

УДК 619:579.887.111

© 2010

Обуховська О.В., кандидат ветеринарних наук

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

ВІДНОВЛЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ПОПУЛЯЦІЙ МІКОПЛАЗМ У ПРОЦЕСІ ДЕЛІОФІЛІЗАЦІЇ

Рецензент – кандидат ветеринарних наук Е.П. Петренчук

*Вивчено етапи відновлення життєздатності популяцій мікоплазм, що зберігались від 2 до 25 років, у процесі деліофілізації. Встановлено, що процес ліофілізації негативно впливає на показники динаміки росту клітин у популяції мікоплазм. Так, лог-фаза нативного штаму *Mycoplasma gallisepticum* S6 була втричі коротша, а фаза стаціонарного розвитку втричі довша, ніж у деліофілізованого аналога. Ліофілізовані культури мікоплазм можуть відновити показники життєздатності популяції (в середньому на 8 %) після здійснення 5-ти поступових пасажів на рідких поживних середовищах за умов, що строки їх зберігання були не більше 20 років. Зберігання культур мікоплазм впродовж 23-25 років призводить до незворотної втрати життєздатності клітин у популяції.*

Ключові слова: мікоплазми, ліофілізація, деліофілізація, життєздатність, фази росту.

Постановка проблеми. Мікоплазми широко розповсюджені патогени, що спричиняють захворювання дихальної та уrogenітальної систем сільськогосподарських, декоративних та диких тварин [3, 4]. Головною умовою забезпечення стабільного благополуччя щодо цих захворювань є проведення діагностичних досліджень й застосування (у разі необхідності) вакцинних препаратів. Створення сучасних ефективних біопрепаратів безпосередньо залежить від біологічної стабільності виробничих штамів. Основним технологічним прийомом для зберігання виробничих штамів є ліофілізація [2]. Однак, мікоплазми, завдяки своїй унікальній субклітинній будові, досить чутливі до процесу ліофілізації [1, 5, 8]. Питання відновлення життєздатності мікоплазм та етапи розвитку популяції клітин у процесі деліофілізації за умов зберігання їх у ліофілізованому стані впродовж різних термінів потребують поглибленого вивчення.

Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми. Процес ліофілізації призводить не тільки до загибелі певного відсотка життєздатних клітин мікоплазм (10-30%), але й змінює показники розвитку популяції в цілому. Подовжуються фа-

зи росту (особливо лаг-фаза) та знижується інтенсивність накопичення бактерійної маси мікоплазм [7-9]. За даними окремих авторів, не всі клітини гинуть у процесі ліофілізації – певна частина їх переходить у «некультивуємі форми» [6, 10]. Реверсія таких клітин до первинного стану є можливою за умов здійснення послідовних пасажів на поживних середовищах [5, 8].

Тривалість термінів зберігання мікоплазм у ліофілізованому стані, після яких ще можливо відновити життєздатність популяції, якісні та кількісні показники інтенсивності репродуктивних процесів клітин мікоплазм, потребують поглибленого вивчення.

Мета і завдання. Метою роботи було вивчення показників відновлення життєздатності популяцій мікоплазм у процесі деліофілізації.

Для виконання зазначеної мети були поставлені наступні завдання: вивчити показники інтенсивності росту та накопичення бактерійної маси мікоплазм, що зберігалися в нативному та ліофілізованому станах впродовж різних строків, і визначити потенційну можливість відновлення життєздатності культур за умов зберігання їх у ліофілізованому стані більше ніж 20 років.

Матеріали і методи. У процесі виконання роботи вивчали життєздатність культур мікоплазм (музейних штамів та польових ізолятів), які зберігалися в музеї лабораторії бактеріальних хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» у нативному вигляді (на рідких поживних середовищах) або в ліофілізованому стані (за температури 2-8 °С).

У роботі використовували наступні культури мікоплазм: музейний штам *Mycoplasma gallisepticum* S6 нативний; музейний штам *Mycoplasma gallisepticum* S6 ліофілізований (2 роки зберігання); польовий ізолят *Mycoplasma arthritidis* (21 рік зберігання); польовий ізолят *Acholeplasma laidlawii* (23 роки зберігання); польовий ізолят *Mycoplasma arginini* (25 років зберігання).

Пасажування культур здійснювали на середовищі Едварда із додаванням сироватки крові коня. Режим інкубування мікоплазм становив 6 діб

за температури (37,0±0,5) °С.

Інтенсивність накопичення бактерійної маси мікоплазм визначали шляхом фотокалориметрії (ФЕК КФК-2 УХЛ-4, зелений світлофільтр, довжина хвилі 420-440 нм), контролем служило стерильне середовище Едварда.

У процесі вивчення росту культур мікоплазм на рідких поживних середовищах визначали наступні фази росту: лаг-фазу (фазу початку розмноження), що характеризується невисоким ступенем інтенсивності росту; лог-фазу (експоненціальну фазу розвитку), що характеризується максимальною швидкістю та інтенсивністю росту; фазу негативного прискорення, що характеризується зниженням активності росту; стаціонарну фазу, що характеризується вираженою рівновагою між кількістю загинувших і знов сформованих клітин; фазу логарифмічної загибелі, що характеризується зниженням кількості живих клітин.

Результати досліджень. На першому етапі даних досліджень нами були вивчені особливості репродукційних властивостей культур мікоплазм на рідких поживних середовищах за умов попереднього зберігання мікроорганізмів у різних режимах. Із цією метою було проведено порівняльне вивчення інтенсивності накопичення бактерійної маси та тривалості різних фаз розвитку мікоплазм для музейного штаму *Mycoplasma gallisepticum* S6. При цьому було встановлено,

що етапи розвитку й розмноження клітин мікоплазм, що зберігалися в ліофільному та нативному станах, значно різняться.

Як видно з даних рис. 1, лаг-фаза росту музейного штаму *Mycoplasma gallisepticum* S6, що зберігався в нативному вигляді на рідкому поживному середовищі, дорівнювала 12 годинам. Ця фаза збільшувалась майже втричі й становила вже 36 годин після зберігання цього штаму в ліофілізованому стані впродовж 2 років. Лог-фаза (фаза інтенсивного росту) майже не змінилась – у обох штамів вона складала близько 24 годин. Фаза негативного прискорення росту також була для обох штамів майже однаковою (близько 48 годин). Однак максимальна стаціонарна фаза для нативного штаму перевищувала цей показник у відновленого штаму майже втричі (36 та 12 годин відповідно). Термінальна фаза росту (фаза логарифмічної загибелі) наступала в обох штамів практично одночасно – після 120 годин культивування.

Максимальна інтенсивність накопичення бактеріальної маси мікоплазм у нативного штаму *Mycoplasma gallisepticum* S6 перевищувала аналогічний показник для штаму, відновленого з ліофільного стану на 17,1%.

Також нами були проведені дослідження щодо вивчення резервів життєздатності мікоплазм, що зберігались у ліофілізованому стані впродовж різних строків (від 2 до 25 років).

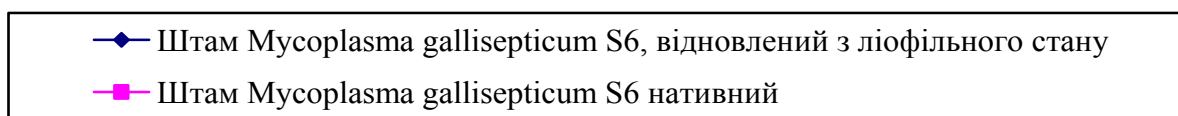
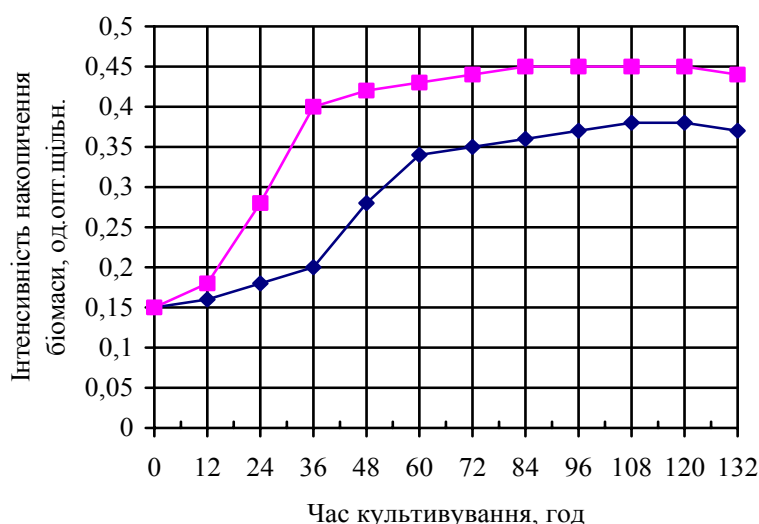


Рис. 1. Динаміка розвитку популяції клітин штаму *Mycoplasma gallisepticum* S6 на рідкому поживному середовищі

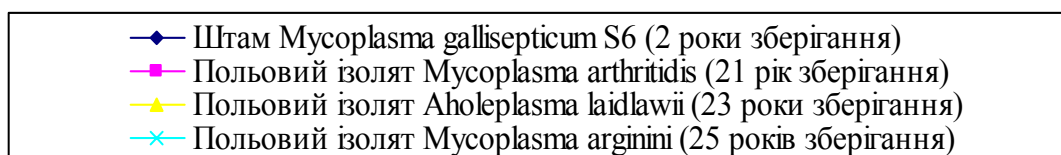
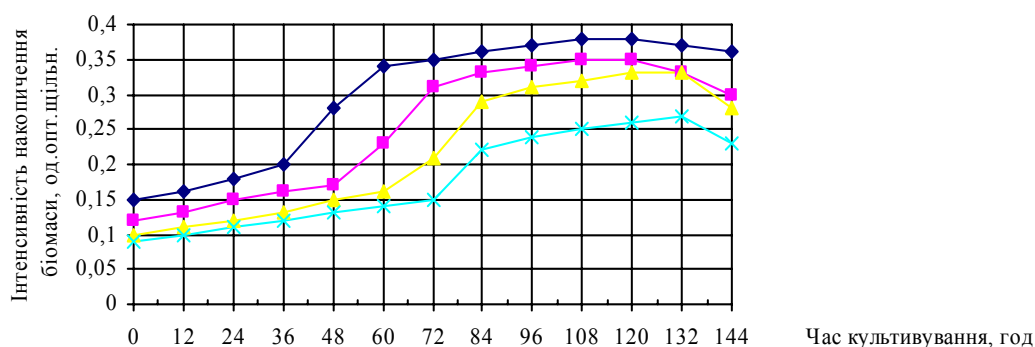


Рис. 2. Динаміка розвитку популяцій клітин культур мікоплазм, відновлених із ліофільного стану, на рідкому поживному середовищі

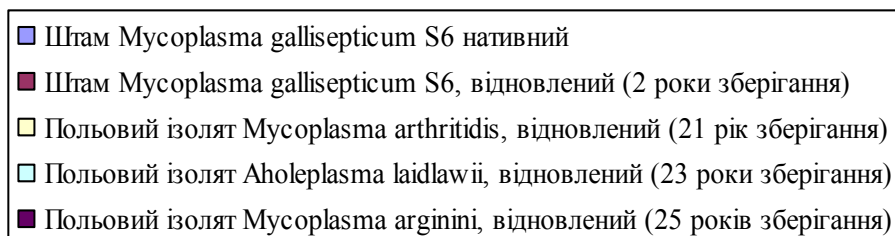
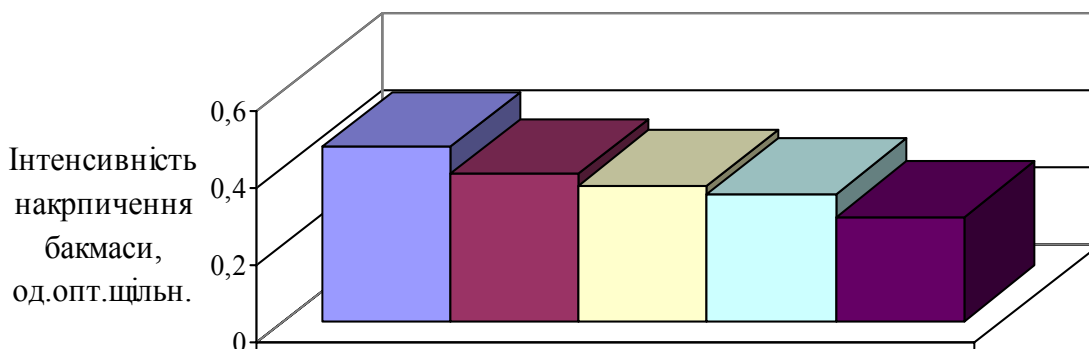


Рис. 3. Інтенсивність накопичення бактерійної маси мікоплазм після першого пасажу на поживних середовищах

Встановлено, що тривалість строку збереження мікоплазм впливає на лаг-фазу в напрямі її подовження; так, після 2-х років зберігання вона становила 36 годин, а після 21, 23 та 25 років – поступово збільшувалась і складала 48, 60 та 72 години відповідно. Фаза інтенсивного росту (лог-фаза) не змінювалась для культур, що зберігалися 2, 21 та 23 роки, і становила близько 24 годин, але після 25 років зберігання – скорочувалась вдвічі (12 годин). Фази негативного прискорення росту й максимально стаціонарна фаза залишилися практично незмінними для мікоплазм 2, 21 та 23 років зберігання. Але у польово-

го ізоляту *Mycoplasma arginini* (25 років зберігання) стаціонарна фаза росту була відсутня, тобто після моменту максимального накопичення бактеріальної маси практично одразу розпочався аутолізис клітин мікоплазм, що свідчить про нестабільність культури, яка зберігалася впродовж досить тривалого часу у ліофілізованому вигляді (рис. 2).

Окрім зміни тривалості фаз росту культур мікоплазм було встановлено зниження інтенсивності накопичення бактерійної маси в процесі культивування на рідких поживних середовищах.

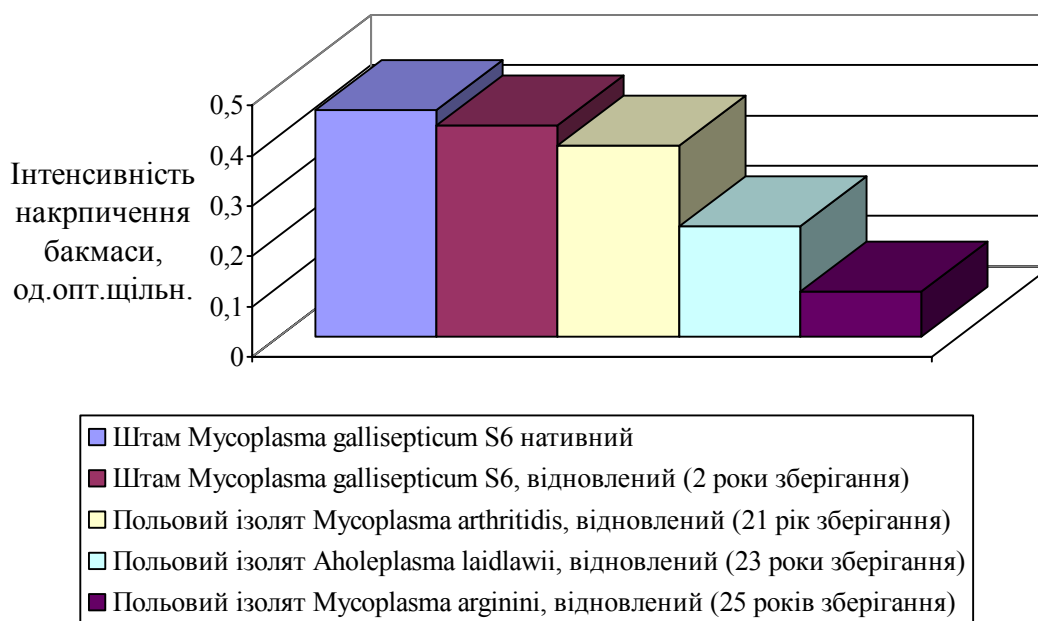


Рис. 4. Інтенсивність накопичення бактерійної маси мікоплазм після першого пасажу на поживних середовищах

Дані рис. 3 наглядно демонструють поступове зменшення інтенсивності накопичення бактеріальної маси культур мікоплазм, відновлених з ліофілізованого стану, порівняно із нативною культурою. Для культур, що зберігались 2, 21 та 23 роки цей показник знижується на 15,6, 22,2 та 26,7% відповідно. Для польового ізоляту *Mycoplasma arginini*, що зберігався впродовж 25 років, цей показник знизився майже на третину (35,6%).

З метою визначення можливості відновлення репродуктивних властивостей культур мікоплазм після їх деліофілізації нами було проведено 5 поступових пасажів на поживних середовищах. Після чого були проведені повторні дослідження щодо інтенсивності накопичення бактерійної маси.

Як видно з рис. 4 в процесі послідовного пасажування культур мікоплазм, відновлених з ліофілізованого стану, вдалось інтенсифікувати репродуктивні властивості культури, що зберігалась 2 роки (на 8,9 %) та культури, що зберігалась 21 рік (на 6,6 %). Однак, репродуктивні властивості культур, що зберігались 23 та 25 років, не тільки не вдалось відновити, навпаки – вони значно знизились – на

11,1 та 44,4 %. Слід зазначити, що в процесі подальшого пасажування ці дві культури поступово втратили життєздатність.

Висновки:

1. Інтенсивність розвитку популяції мікоплазм залежить від умов зберігання культур. Нативні культури мають більш високий рівень життєздатності у порівнянні із деліофілізованими, що виражається в більш інтенсивній динаміці росту та розвитку клітин.

2. Процес ліофілізації негативно впливає на показники динаміки росту клітин в популяції мікоплазм. Так, лог-фаза нативного штаму *Mycoplasma gallisepticum* S6, була втричі коротша, а фаза стаціонарного розвитку втричі довша, ніж у деліофілізованого аналогу.

3. Ліофілізовані культури мікоплазм можуть відновити показники життєздатності популяції (в середньому на 8 %) після здійснення 5-ти поступових пасажів на рідких поживних середовищах за умов зберігання їх не довше 20 років.

4. Зберігання культур мікоплазм впродовж 23-25 років призводить до незворотної втрати життєздатності клітин в популяції.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Борхсениус, С.Н. Микоплазми. Молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика / С.Н. Борхсениус, С.Н. Чернова О.А., Чернов В.М. [и др.] . – М.: Наука, 2000.– 123 с.

2. Виговська, Л. Робота зі штамами мікроорганізмів / Л. Виговська, В. Ушкалов, Л. Акименко [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2007, № 12. – С. 17-19.

3. Инфекционные болезни животных: справочник / под. ред. Д.Ф. Осидзе. – М.: Агропромиз-

дат, 1987. – 288 с.

4. Коваленко, Я.Р. Микоплазмы животных / Я.Р. Коваленко. – М.: Колос, 1976. – 304 с.

5. Методика освежения и поддержания производственного штамма *M. gallisepticum* / В.Н. Ирза, М.И. Сорокина, Т.Ю. Черняева. – Владимир, 2005. – 40 с.

6. Музыкантов А.А. Адаптация микоплазм (*Mycoplasma gallisepticum* S6) к неблагоприятным условиям / Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.04, 03.00.07/ А.А. Музыкантов. – Казань, 2008. – 20 с.

7. Стуколкина Н.Е. Современные аспекты биологии микоплазм / Н.Е. Стуколкина // Вестн. Новгород. гос. ун-та. – 2005. – № 32. – С. 58-62.

8. Приходько Л.Ф. Оптимальные условия куль-

тивирования *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae*: сб. науч. тр. / Л.Ф. Приходько, В.П. Левина, В.И. Диев / ФЦ охраны здоров'я животных. – Владимир. – 2007. – Т. V. – С. 393-397.

9. Романько М.Є. Вивчення ростових властивостей нативних і деліофілізованих клітин тестштамів микоплазм / М.Є. Романько, В.В. Андрущенко // Вет. біотехнологія: бюл. – К., 2009. – Вип. 14. – С. 287-292.

10. Чернов В.М. Адаптация микоплазм к неблагоприятным условиям роста: морфология, ультраструктура и экспрессия генома клеток *Mycoplasma gallisepticum* S6 / В.М. Чернов, В.М. Говорун, И.А. Демина // Ветеринария. – 2009, №2. – С. 5.