УДК 619:616.93:579.673.21:636

О.А. ТКАЧЕНКО, доктор ветеринарних наук, професор
П.О. ДАВИДЕНКО, аспірант
В.В. ЗАЖАРСЬКИЙ, кандидат ветеринарних наук, доцент
М.В. БІЛАН, кандидат ветеринарних наук, доцент
В.В. МІСКІВ, аспірант
А.В. КОВАЛЬОВ, здобувач
Дніпропетровський державний аграрний університет

ЛІПІДНИЙ СКЛАД ДИСОЦІАТИВНИХ ФОРМ M. BOVIS

У статті подаються результати дослідження ліпідного складу M. bovis дисоціативних форм, зокрема й L-форм.

Дисоціативні форми мікобактерій, їх культуральні властивості та морфологічні ознаки, вивчені й опубліковані у журналі «Ветеринарна медицина України» 2010 р., потребують подальших досліджень ліпідного складу, оскільки цей рівень пізнання біології збудника може наблизити нас до розуміння механізмів фено- й генотипових змін [7, 8]. Даних щодо досліджень у цьому напрямку в доступній літературі нами не знайдено, що й зумовило їх проведення .

МЕТА РОБОТИ – вивчення ліпідного складу дисоціативних форм *M. bovis*, які культивовані за температури 3, 20 та 37° С.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Робота проводилась 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. Накопичували культури *M. bovis* усіх пасажів досліду на щільному яєчному середовищі з pH 7,1 у термостаті за t 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 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 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].

Досліджували загальні ліпіди, їх фракційний склад, а також компонентний склад фракції вільних жирних кислот мікобактерій за методикою, описаною нами раніше [1, 5].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Із таблиці видно, що *M. bovis* дисоціативних форм містять невелику кількість (у 1,3–3,7 раза менше) загальних ліпідів порівняно з контрольним варіантом мікобактерій (100+124 пасаж/2), який культивовано за t 37°С.

З підвищенням температури культивування у дисоціативних формах *M. bovis* трьох варіантів з чотирьох збільшувався вміст загальних ліпідів. У *M. bovis* 117 (б) пасажу спостерігалася зворотна закономірність: при культивуванні мікобактерій за t 3°С вміст загальних ліпідів становив 2,96±0,37%, а за 37°С – 2,2±0,31%. Якщо у мікобактерій 117 (а) і 117 (в) з підвищенням температури незначно збільшувався вміст загальних ліпідів, то у мікобактерій 118 пересіву така тенденція була більш вираженою (1,20±0,50 за t 3°С і 3,63±0,55 за t 37°С): у 3 рази більше, ніж за температури культивування 3°С.

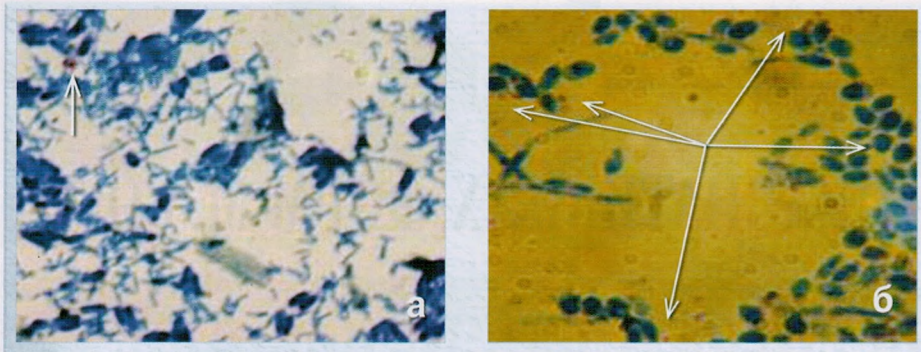
Така відмінність вмісту й динаміки загальних ліпідів у мікобактерій дисоціативних форм зумовлена культуральними властивостями, морфологічними формами, а відтак і біохімічним, зокрема ліпідним, складом клітинної оболонки. Мікобактерії 117 (б) пересіву, маючи явно виражену здатність формувати помаранчевий 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 t 3°С, містили в полі зору мікроскопа тільки поодинокі червоні гранули, то за t 37°С їх значно частіше виявляли не лише всередині кулястих утворень, а й на межі виходу та поряд зі сферопластами (див. рисунок).

Стосовно фракційного складу загальних ліпідів дослідних і контрольних зразків мікобактерій, то привертає увагу той факт, що мікобактерії дисоціативних форм усіх 4 варіантів мали нижчий вміст фосфоліпідів, ніж мікроорганізми контролю, проте з достовірною різницею лише в п'яти випадках із 12. Вміст діацилгліцеролів у контрольному зразку мікобактерій виявився певною мірою тотожним вмісту в дисоціативних формах мікобактерій, де він був трохи вищим або нижчим. І тільки у мікобактерій 118 пересіву вміст діацилгліцеролів значно

Таблиця – **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

© О.А. Ткаченко, П.О. Давиденко, В.В. Зажарський та ін., 2011



M. bovis дисоціативних форм, культивованих за t 3 (а) і 37°С (б).
Примітка: «→» – елементарні тільця

перевищував їх рівень у контролі: достовірна різниця аналізованих показників спостерігалась у 3 випадках (за 3, 20 та 37°С). Вміст стеринів у мікобактеріях контролю був значно нижчим, ніж у 117 (а) і 117 (в) варіантах з достовірною різницею в усіх 6 випадках. Мікобактерії 117 (б) варіанта та 118 пересіву вміщували практично однакову кількість стеринів порівняно з мікобактеріями контролю. Істотної різниці не помічено у вмісті ВЖК мікобактерій контрольного і дослідного зразків за всіх температур культивування. Практично однаковий вміст триацилгліцеролів зафіксовано в контрольному та дослідному зразках мікобактерій за винятком 117 (а) варіанта, де встановлено достовірне підвищення вмісту цієї фракції за температури культивування 20 і 37°С і мікобактерій 118 пересіву за t 37°С.

Естери стеринів значно менше вміщували мікобактерії 118 пересіву, ніж мікобактерії контролю та 117 (а) варіанта за t 37°С, 117 (б) варіанта за 3 і 20°С, 117 (в) – за t 3°С.

Отже, вірулентні мікобактерії мають такий самий якісний фракційний склад клітинної оболонки, що і мікобактерії дисоціативних форм. Найбільші відмінності у кількісному фракційному складі встановлено 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. Також достовірні відмінності, тільки за іншою фракцією – стерини, за всіх температур культивування встановлено у мікобактерій 117 (а) і 117 (в) варіантів.

Щодо вмісту в клітинній оболонці ВЖК досліджуваних варіантів дисоціативних форм *M. bovis*, порівняно з усередненими даними 100 та 124 пересіву (материнська культура), слід зазначити таке: в усіх дослідних зразках виявлено нову ундеканову кислоту $C_{11:0}$, що реєструвалася за всіх температурних режимів культивування, в контрольному зразку згадану кислоту виявлено не було. Водночас у жодному з досліджуваних варіантів мікобактерій не зафіксовано гексаказанової кислоти $C_{26:0}$, яку не виділено і в контрольному зразку 100–124 пересівів.

Слід зазначити, що, за нашими повідомленнями, аналізована ВЖК у материнський культурі цього ж варіанта *M. bovis* не реєструвалася вже із 100 пересіву, pH 7,1, хоча в 59 субкультурі ця кислота містилася (0,59±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, зокрема і L-формах 118 субкультури.

Це свідчить про те, що, незважаючи на зміну морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей (втрата кислотостійкості), наявність згаданих кислот у дисоціативних формах мікобактерій на найвищому рівні залишається постійною і їх рівень взагалі значно вищий, ніж у субкультурах мікобактерій 100 та 124 пересіву. Хоча виявлено деякі відмінності в бік зниження аналізованих кислот. Так, достовірне зниження пальмітинової кислоти помічено у мікобактерій (L-форм 118 субкультури) під час культивування за всіх температурних режимів. Вміст олеїнової кислоти достовірно був нижчим у 117 (а) субкультурі за всіх температурних режимів, у 117 (б) та 117 (в) – нижчий за t 20 і 37°С. Вміст стеаринової кислоти у мікобактерій 117 (б) субкультури за t 3°С, 117 (в) (3°С) і 118 (3°С) був нижчим, а в деяких випадках і достовірним (117 (б) – за 3°С); (118 – за t 3 та 20°С).

Водночас суттєві зрушення на окремих етапах досліджень дисоціативних форм встановлено й у вмісті інших ВЖК. Вміст маргаринової кислоти $C_{17:0}$ у субкультурі 117 (а) пересіву перевищував вміст у контрольному зразку в 8,3 та 11,6 раза. Збільшення вмісту цієї кислоти у 8,8 раза помічено і в 118 пересіві за температури культивування 20°С. Досить показове підвищення рівня вмісту лінолевої, ліноленової кислоти мало місце практично в усіх досліджуваних мікобактерій (117 (а), 117 (б), 117 (в) та 118 пересіву), до того ж тільки за температури культивування 37°С. Досить істотні, щоб звернути на це увагу, зрушення цих кислот помічено в мікобактерій 117 (а) і 118 субкультури за t 20°С, де аналізовані показники становили 7,07±0,56, 8,69±0,44% відповідно. У мікобактерій 117 (б), 117 (в) та 118 субкультури не виявлено нонадеканової та арахінової кислот за температури культивування 37, 20 та 3°С відповідно. Лауринова ВЖК практично не реєструвалася у мікобактерій дослідних зразків. На межі слідів її виявлено тільки за температури культивування 3°С у 117 (а) та 117 (б) субкультур. Водночас слід зазначити, що температура культивування 20°С виявилась 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 pH 6,5 фракція ВЖК у динаміці пасажів *M. bovis* мала загальну тенденцію до вірогідного підвищення їх рівня з істотною зміною якісного та кількісного складу. Так, якщо у *M. bovis* вихідного варіанта виділяли 19 ВЖК, то на 130 пасажі їх кількість зменшилась до 14, а на 150 – до 10. У них, так як і в мікобактерій дисоціативних форм, було виявлено авірулентні властивості [3].

Отже, аналіз вмісту ВЖК у дисоціативних форм мікобактерій засвідчив, що

їхня клітинна оболонка має такий самий якісний і в цілому кількісний склад ВЖК, як і мікобактерії материнської субкультури. Пальмітинова, олеїнова, стеаринова кислоти є базовими ВЖК патогенних мікобактерій [2], містяться і в дисоціативних формах, зазвичай з деякими відхиленнями щодо вмісту. Водночас дисоціація мікобактерій супроводжувалась і синтезом нових кислот, які раніше не фіксувалися в материнській культурі, зокрема ундеканової ($C_{11:0}$).

Аналізуючи вміст довго- та коротколанцюгових вільних жирних кислот клітинної стінки мікобактерій, встановлено, що довголанцюгові жирні кислоти у контролі в сумі становили 9,11%, а коротколанцюгові – 90,89%, у форм мікобактерій дослідних зразків 117 (а, б, в) за t 3°С ці показники були 3,41 та 96,59%; 6,46 і 93,54; 4,03 і 95,97% відповідно. Виняток становили L-форми 118 пересіву, в яких співвідношення коротколанцюгових до довголанцюгових жирних кислот було практично 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 t 20°С вміст довго- та коротколанцюгових вільних жирних кислот був практично таким, як і в мікобактерій контролю.

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

Загалом сума ненасичених жирних кислот у мікобактерій контролю тільки дещо нижча (42,32%), ніж у мікобактерій дослідних варіантів (43,68; 42,96; 51,28%) за температури культивування 3°С. Що ж до температури культивування 20°С, то найбільше відхилення спостерігалося 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 варіантах порівняно з контролем — 22,48; 19,33; 15,15% відповідно, що у 1,89; 2,18; 2,79 раза менше, ніж у контролі.

За температури культивування 37°С сума ненасичених жирних кислот у 117 а, б, в варіантах була в 1,42; 1,29; 2,55 раза менша, ніж у контролі, тоді як у L-форм 118 пересіву вона практично на рівні з контролем.

ВИСНОВКИ

1. Вперше досліджено ліпідний склад *M. bovis* дисоціативних форм, зокрема й L-форм.

2. Вміст загальних ліпідів у *M. bovis* дисоціативних форм значно нижчий за усіх температур культивування, ніж у контролі (100+124 пасаж/2).

3. 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 діацилгліцеролів, ніж мікобактерії материнської культури.

4. Дисоціація мікобактерій на фоні стабільності набору вільних жирних кислот супроводжувалася синтезом нової кислоти – ундеканової ($C_{11:0}$), що може бути характерним для дисоціативних форм. Виявлену особливість доцільно використовувати для ідентифікації та диференціації патогенних та дисоціативних (апатогенних) форм *M. bovis*.

ПЕРСПЕКТИВИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Біологічні властивості *M. bovis* дисоціативних форм, які багаторазово пасажовані через щільне живильне середовище з різним pH та температурою культивування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Кейтс М.** Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. – М.: Мир, 1975. – 322 с.
2. **Коронелли Т.В.** Липиды микобактерий и родственных микроорганизмов. – 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., Кац Л.Н., Каган Г.Я.** L-форми бактерій. – М.: Медицина, 1981. – 239 с.
5. **Савчин М.М.** Сучасна українська номенклатура неорганічних та органічних речовин. – Львів: ВНТЛ, 1999. – 24 с.
6. **Ткаченко О.А., Білан М.В., Давиденко П.О.** Сенсибілізувальні властивості та ліпідний склад *M.bovis*, багаторазово пасажованих через щільне живильне середовище з pH 7,1 // Ветеринарна медицина України. – 2010. – №2. – С. 20–22.
7. **Ткаченко О.А., Білан М.В., Зажарський В.В. та ін.** Біологічні властивості дисоціативних форм *M.bovis*: морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості за температур 3 і 37°С // Ветеринарна медицина України. – 2010. – №12. – С. 27–30.
8. **Ткаченко О.А., Білан М.В., Місків В.В. та ін.** Біологічні властивості дисоціативних форм *M.bovis*: культуральні особливості за температур 3 і 37°С // Ветеринарна медицина України. – 2010. – №3. – С. 33–35.
9. **Ященко Т.Н., Мечева И.С.** Руководство по лабораторным исследованиям при туберкулёзе. – М.: Медицина, 1973. – 260 с.

РЕЗЮМЕ

Липидный состав диссоциативных форм *M.bovis*. А.А.Ткаченко, П.А. Давыденко, В.В. Зажарский и др.

В работе представлены результаты исследования липидного состава *M. bovis* диссоциативных форм, в том числе и L-форм. Показано, что качественный состав микобактерий остается неизменным, а количественный отличается от исходных форм, причем содержание общих липидов *M. bovis* диссоциативных форм значительно ниже при всех температурах культивирования в сравнении с контролем. Установлено, что диссоциация микобактерий сопровождается образованием новой ундекановой кислоты ($C_{11:0}$), что может быть использовано для идентификации и дифференциации патогенных и апатогенных форм *M. bovis*.

Lipids' content of *M. bovis* dissociative forms. A. Tkachenko, P. Davydenko, V. Zazharsky et al.

Lipids' content of *M. bovis* dissociative forms and L-forms was studied. It was shown, that qualitative composition remains unchanging and the quantitative composition differs from initial forms, thus maintenance of general lipids *M. bovis* dissociative forms considerably low at all of temperatures of cultivation in relation to control. Our results also indicate that the mycoba cterium's dissociation has been accompanied formation of new undecylic acid ($C_{11:0}$), that can be used for authentication and differentiation of pathogenic and apatogenous forms M. bovis.

Отримано 25.01.11.