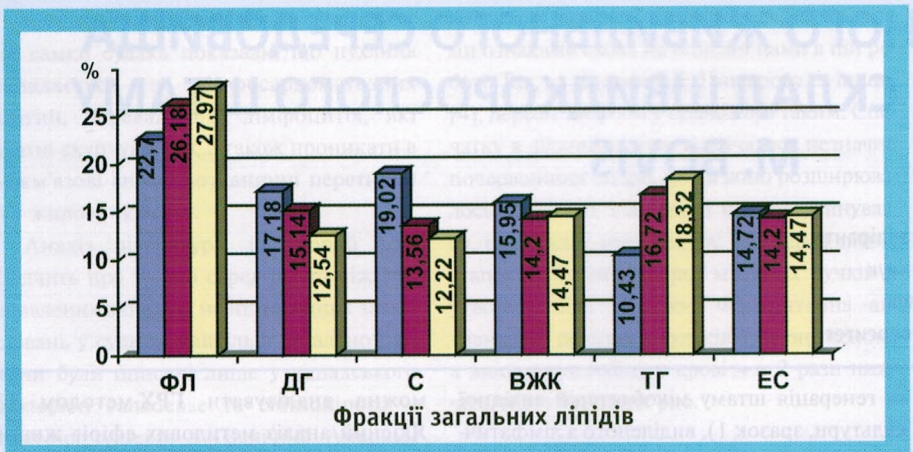
Максимальну кількість загальних ліпідів було виявлено в зразку 2, а в зразках 1 та 3 їх рівень був відповідно в 1,3 і 2 рази нижчим (рис. 1), що може свідчити про більш високу вірулентність мікобактерій зразка 2, оскільки відомо, що вміст ліпідів обумовлює патогенність і вірулентність [4].

За допомогою тонкошарової хроматографії визначали декілька основних фракцій ліпідів, у т. ч. полярні ліпіди (фосфоліпіди – ФЛ) (рис. 2).

Фосфоліпіди як основні структурні компоненти цитоплазматичних і мезосомальних мембран не тільки захищають клітину від згубного впливу навколишнього середови-



1. Вміст загальних ліпідів штамів M. bovis, %:
— вихідний штам M. Bovis, середовище з pH 6,5;
— швидкорослий штам M. Bovis, середовище з pH 7,1;
— швидкорослий штам M. Bovis, середовище з pH 6,5



2. Склад фракцій ліпідів у зразках (ТШХ-аналіз), % від суми:
— вихідний штам M. Bovis, середовище з pH 6,5;
— швидкорослий штам M. Bovis, середовище з pH 7,1;
— швидкорослий штам M. Bovis, середовище з pH 6,5

ща, витримуючи значний осмотичний тиск, а й регулюють дифузію і транспорт речовин через оболонку, а також активність ферментних систем, розташованих асиметрично на внутрішньому боці бішарової мембрани. Виконання цих важливих функцій обумовлено унікальною здатністю фосфоліпідів до орієнтації, агрегації, пакування, а також до асоціації з іншими сполуками – білками, ліпополісахаридами тощо [8].

Більшу частину ліпідних фракцій становлять нейтральні ліпіди (ді- (ДГ), триацилгліцероли (ТГ), стерини (С), ефіри стеринів (ЕС)). Триацилгліцероли – найбільша фракція нейтральних ліпідів мікобактерій. Це ефіри гліцерину і жирних кислот, які етерифікують усі три його гідроксильні групи. Вони вміщують тверді насичені (пальмітинову, стеаринову, гексакозанову), рідкі ненасичені (олеїнову, лінолеву, ліноленову, кротонову, ізокротонову) і розгалужені жирні кислоти (туберкулостеаринову і фтіонову).

Якщо у тварин і рослин ця група нейтральних жирів є запасною, то бактеріальна клітина не резервує їх, а використовує як проміжні метаболіти із широким спектром біологічних властивостей. Вони здатні стимулювати на шкірі здорових тварин утворення специфічних гранульом, які складаються із моноцитів й епітеліоїдних клітин; у разі повторного введення – появу туберкул. Триацилгліцероли послаблюють резистентність організму до туберкульозу, при цьому фтіонова кислота активно гальмує міграцію лейкоцитів [6].

Як засвідчили наші дослідження, у зразках 2 та 3 швидкорослого штаму M. bovis відмічається підвищений вміст фосфоліпідів і триацилгліцеролів на відміну від вихідної культури, в якій переважають діацилгліцероли, стерини, вільні жирні кислоти та ефіри стеринів.

При порівнянні зразків швидкорослого штаму M. bovis, культивованих на однакових середовищах із різним pH, виявили, що в зразку 2 (pH 7,1) більше діацилгліцеролів та стеринів, ніж у зразку 3 (pH 6,5), де переважають фосфоліпіди і триацилгліцероли. У той же час кількість ефірів стеринів і ВЖК практично не змінюється залежно від pH середовища.

Максимальний вміст ВЖК виявлено в зразку 1.

Методом газорідинної хроматографії було визначено жирнокислотний склад фракції вільних жирних кислот (див. таблицю).

У патогенних і непатогенних мікобактерій він в основному однаковий [9] і складається із насичених жирних кислот C_{12}–C_{24}, а також невеликої кількості ненасичених і розгалужених аналогів цих кислот.

Нашими дослідженнями виявлено високий вміст насичених жирних кислот у зразках 1 та 3 із pH середовища 6,5. У штамі M. bovis, культивованому на середовищі з pH 7,1 (зразок 2), сума насичених ВЖК становила всього 42%, а ненасичених – 58%. Можливо, це пов'язано з порушенням рівня метаболізму мікобактерій при зміні pH середовища в лужний бік. Під час адаптації мікроорганізмів до несприятливих умов середовища включається механізм регуляції жирнокислотного складу і збільшується вміст ненасичених

Вміст вільних жирних кислот у зразках, % від суми

ВЖК	Код	Зразок		
		1	2	3
Лауринова	$C_{12:0}$	0,15±0,01	0,01±0,004***	0,04±0,02**
Тридеканова	$C_{13:0}$	Сліди	0,07±0,01**	0,10±0,02**
Миристинова	$C_{14:0}$	0,26±0,02	0,16±0,02**	0,27±0,04**
Пентадеканова	$C_{15:0}$	Сліди	0,16±0,04*	0,22±0,02***
Пальмітолеїнова	$C_{16:1}$	1,54±0,03	0,87±0,04***	0,55±0,07***
Пальмітинова	$C_{16:0}$	28,49±1,43	30,52±0,45	19,62±0,53**
Маргаринова	$C_{17:0}$	Сліди	Сліди	0,81±0,07***
Олеїнова	$C_{18:1}$	28,39±1,34	56,57±0,51***	23,87±0,60*
Стеаринова	$C_{18:0}$	15,09±0,56	Сліди	7,42±0,11***
Лінолева+ліноленова	$C_{18:2}$+$C_{18:3}$	2,44±0,06	0,54±0,08***	2,97±0,16*
Нонадеканова	$C_{19:0}$	0,39±0,02	0,73±0,05**	3,34±0,06***
Арахінова	$C_{20:0}$	17,47±0,54	3,38±0,27***	5,23±0,14***
Генейкозанова	$C_{21:0}$	1,29±0,03	1,16±0,23	6,74±0,23***
Бегенова	$C_{22:0}$	1,54±0,05	0,18±0,05***	5,78±0,18***
Трикозанова	$C_{23:0}$	Сліди	Сліди	5,89±0,35***
Тетракозанова	$C_{24:0}$	0,65±0,03	0,60±0,2	5,57±0,19***
Пентакозанова	$C_{25:0}$	2,30±0,09	4,84±0,29**	7,43±0,26***
Гексакозанова	$C_{26:0}$	Сліди	0,12±0,05	2,53±0,3**
Гептакозанова	$C_{27:0}$	Сліди	0,09±0,03*	1,62±0,19**
∑ ненасичених		32,37±0,9	57,98±0,43***	27,39±0,44**
∑ насичених		67,63±1,78	42,02±0,23***	72,61±0,5

** P≤0,05; ** P≤0,01; *** P≤0,001*

Примітки: *$C_{A:0}$ — насичена жирна кислота (A — кількість атомів вуглецю);*
$C_{A:H}$ — ненасичена жирна кислота (H — кількість подвійних зв'язків)

жирних кислот [2, 5]. Саме це спостерігалося в наших дослідженнях.

У біомасі мікобактерій усіх зразків виявлено велику кількість пальмітинової кислоти, яка є основним компонентом суміші вільних жирних кислот у мікобактерій [9]. Найбільша її кількість була у зразках 2 та 1. Достатньо суттєвий вміст жирних кислот $C_{21:0}$–$C_{24:0}$ відмічався у зразку 3 з pH середовища 6,5 на відміну від зразків 1 та 2, тобто знову незалежно від pH середовища. Не впливає pH середовища і на вміст пентакозанової кислоти, але спостерігається різниця в її кількості залежно від штаму – у швидкорослого M. bovis (зразки 2 та 3) вміст цієї кислоти в два–три рази більший, ніж у вихідного (зразок 1).

Однак у співвідношенні деяких вільних жирних кислот виявляються зміни залежно від pH середовища. Так, під час культивування вихідного і швидкорослого штамів на середовищі з pH 6,5 переважали стеаринова й арахінова кислоти (15 і 17 проти 7 і 5% відповідно), а при pH 7,1 їх кількість знижувалася в 5 і більше разів. Проте при pH середовища 7,1 у культурі різко збільшувався вміст олеїнової кислоти, тоді як у вихідного та швидкорослого штамів (зразок 1 і 3) на середовищі з pH 6,5 її було в 2 рази менше при одночасному збільшенні в 5 разів суми лінолевої та ліноленової кислот (2,44 і 2,97% відповідно).

Зниження вмісту ненасичених жирних кислот на користь насичених на середовищі з pH 6,5 у вихідного і швидкорослого штамів свідчить про те, що цей показник більш сприятливий для росту та розвитку M. bovis, оскільки переважання насичених ВЖК звичайно характерно для мікобактерій [8].

Отже, наші дослідження показали, що при культивуванні швидкорослого штаму M. bovis на живильному середовищі одного складу, але з різним pH спостерігаються зміни як у загальному, так і у фракційному складі ліпідів. Ці зміни стосуються рівня метаболізму M. bovis і повністю підтверджують епізоотологічні спостереження та теоретико-експериментальні дані попередніх досліджень [1], в яких відмічали, що рівень вмісту кислотних грам-еквівалентів внутрішнього середовища тварини і штучного живильного середовища активізує (при кислому) або ж пригнічує (при більш лужному середовищі) адаптивну здатність мікобактерій. Деякі автори [5] вважають, що ці прояви зумовлені можливою захисною перебудовою метаболізму клітин у разі несприятливих умов, наприклад зневоднення. На нашу думку, це можна пов'язати зі змінами pH середовища в негативний бік. У клітинах мікобактерій ненасичені жирні кислоти при вбудовуванні в ліпіди мембран, можливо, викликають збільшення їх плинності [4]. Це сприяє виживанню клітин, якщо змінюються температура, pH середовища тощо. Коливання у вмісті деяких насичених та ненасичених жирних кислот у клітинних стінках мікобактерій відображають найскоріше фізіологічні особливості клітин і, можливо, корелюють зі швидкістю дихання та фазою росту популяції в цілому, а також із фізико-хімічним станом (плинністю) ліпідів мембран і напрямком адаптаційних процесів [7].

ВИСНОВКИ

1. У біомасі швидкорослої культури M. bovis, одержаної на середовищі з pH 7,1, кількість загальних ліпідів в 1,3–2 рази вище, ніж у вихідному та швидкорослому штамі, культивованому на середовищі з pH 6,5. В обох зразках швидкорослого штаму M. bovis відмічено підвищений вміст фосфоліпідів і триацилгліцеролів порівняно з вихідною культурою, в якій переважають діацилгліцероли, стерини, вільні жирні кислоти та ефіри стеринів. У біомасі швидкорослого штаму M. bovis, культивованого на середовищі з pH 7,1, переважає кількість діацилгліцеролів і стеринів, а при вирощуванні на середовищі з pH 6,5 спостерігається більше фосфоліпідів та триацилгліцеролів, що зумовлено впливом кислотно-лужних грам-еквівалентів на синтез хімічних складових мікобактерій.

2. У зразках мікобактерій, культивованих на середовищі з pH 6,5, рівень насичених жирних кислот вищий у 1,6 – 1,7 раза, ніж при культивуванні на середовищі з pH 7,1. Ненасичені жирні кислоти домінують у мікобактеріях, культивованих на середовищі з pH 7,1. Підвищення рівня ненасичених жирних кислот має адаптивний характер та є результатом регуляції жирнокислотного складу й активації синтетазних систем при порушенні рівня метаболізму.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Ткаченко О.А., Орлов М.І., Хозей В.Ю. й ін.** Біологічна активність мікобактерій і резервна лужність живильного середовища // Науковий вісник Львівської державної академії ветеринарної медицини ім. С.З. Гжицького. – Львів, 2001. – Т. 3 (№ 4), вип. 3. – С. 107–115.

2. **Жирнокислотні** профілі бактерій, патогенних для людини та тварин / Васюренко З.П., Фролов А.Ф., Смирнов В.В., Рубан Н.М. – К.: Наукова думка, 1992. – 264 с.

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

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

5. **Зикманис П.Б., Аузиня Л.П., Аизон С.И., Беккер М.Е.** Коэффициент ненасыщенности жирнокислотного состава и резистентности дрожжей Saccharomyces coavisiae 14 к обезвоживанию // Тезисы докл. Всесоюзн. симпозиума «Липиды биологических мембран». – Ташкент, 1980. – С. 57.

6. **Дикий И.Л., Холупяк И.Ю., Шевелёва Н.Е., Стегний М.Ю.** Микробиология. – К.: ИД «Профессионал», 2004. – 624 с.

7. **Пинчук Л.М., Воронова Е.А.** Изучение бактериальных жирных кислот в таксономических целях // Биохимия и биофизика микроорганизмов: Сб. науч. тр. – Горький, 1982. – С. 36 – 41.

8. **Пинчук Л.М., Лазовская А.Л.** Липиды в таксономии и идентификации микобактерий. – Горький, 1989. – 128 с.

9. **Рубан Е.Р.** Микробные липиды и липазы. – М.: Наука, 1977. – 218 с.

10. **Ткаченко О.** Швидкорослі M. bovis у проблемі туберкульозу // Ветеринарна медицина України. – 2004. – № 7. – С. 14–17.

РЕЗЮМЕ

Влияние pH искусственной питательной среды на биохимический состав быстрорастущего штамма M. bovis. М.В. Зеленская, Г.И. Хильченко, Л.В. Кравцова и др.

Обнаружено, что выращивание быстрорастущего штамма M. bovis на питательной среде с различным pH сопровождается изменениями как в общем, так и фракционном составе липидов. Утверждается, что это обусловлено влиянием кислотно-щелочных грамм-эквивалентов на синтез химических составляющих микобактерий.

Influence of pH artificial nutrient medium on biochemical composition of quickly growing strain M. bovis. M.V. Zelenskaya, G.I. Khilchenko, L.V. Kravtsova et al.

It is revealet, that the cultivation of quickly growing strain M. bovis on nutrient medium with different pH is accompanied by changes both in common and fractional composition of lipids. This is caused by influence of acid-base gram-equivalents on synthesis of chemical components of mycobacteria.