

ІНТЕНСИВНІСТЬ ДИХАННЯ НАТИВНИХ І ДЕЛІОФІЛІЗОВАНИХ КЛІТИН ТЕСТ-ШТАМІВ МІКОПЛАЗМ

М. Є. Романько¹, В. О. Ушкалов², В. В. Андрущенко²

¹ННЦ Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН, м. Харків

²Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

*У статті наведені дані про інтенсивність дихання нативних і деліофілізованих клітин тест-штамів мікоплазм при окисненні ендogenous субстратів і екзогенної глюкози. Дихальна активність мікоплазм *M. orale* найвища, за біологічним потенціалом вони перспективні для біологічної промисловості. Ліофілізація стимулює дихання в клітинах мікоплазм *M. arginini*, *M. gallisepticum* і *A. laidlawii*: дихальна активність у них відповідно в 3,2, 2,1 і 2,4 рази вища, ніж у нативних мікоплазм.*

Додавання до інкубаційного середовища 1% глюкози не впливала на інтенсивність дихання цих видів мікоплазм. Дихальна активність мікоплазм характеризує фізіологічний стан та ступінь стабільності біологічного потенціалу клітин мікоплазм як за умов біопромислового культивування, так і в дослідницьких експериментах.

Ключові слова: ДЕЛІОФІЛІЗОВАНІ КЛІТИНИ, ДИХАЛЬНА АКТИВНІСТЬ, МІКОПЛАЗМА, НАТИВНІ КЛІТИНИ, ТЕСТ-ШТАМ.

Однією з центральних проблем сучасної біотехнології і біохімії є дослідження молекулярних механізмів адаптації живих організмів, зокрема мікроорганізмів, які забезпечують перебудову системи метаболізму відповідно до умов середовища. За дії різних несприятливих факторів у популяціях мікроорганізмів виникають зміни, що призводять до стану стресу [1–4]. Клітини в такому стані характеризуються змінами фізіологічних властивостей та метаболізму.

Згідно з сучасними уявленнями стрес викликає в клітині мікроорганізмів порушення не тільки структури макромолекул, але й пов'язаних з ними фізіології і метаболізму [5]. Дані літератури про механізми впливу стресу на мікроорганізми не систематизовані, що обумовлює актуальність розширення таких досліджень.

Виробництво ветеринарних імунобіологічних препаратів (ВІП) вимагає узгодження систем стандартизації та сертифікації засобів для ветеринарної медицини із стандартами й директивами Європейського Союзу та угодою Світової організації торгівлі та повинно включати технологічний контроль, а також контроль готового продукту на наявність контамінації сторонніми вірусами і мікоплазмами. Проте контроль за контамінацією біопрепаратів сторонніми вірусами і мікоплазмами є трудомістким і вимагає значних витрат коштів. До того ж, мікоплазми дуже вибагливі до складу поживного середовища, що ускладнює процес їх культивування з огляду на відсутність єдиної системи такого контролю. Хоч розроблено ДСТУ 4613:2006 «Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначення контамінації мікоплазмами» [6], необхідність стандартизації цих методів вимагає пошуку сучасних адекватних критеріїв оцінки біологічного потенціалу клітин тест-штамів мікоплазм з урахуванням технологічних умов їх зберігання та підтримання. Тому метою роботи було дослідження однієї з фізіологічних характеристик біологічного потенціалу клітини — інтенсивності ендogenous дихання нативних і деліофілізованих клітин тест-штамів мікоплазм, які використовуються при контролюванні ВІП та сировини для їх виготовлення на наявність контамінації мікоплазмами.

Матеріали і методи

Як експериментальні моделі для виконання роботи були використані нативні бульйонні концентрати та деліофілізовані клітини тест-штамів *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma gallisepticum* і *Acholeplasma laidlawii*, які було культивовано впродовж (4–5) діб на поживному середовищі, до якого додавали кінську інактивовану сироватку ($t-(56 \pm 1)^\circ\text{C}$; рН-7,49), виготовленому за прописом ДНКІБШМ.

З метою забезпечення високого рівня дихальної активності інкубацію клітин проводили у фосфатному буфері ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, рН 7,8) і тріс-НСІ-буферних системах. Дихальну активність (ДА) вимірювали за допомогою кисневого електроду (типу Кларка, МО 128, «Mettler Toledo», Швейцарія). Умови аналізу: об'єм вимірювальної кювети — 10 см^3 , концентрація клітин — $0,3\text{--}1,0\text{ г сухих клітин/дм}^3$, температура — $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$. Середовище вимірювання: 5 мМ тріс-НСІ буфер, рН 7,8. Вимірювальну кювету термостатували з використанням ультратермостату МТА 657 (Німеччина) та магнітного струшувача.

Для аналізу ДА клітини осаджували центрифугуванням при 5000 g впродовж 5 хв з подальшим ресуспензуванням у 5 мМ тріс-НСІ буфері, рН 7,8 та повторним переосадженням за аналогічним методом. Осад ресуспендували у невеликій кількості буферу та визначали концентрацію клітин у суспензії спектрофотометрично за довжини хвилі 640 нм (UNICO 2100, США) із наступним перерахунком на суху біомасу (мг/см^3) за попередньо побудованим калібрувальним кривим.

При використанні O_2 -чутливого електроду вимірюваним параметром була максимальна швидкість зниження концентрації кисню в середовищі, приведена до одиниці біомаси (питома дихальна активність) за формулою 1:

$$\text{ДА} = \frac{\Delta C_{\text{O}_2}}{\Delta t \cdot m}, \quad (1)$$

де: ΔC — зміна концентрації O_2 в середовищі ($\text{мг O}_2/\text{дм}^3$) за фіксований проміжок часу Δt (хв);

m — маса використаних мікробних клітин, мг.

Дихальну активність клітин досліджуваних штамів мікоплазм виражали в $\frac{\text{мг O}_2}{\text{л} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}}$.

У статті наведені середні значення параметрів 5 незалежних експериментів. Статистичну обробку одержаних даних проводили за допомогою методів варіаційної статистики, як описано в роботі Лакіна Г.Ф. (1980) [7].

Результати й обговорення

На початку досліджень були підбрані оптимальні умови для визначення дихальної активності клітин мікоплазм усіх досліджуваних тест-штамів. Дихальна активність — одна з основних фізіологічних реакцій мікроорганізмів [1, 2]. Оскільки дихальна активність є інтегральним показником рівня енергізації мікроорганізму, обґрунтованим є використання його як критерію оцінки стабільності біологічного потенціалу бактеріальної клітини.

Дослідженнями встановлено, що оптимальна концентрація клітин досліджуваних штамів мікоплазм у вимірювальній кюветі повинна складати не менше ніж за $0,3\text{--}0,4\text{ мг сухої маси/см}^3$. Було визначено рН-оптимум для виявлення максимального рівня дихання мікроорганізмів. Для цього вимірювання ДА клітин проводили в 5 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ буфері з різним значенням рН ($5,6\text{--}8,5$), а також у 5 мМ тріс-НСІ буфері з рН $7,2\text{--}8,0$. Найбільш високі значення дихальної активності клітин були виявлені при застосуванні 5 мМ

трис-НСІ буферу з рН 7,6–7,8. Оптимальна температура для дослідження ДА клітин мікоплазм — 28–30 °С. Оптимальною для збереження ДА клітин мікоплазм впродовж 2 діб є температура (4 ± 0,5) °С.

У таблиці наведені результати досліджень дихальної активності нативних і деліофілізованих клітин мікоплазм досліджуваних штамів та після внесення у середовище глюкози. З таблиці видно, що за умов ендogenous дихання (без додавання енергетичних субстратів) найвищий показник дихальної активності виявлено у нативних клітинах штаму *M. orale* ($9,820 \pm 0,850 \frac{\text{мгO}_2}{\text{л} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}}$), який був вищим за значенням від цього показника у клітинах *M. arginini*, *M. gallisepticum* і *A. laidlawii* у середньому в 10,6, 3,8 і 6,2 раза відповідно ($p \leq 0,05$).

Встановлено, що після додавання до інкубаційного середовища нативних клітин досліджуваних штамів 1 % глюкози значення показника ДА підвищувались у клітинах *M. orale* і *M. arginini* (в 1,30 і 1,85 раза) порівняно до її початкових значень ($p \leq 0,05$). Додавання глюкози до інкубаційного середовища клітин штамів *M. gallisepticum* й *A. laidlawii* не викликало посилення їх дихальної активності, можна пояснити їх фізіологічною властивістю ферментувати глюкозу на відміну від здатності клітин *M. orale* і *M. arginini* використовувати як субстрат аргінін.

Таблиця

Дихальна активність нативних і деліофілізованих клітин тест-штамів мікоплазм при використанні ендogenous субстратів та після додавання до інкубаційного середовища глюкози в перерахунку на суху біомасу (M±m; n=5)

Тест-штам	Вміст білка у сухій біомасі, мг/см ³	ДА (ендogenous субстрати), $\frac{\text{мгO}_2}{\text{л} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}}$	ДА (додана глюкоза), $\frac{\text{мгO}_2}{\text{л} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}}$
<i>Нативні клітини</i>			
<i>M. orale</i>	0,760 ± 0,002	9,820 ± 0,850	12,720 ± 1,005*
<i>M. arginini</i>	2,200 ± 0,021	1,929 ± 0,010	3,576 ± 0,725*
<i>M. gallisepticum</i>	2,900 ± 0,011	2,621 ± 0,055	3,092 ± 0,080
<i>A. laidlawii</i>	4,700 ± 0,025	1,582 ± 0,026	1,638 ± 0,040
<i>Деліофілізовані клітини</i>			
<i>M. orale</i>	1,160 ± 0,005	7,568 ± 0,050**	8,075 ± 0,060**
<i>M. arginini</i>	1,250 ± 0,018	6,240 ± 0,090**	6,400 ± 0,058**
<i>M. gallisepticum</i>	1,540 ± 0,038	5,455 ± 0,035**	5,931 ± 0,059**
<i>A. laidlawii</i>	2,370 ± 0,085	3,826 ± 0,040**	4,023 ± 0,400**

Примітка: * — різниця значень показника ДА енергізованих клітин вірогідна при $p \leq 0,05$ порівняно до його рівня при використанні ендogenous субстратів;

** — різниця значень показника ДА деліофілізованих клітин вірогідна при $p \leq 0,05$ порівняно до його рівня у нативних клітинах.

Встановлено, що деліофілізація викликає інгібування дихальної активності в клітинах найбільш активного штаму *M. orale* як при використанні ендogenous субстратів, так і при додаванні до інкубаційного середовища глюкози. Показник дихальної активності деліофілізованих клітин *M. orale* був відповідно на 22,1 % (ендogenous дихання) і 38,5 % (додання глюкози) менший ($p \leq 0,05$). Але навіть після деліофілізації рівень як ендogenous дихання, так і стимульованого 1 % глюкозою дихання, у їх клітинах був вищим, ніж у клітинах інших досліджуваних штамів.

Значення показника ендогенної дихальної активності деліофілізованих клітин інших досліджуваних штамів суттєво зросло порівняно до значень у нативних клітин ($p \leq 0,05$). Так, рівень ендогенної дихальної активності деліофілізованих клітин штамів *M. arginini*, *M. gallisepticum* і *A. laidlawii* був вищим відповідно в 3,2; 2,1 і 2,4 рази.

При цьому, слід зазначити, що енергізація деліофілізованих клітин досліджуваних штамів мікоплазм шляхом додавання до інкубаційного середовища глюкози не впливало на інтенсивність процесів дихання в цих клітинах, що вказує про витрачання їх фізіологічного потенціалу внаслідок впливу ліофілізації.

Враховуючи високу чутливість застосованого в роботі дихального тесту на базі O_2 -електроду, клітини досліджуваних штамів мікоплазм можуть слугувати чутливим індикатором дослідження наслідків біологічного впливу будь-якого стресору. З іншого боку, за рівнем дихальної активності можна оцінювати фізіологічний стан та ступінь стабільності потенціалу клітин досліджуваних штамів як за умов біопромислового культивування, так й у дослідницьких експериментах.

Висновки

1. За дихальною активністю штам *M. orale* характеризується найбільшим біологічним потенціалом та є перспективним для біологічної промисловості.

2. Деліофілізація посилює дихання у клітинах штамів *M. arginini*, *M. gallisepticum* і *A. laidlawii* відповідно в 3,2, 2,1 і 2,4 рази. Додавання до інкубаційного середовища глюкози не впливає на інтенсивність дихання в клітинах цих штамів мікоплазм.

Перспективи подальших досліджень. Оскільки штам *M. orale* характеризується найбільшим біологічним потенціалом та є перспективним для біологічної промисловості, слід продовжити вивчення біологічного впливу різних стресорів на інтенсивність дихання в клітинах цього штаму.

M. Roman'ko, V. Ushkalov, V. Andrushchenko

INTENSITY OF RESPIRATION OF NATIVE AND DELIOFILIZED CELLS MIKOPLASMA TEST-STRAINS

S u m m a r y

Information about respiration intensity of native and deliofilized cells of mikoplasma test-strains at oxidation of endogenous substrata into the incubation glucose environment is given in this article. Respiratory activity of mikoplasma of *M. orale* is sufficiently higher than in other mikoplasma types that is why they have potential for biological industry. Respiratory activity in lifilized cells of mikoplasma of *M. arginini*, *M. gallisepticum* and *A. laidlawii* is accordingly 3,2, 2,1 and 2,4 times higher, than in native mikoplasma cells. Adding 1 % glucose to the incubation environment did not influence the intensity of respiration of these types of mikoplasma. Respiration activity of mikoplasma characterizes the physiological condition and stability degree of cells biological potential of mikoplasma both in the conditions of bioindustrial cultivation and in research experiments.

M. E. Романько, В. А. Ушкалов, В. В. Андрущенко

ИНТЕНСИВНОСТЬ ДЫХАНИЯ НАТИВНЫХ И ДЕЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК ТЕСТ-ШТАММОВ МИКОПЛАЗМ

А н н о т а ц и я

В статье приведены данные об интенсивности дыхания нативных и делиофилизированных клеток тест-штаммов микоплазм при окислении эндогенных субстратов и при добавлении в инкубационную среду глюкозы. Дыхательная активность микоплазм *M. orale* значительно выше, чем других видов микоплазм, поэтому они являются перспективным для биологической промышленности. Интенсивность дыхания в клетках лиофилизированных микоплазм *M. arginini*, *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* соответственно в 3,2, 2,1 и 2,4 раз выше, чем в клетках нативных микоплазм. Добавление в инкубационную среду глюкозы не влияет на интенсивность дыхания указанных штаммов. По уровню интенсивности дыхательной активности можно оценивать физиологическое состояние биологического потенциала клеток микоплазм как в условиях биопромышленного культивирования, так и в исследовательских экспериментах.

1. *Баснакьян И. А.* Патология и физиология микробов [Текст] / И. А. Баснакьян, В. М. Боровкова, С. Н. Кузьмин // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 1981. — № 9. — С. 14–19.

2. *Мельникова В. А.* Патология и физиология микробов. Сообщение 3. Экономический и метаболический коэффициенты в оценке функциональных состояний *S. Typhi* [Текст] / В. А. Мельникова, И. А. Баснакьян // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 1984. — № 5. — С. 62–67.

3. *Работнова И. Л.* Пути управления биосинтезом у микроорганизмов [Текст] / И. Л. Работнова // Управление биосинтезом микроорганизмов : обзор литературы. — Красноярск, 1973. — С. 242–244.

4. *Работнова И. Л.* Хемостатное и периодическое культивирование при изучении физиологии микроорганизмов [Текст] : итоги науки и техники / И. Л. Работнова, И. Н. Позмогова, И. А. Баснакьян // Культивирование микроорганизмов. — М., 1981. — Т. 11. — С. 3–54. — (Сер. «Микробиология»).

5. *Баснакьян И. А.* Стресс-индуцибельные бактериальные белки и вирулентность [Текст] / И. А. Баснакьян и [др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2001. — № 5. — С. 101–108.

6. ДСТУ 4613:2006 Препарати ветеринарні імунобіологічні : Методи визначення контамінації мікоплазмами [Текст]. — К. : Держспоживстандарт України, 2006. — 25 с.

7. *Лакин Г. Ф.* Биометрия [Текст] / Г. Ф. Лакин. — М. : Высш. школа, 1980. — 230 с.

Рецензент: к. б. н., с. н. с., пров. н. с. лабораторії імунології Кичун І. В.