УДК: 619:577.57.083.134-579.887

Глєбова К.В., науковий співробітник, (katerinavet@rambler.ru) ©
Національний науковий центр
«Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

БІОХІМІЧНИЙ СКЛАД РІДКИХ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКОПЛАЗМ

У статті розглядається питання біохімічного складу поживних середовищ для культивування мікоплазм, виділених від тварин. У рідких поживних середовищах для культивування мікоплазм на основі триптичного гідролізату серця ВРХ із сироватковими альбумінами крові ВРХ та коня, сироватками крові ВРХ, курчат-бройлерів, коня і середовищі Едварда було визначено наступні біохімічні показники: загальний білок та його фракції, холестерол, тригліцериди, амінний азот, фракційний склад ліпопротеїнів. Було з'ясовано, що найвищий вміст холестеролу, ліпопротеїнів високої густини (ЛПВГ) і β-ліпопротеїнів у поживному середовищі із сироватковим альбуміном ВРХ робить це середовище найбільш потенційно придатним для ізоляції і культивування мікоплазм на відміну від інших поживних середовищ.

Ключові слова: *поживні середовища, мікоплазми, біохімічні показники, холестерол, ліпопротеїни, сироватковий альбумін ВРХ*

Вступ. Обмежені метаболічні можливості мікоплазм визначають складність їх культивування на штучних поживних середовищах [1, 2–4]. За даними літератури, основу поживного середовища для культивування мікоплазм зазвичай складають триптичний гідролізат м'язів і серця ВРХ, кислотний гідролізат харчового казеїну, триптичний гідролізат риби, дріжджовий екстракт [5, 6]. За даними літератури, мікоплазми є надзвичайно вимогливими до біохімічного складу поживних середовищ [7, 8]. Як зазначає М. М. Бойченко [9], мікоплазми – єдині представники царства прокаріот, що містять у складі цитоплазматичної мембрани стероли, основним представником яких є холестерол. У поживних середовищах джерелом холестеролу для росту мікоплазм є сироватка крові тварин. Також необхідними для синтезу клітин мікоплазм є ліпіди, ліпопротеїни, альбуміни, амінокислоти та фосфоліпіди [10].

Метою нашої роботи було визначити вміст загального білка та його фракцій, амінного азоту, холестеролу і фракцій ліпопротеїнів у рідких поживних середовищах, на основі чого оцінити їх потенційну придатність для культивування мікоплазм.

Матеріал і методи. На основі триптичного гідролізату серця ВРХ нами було виготовлено наступні поживні середовища для культивування мікоплазм: рідке поживне середовище із сироватковим альбуміном крові ВРХ, рідке поживне середовище із сироваткою крові ВРХ, рідке поживне середовище із сироваткою

© Глєбова К.В., 2011

крові курчат-бройлерів, рідке поживне середовище із сироваткою крові коня, рідке поживне середовище із сироватковим альбуміном крові коня, середовище Едварда [11]. У поживних середовищах визначали: загальний білок – за методом Лоурі, альбуміни – за реакцією з бромкрезоловим зеленим, амінний азот – формольним методом; холестерол (ХС) і тригліцериди (ТГ) – ферментативним колориметричним методом, β-ліпопротеїни (β-ЛП) – турбідиметричним методом за Бурштейном і Самай. Фракції ліпопротеїнів: ліпопротеїни високої густини (ЛПВГ), ліпопротеїни низької густини (ЛПНГ) та дуже низької густини (ЛПДНГ) визначали електрофорезом у гелі агарози [12]. Статистична обробка отриманих даних проводилася за допомогою пакету програм Microsoft Excel.

Результати дослідження. За нашими результатами біохімічних досліджень складу поживних середовищ (табл.1), показники яких наведено в таблиці, вміст загального білка був найвищим у середовищі з сироваткою крові ВРХ (52,00±0,45 г/л), найнижчим – у середовищі із сироватковим альбуміном ВРХ (41,20±0,20 г/л).

Таблиця 1

Вміст білка та амінного азоту в поживних середовищах для культивування мікоплазм (M±m; n=5)

Найменування середовищ	Білок, г/л	Альбумін, г/л	Глобулін, г/л	Амінний азот, г/л
Середовище із сироватковим альбуміном крові ВРХ	41,2±0,20 *	17,4±0,04 *	23,7±0,02 *	1,3±0,04
Середовище із сироваткою крові ВРХ	52,5±0,45	16,7±0,02	35,8±0,02	1,2±0,07
Середовище із сироваткою крові курчат-бройлерів	50,0±1,41	15,8±0,04	34,2±0,12	1,2±0,04
Середовище із сироваткою крові коня	50,0±1,54	16,4±0,04	33,6±0,04	1,2±0,04
Середовище із сироватковим альбуміном крові коня	47,2±0,52	15,3±0,04	31,9±0,03	1,2±0,08
Середовище Едварда	45,5±0,56	14,3±0,02	31,2±0,03	0,8±0,06

Примітки: * – вірогідно порівняно із іншими середовищами

Але слід відзначити, що вміст загального білка у середовищі із сироваткою крові ВРХ був зумовлений високим вмістом глобулінів, які, за даними літератури, пригнічують ріст мікоплазм. Вміст альбумінів був найвищим (17,40±0,04 г/л) у дослідному середовищі із сироватковим альбуміном ВРХ, а глобулінів – найнижчим (23,70±0,02 г/л) порівняно з іншими дослідженими середовищами. Таке співвідношення білкових фракцій у середовищі із сироватковим альбуміном крові ВРХ є найкращим порівняно з іншими середовищами, адже пригнічення росту мікоплазм глобулінами є мінімальним. Вміст амінного азоту виявлено у середовищі з сироватковим альбуміном ВРХ, що становив (1,30±0,04 г/л). Амінний азот у середовищі Едварда (0,80±0,06 г/л) був нижчим за показники всіх інших середовищ (табл.1).

Також відомо, що сироватковий альбумін ВРХ має специфічні властивості зв'язувати жирні кислоти і тим самим поліпшувати ріст мікоплазм, навіть краще за холестерол. Вміст холестеролу в поживних середовищах становив від 1,90±0,06 ммоль/л в середовищі із сироватковим альбуміном коня до 4,50±0,05 ммоль/л в середовищі із сироватковим альбуміном ВРХ (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст холестеролу, тригліцеридів і фракцій ліпопротеїнів у поживних середовищах для культивування мікоплазм (M±m; n=5)

Найменування середовищ	ХС, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	ЛПВГ, ммоль/л	ЛПНГ, ммоль/л	ЛПДНГ, ммоль/л	β-ЛП, г/л
Середовище із сироватковим альбуміном крові ВРХ	4,5± 0,05 *	0,57± 0,008	0,96± 0,004 *	3,26± 0,06 *	0,254± 0,004	4,3± 0,05 *
Середовище із сироваткою крові ВРХ	3,3± 0,07	0,97± 0,012	0,64± 0,004	1,22± 0,01	0,441±0,001 2	2,1± 0,03
Середовище із сироваткою крові курчат-бройлерів	4,2± 0,07	0,58± 0,007	0,68± 0,011	1,57± 0,02	0,264± 0,002	2,2± 0,04
Середовище із сироваткою крові коня	2,4± 0,07	0,54± 0,009	0,62± 0,006	1,48± 0,01	0,246± 0,018	2,2± 0,04
Середовище із сироватковим альбуміном крові коня	1,9± 0,06	0,34± 0,007	0,52± 0,009	1,25± 0,02	0,155± 0,009	1,6± 0,02
Середовище Едварда	2,4±0,06	0,24± 0,006	0,49± 0,009	0,89± 0,02	0,109± 0,001	1,3± 0,05

Примітки: * – вірогідно порівняно із іншими середовищами

Найвищий вміст холестеролу в середовищі із сироватковим альбуміном ВРХ дозволяє припустити можливість кращого росту мікоплазм у даному середовищі, адже холестерол має велике значення для метаболізму мікоплазм, як це зазначено в літературі [9]. Найнижчий вміст холестеролу визначений у середовищі з сироватковим альбуміном крові коня – 1,90±0,06 ммоль/л.

При дослідженні фракційного складу ліпопротеїнів у поживних середовищах було з'ясовано, що найбільший вміст ЛПДНГ (пре-β-ліпопротеїнів) був у середовищі із сироваткою крові ВРХ – 0,441±0,012 ммоль/л, найнижчий – у середовищі Едварда – 0,109±0,001 ммоль/л. Разом з тим, згідно даним літератури, роль цієї фракції ліпропротеїнів у середовищах для культивування мікоплазм не з'ясована [160]. Вміст ЛПВГ (α-ліпопротеїнів) виявився найвищим у середовищі із сироватковим альбуміном ВРХ (0,960±0,004 ммоль/л), найнижчим – у середовищі Едварда (0,490±0,009 ммоль/л). Відомо, що ЛПВГ багаті на фосфоліпіди, які переносять ліпідні компоненти на субклітинні та клітинні біомембрани. Також існує думка, що фосфоліпіди, які є поверхнево активними речовинами, стимулюють ріст мікоплазм шляхом підвищення розчинності холестеролу, роблячи його більш доступними для мікроорганізмів. При дослідженні ЛПНГ (β-ліпопротеїнів) було встановлено, що найвищий вміст цієї фракції був у середовищі

із сироватковим альбуміном ВРХ (3,26±0,06 ммоль/л), найнижчий – у середовищі Едварда (0,89±0,02 ммоль/л). Ця фракція ліпопротеїнів є головною транспортною формою холестеролу, вміст якого у структурі цих часточок найвищий і досягає 58 %. Дослідження вмісту тригліцеридів у поживних середовищах показало, що найвищий показник цих речовин був у середовищі із сироваткою крові ВРХ і становив 0,970±0,012 ммоль/л, найнижчий – у середовищі Едварда.

Висновки. 1. Найвищий вміст холестеролу, ЛПВГ (α-ліпопротеїнів), ЛПНГ (β-ліпопротеїнів) та амінного азоту спостерігався у середовищі із сироватковим альбуміном крові ВРХ. 2. За співвідношенням білкових фракцій середовище із сироватковим альбуміном крові ВРХ є більш придатним для культивування мікоплазм порівняно з іншими середовищами. 3. Визначення у рідких поживних середовищах вмісту холестеролу і фракцій ліпопротеїнів можна використовувати як критерії потенційної придатності для культивування мікоплазм.

Література

1.Приходько, Л.Ф. Оптимальные условия культивирования Mycoplasma gallisepticum и Mycoplasma synoviae [Текст]: сб. науч. тр. / Л.Ф. Приходько, В.П. Левина, В.И. Диев / ФЦ охраны здоровья животных. – Владимир, 2007. – Т. V. – С. 393–397.

2.Nagai, R. Gliding motility of Mycoplasma mobile can occur by repeated binding to N-Acetylneuraminyllactose (sialyllactose) fixed on solid surfaces [Text] / R. Nagai, M. Miyata // J. Bacteriol. – 2006. – № 188(18). – P. 6469–6475.

3. Kenny, G.E. Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae: sensitivities and specificities of serology with lipid antigen and isolation of the organism on soy peptone medium for identification of infections [Text] / G. E. Kenny, G.G. Kaiser, M. K. Cooney // J. Clin. Microbiology. – 1990. – P. 2087–2093.

4.Вологодская, О.В. Ассоциативный урогентальный микоплазмоз крупного рогатого скота (диагностика и лечение) [Текст] : автореф. … канд. вет. наук : 16.00.03 / О.В. Вологодская. – О., 2006. – 19 с.

5.Бублик, О.О. Порівняльне вивчення впливу на ріст мікоплазм екстракту дріжджів різних виробників. Повідомлення 1. Приготування та вивчення технологічних проб екстракту дріжджів [Текст] / О.О. Бублик // Вісн. Полтавської держ. аграр. акад. – 2007. – № 4. – С. 217–219.

6.Приготовление опытно-промышленных серий наборов компонентов питательных сред для культивирования микоплазм, изолированных от птиц [Текст] : тез. докл. респ. науч. конф. (21–22 сент. 1988 г.) / отв. ред. В.В. Киприч. – Х., 1988. – С. 238–239.

7.Shah-Majid, M. Evaluation of growth of avian mycoplasmas on bile salt agar and in bile broth [Text] / M. Shah-Majid, S. Rosendale // Res. Vet. Sci. – 1987. – № 43(2). – P. 188–190.

8.Грошева, Г.А. Лабораторная диагностика микоплазмозов [Текст] / Г.А. Грошева, Л.Л. Штипкович // Микоплазмы в патологии животных. – М., 1987. – С. 169–236.

9.Медицинская микробиология, вирусология и имунология [Текст] : учебник для студентов медицинских вузов / А.А. Воробъев [и др.] ; под общ. ред. А.А. Воробъева. – 2-е изд. – М.: ООО «Мед. информ. агентство», 2008. – 704 с.

10. Cluss, R.G. Interaction of albumin and phospholipid: cholesterol liposomes in growth of mycoplasma spp. [Text] / R.G. Cluss, N.L. Somerson // Applied and environmental Microbiol. – 1986. – P. 281–287.

11. Глєбова К.В. Розробка засобу діагностики мікоплазмозу тварин на основі індикації та культивування збудника: дис. …. кандидата ветеринарних наук: спец. 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія / К.В. Глєбова. – Харків, 2011. – 176 с.

12. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика / В.С. Камышников. – Мн.: Интерпрессервис, 2003.– 495 с.

Summary

K.V. Glebova, Researcher, (katerinavet@rambler.ru)
National Scientific Center
"Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine",
Kharkiv, Ukraine

BIOCHEMICAL COMPOSITION LIQUID MEDIUM FOR CULTIVATION OF MYCOPLASMA

The article discusses the biochemical composition of nutrient media for cultivation of mycoplasmas isolated from animals. In liquid media for cultivation of mycoplasmas on the basis of tryptic digest of the heart of cattle with serum albumin of cattle and horse blood, blood serum of cattle, broiler chickens, horses and the environment were identified as Edward biochemical parameters: total protein and its fractions, cholesterol, triglycerides, amino nitrogen, grain size distribution of lipoproteins. It was found that high levels of cholesterol, high density lipoprotein (LDL) cholesterol and β-lipoproteins in the culture medium with serum albumin of cattle making it among the most potentially suitable for the isolation and cultivation of mycoplasmas in contrast to other culture media.

Key words: *culture media, mycoplasmas, biochemical markers, cholesterol, lipoproteins, serum albumin of cattle*

Рецензент – д.б.н., проф. Куртяк Б.М.