




review article | UDC 6.61.619.57.579 | doi: 10.31210/visnyk2020.01.25


THE HISTORY OF SEARCHING METHODS OF SELECTIVE NUTRIENT MEDIA PREPARATION FOR MYCOPLASMAS CULTIVATION


V. P. Berdnik^{1*}

I. Yu. Berdnik¹

V. O. Ushkalow²

ORCID  [0000-0003-2664-8035](https://orcid.org/0000-0003-2664-8035)

ORCID  [0000-0002-2181-9002](https://orcid.org/0000-0002-2181-9002)

ORCID  [0000-0001-5694-632X](https://orcid.org/0000-0001-5694-632X),

¹ Poltava State Agrarian Academy, 1/3, Skovorody str., Poltava, 36003, Ukraine

² National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 16, Polkovnyka Potiekhina, Kyiv, 03127, Ukraine

*Corresponding author

E-mail: berdgik36@gmail.com

The results' analysis obtained in searching of selective nutrient mycoplasma media (SNMM) for the period of 120 years and published by several generations of scientists from different countries of the world, including the authors of this article, is presented. Mycoplasma, the causative agent of contagious cattle pleuropneumonia, was first cultivated by E. Nocard, E. R. Roux et al. (1898) in beef – extract broth (BEB) that was embedded in a collodion bag and sewn into the rabbit peritoneal cavity. The first variants of the medium were based on BEB or on Marten's broth and the blood serum of animals, mainly horses. D. G. Edward (1947) suggested to add yeast extract to the media. R. M. Chanock et al. (1962) introduced the horse blood serum, yeast extract, lactalbumin hydrolyzate and DNA into the medium. It was the first time that they had cultivated the causative agent of the so –called human atypical pneumonia, Eaton agent, which was considered a virus. It was a powerful impetus to further studying mycoplasma properties and features of the diseases caused by them – mycoplasmosis of humans, animals, birds, reptiles, fish, arthropods, and plants. A number of methods have been suggested to diagnose mycoplasmoses: from microbiological (mycoplasma, cultural) to genetic and molecular types of polymerase chain reaction (PCR). But only mycoplasma is the basic method –“gold standard”, all the rest are additional. Only with its help it is possible to obtain mycoplasma cultures, to study their biological properties, to make diagnostics and vaccines from them. With this purpose, it is necessary to have SNMM, that would provide mycoplasmas with plastic material and energy, and to know the conditions for their successful cultivation. M. penetrans culture was isolated by S.C.Lo et al. (1991, 1992) from human urine samples infected with the immunodeficiency virus, 29 years after the identification of the Eaton agent. It has led to the thought that, although more than 200 species of Mollicutes class have been cultivated at present, they are only part of the total number existing in nature. Therefore, their search in different hosts should be continued, but using more improved SNMM. Several hundreds have been tested with this aim and it has been concluded that it is impossible to produce a universal medium for all the species described, because they have different nutritional and cultivation conditions and requirements. Certain media meet the requirements of a few species only. Phytoplasma for Haemobartonella and Eperythrozoon cannot be cultivated in vitro so far.

Key words: mycoplasma, selective nutrient media, blood serum, yeast extract.

ІСТОРІЯ ПОШУКУ МЕТОДІВ ПРИГОТУВАННЯ СЕЛЕКТИВНИХ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКОПЛАЗМ**В. П. Бердник¹, І. Ю. Бердник¹, В. О. Ушкалов²,**¹ Полтавська державна аграрна академія, м. Полтава, Україна.² Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ, Україна

Приведений аналіз результатів пошуку методів приготування селективних поживних мікоплазменних середовищ (СПМС) за 120 років, виконаний науковцями декількох поколінь різних країн світу, зокрема й авторів цієї статті. Вперше мікоплазму – збудника контагіозної плевропневмонії великої рогатої худоби – виростили E. Nocard, E. R. Roux et al. (1898) у м'ясопептонному бульйоні (МПБ), що був у колодійному мішечку, вишитою в очеревинну порожнину кролика. Перші варіанти середовищ мали як основу МПБ чи бульйон Мартена і сироватку крові тварин, переважно коней. D. G. Edward (1947) запропонував добавляти в них ще і екстракт дріжджів. R. M. Chapock et al. (1962) в середовище ввели сироватку крові коней, екстракт дріжджів, лактальбумін гідролізат і ДНК. На ньому вони вперше виростили збудника атипової пневмонії людей – агента Ітона, який вважали вірусом. Це було могутнім стимулом подальшого вивчення властивостей мікоплазм і особливостей захворювань, до яких вони призводять – мікоплазмозів людей, тварин, птахів, рептилій, риб, членистоногих і рослин. Для їх діагностики запропоновано низку методів – від мікробіологічного (мікоплазмологічного, культурального) до генетичних і молекулярних на зразок полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Але базовим, «золотим стандартом» є лише мікоплазмологічний, решта – додатковими. Тільки з його допомогою можна одержати культури мікоплазм, вивчити їхні біологічні властивості, виготовити з них діагностичуми та вакцини. На його виконання необхідно мати СПМС, які б забезпечували мікоплазми пластичним матеріалом і енергією, та знати умови для їх успішного культивування. Культуру *M. penetrans* ізолювали S. C. Lo et al. (1991, 1992) з проб сечі людини, зараженої вірусом імунodefіциту, через 29 років після ідентифікації агента Ітона. Це змусило думати, що на сьогодні хоч і вдалось культивувати понад 200 видів класу *Mollicutes*, вони є лише частиною тієї кількості, які існують у природі. Тому пошуки їх у різних господарів треба продовжувати, але із застосуванням більш досконалих СПМС. Для цього випробувано їх декілька сотень і зроблено висновок – не вдається виготовити універсальне середовище для всіх описаних їх видів, бо вони мають різні потреби щодо живлення та умов культивування. Поки що неможливо було виростити *in vitro* фітоплазм, *Haemobartonella* і *Eperythrozoon*.

Ключові слова: мікоплазми, селективні поживні мікоплазменні середовища, сироватка крові, екстракт дріжджів.

ИСТОРИЯ ПОИСКА МЕТОДОВ ПРИГОТОВЛЕНИЯ СЕЛЕКТИВНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКОПЛАЗМ**В. П. Бердник¹, И. Ю. Бердник¹, В. А. Ушкалов²,**¹ Полтавская государственная аграрная академия, г. Полтава, Украина.² Национальный университет биоресурсов и природоиспользования Украины, г. Киев, Украина

Приведен анализ результатов поиска методов приготовления селективных питательных микоплазменных сред (СПМС) в течение более чем 120-летнего периода учеными нескольких поколений, в том числе и авторами статьи. Первые варианты СПМС имели в качестве основы МПБ или бульон Мартена и сыворотку крови животных. Их качество улучшено путем добавления дрожжевого экстракта (D. G. Edward, 1947). Позже в СПМС ввели дрожжевой экстракт, сыворотку крови лошадей, лактальбумин гидролизат и ДНК (R. M. Chapock et al., 1962). С ее помощью было доказано, что возбудитель первичной атипичной пневмонии человека (агент Итона) есть не вирусом, как считали, а микоплазмой. Это стало мощным стимулом последующего изучения свойств микоплазм и особенностей болезней, которые они вызывают – микоплазмозов людей, животных, птиц, рептилий, рыб, членистоногих и растений. Для их диагностики предложено ряд методов – от культурального (микоплазмологического) до молекулярного типа полимеразной цепной реакции. Однако базовым есть лишь один – микоплазмологический, остальные – дополнительные. Только с его помощью можно получить культуры микоплазм, изучить их биологические свойства, изготовить из них диагнос-

тикумы и вакцины. На его осуществление необходимо иметь СПМС, которые бы обеспечивали микоплазмы пластическим материалом и энергией, и знать условия для их культивирования. Культуру *M. penetrans* изолировали (S. C. Lo et al., 1991, 1992) с проб мочи человека, зараженного вирусом иммунодефицита, спустя 29 лет после идентификации агента Тона как микоплазмы. Это показало, что кроме более 200 видов, культивируемых на сегодняшний день, в природе есть еще пока неизвестное нам их количество. Поэтому поиск их у разных хозяев необходимо продолжить с использованием нескольких усовершенствованных СПМС, ибо предложит их универсальный вариант для всех описанных видов микоплазм пока никому не удалось.

Ключевые слова: микоплазмы, селективные питательные микоплазменные среды, сыворотка крови, экстракт дрожжей.

Початок історії пошуків середовищ. Уперше мікоплазму – збудника контагіозної плевропневмонії (періпневмонії) великої рогатої худоби (ВРХ) виростили у м'ясопептонному бульйоні, який був у колодійному мішечку, вшитому в черевну порожнину кролика [74].

Для виділення і культивування збудників періпневмонії ВРХ та інфекційної агалакції кіз і овець використовували спочатку поживне середовище, у яке входили бульйон Мартена і сироватка крові коня, а пізніше – середовища, основою яких були різні варіанти ферментативного гідролізату тканин тваринного походження. Такі ж середовища були використані при виділенні мікоплазм від хворих на чуму собак [86] та *Acholeplasma (A.) laidlawii* зі стічних вод [69]. Для культивування *Mycoplasma (M.) mycoides* розробили поживне середовище BVF, основою якого став пептон (перевар) з печінки і м'яса ВРХ та добавка 5–10 % сироватки крові коня [91]. Позитивно впливали на ріст збудника і сировотки крові овець, кроликів чи коней [88].

D. Edward (1947) [54] опублікував склад селективного поживного середовища, у яке входили настій з м'язу серця ВРХ (основа), 20 % сироватки крові коня і 10 % екстракту дріжджів. При виділенні мікоплазм з органів розмноження ВРХ до цього середовища рекомендували добавляти ДНК тимусу та муцин шлунків свиней [55].

H. E. Morton et al. (1951) [73] запропонували для мікоплазменного середовища як основу витяжку з серця ВРХ і бактопептон, обезводнену форму якого й сьогодні виготовляють в США (Difco) і Індії (Himedia) і реалізують як бакто – PPLO бульйон та агар Difco [66].

R. Chanock і співавт., (1962) [51] опублікували поживне середовище, у складі якого було 700,0 мл дистильованої води, 28,5 г бакто – PPLO бульйону Діфко, 200,0 мл сироватки крові коня і 100,0 мл 25,0 % екстракту дріжджів. На ньому автори вперше виростили агента Тона (ЦПД – агента на культурі клітин) – збудника первинної атипової пневмонії людей і, таким чином, доказали, що він є не вірусом, як вважали до цього, а мікоплазмою, названою *M. pneumoniae*. Це повідомлення дало досить сильний стимул щодо подальшого розвитку мікоплазмології. Воно підштовхнуло інших дослідників на перевірку ряду ЦПД – агентів (їх вважали не ідентифікованими вірусами), які росли на культурах клітин чи курячих ембріонах і були патогенними для тварин і людини. Так, в 50-ті роки попереднього століття захворювання свиней, при якому спостерігали ураження легень серозно-катаральним запаленням і перебіг у формі ензоотії, називали «вірусною пневмонією». Підстави для цього були – збудника виділяли з патологічного матеріалу з допомогою культур клітин чи курячих ембріонів, вважали вірусом, бо він проявляв цитопатогенну дію на культуру клітин [48, 49]. ЦПД – агент (J – агент), з яким працювали названі вчені, був ідентифікований як мікоплазма – *M. suis pneumoniae* [72, 79].

Середовище R. Chanock і співавт. (1962) [51] модифікували до такого складу: 28,5 г витяжки серця ВРХ, 900 мл дистильованої води, 200 мл сироватки крові коня, 100,0 мл 25,0 % екстракту дріжджів, 12,0 мл 0,2 % розчину ДНК, 10,0 мл 1,0 % розчину оцтовокислого талію і 2,5 мл розчинупеніциліну, що мав 20000 ОД/мл. Згодом воно було відомим як середовище Хейфліка.

Потрібно відмітити, що дослідники того часу особливу увагу звернули на методи приготування екстракту дріжджів. Для цього брали пивні дріжджі. З них готували суспензію на дистильованій воді у співвідношенні 1 : 4, кип'ятили, поки не перестала утворюватися піна і фільтрували, пропускаючи через стерилізуючі пластини фільтру Зейтца [54]. Інші автори готували екстракт з хлібних дріжджів за описаною методикою, але з модифікацією: після кип'ятіння суспензію пропускали через фільтрувальний папір. У фільтраті установляли гідроксидом натрію рН 8,0 і стерилізували в автоклаві [51]. Якість середовища Хейфліка стала значно кращою після того, як у нього ввели екстракт дріжджів, приготований за модифікованою методикою Herst [70]. Він запропонував брати дріжджі і воду у

співвідношенні 1 : 1. У суміші установлювали рН 4,5 і витримувати у водяній бані з температурою 80 °С 20–0 хвилин та фільтрувати через стерилізуючі пластини фільтру Зейтца. В поживному середовищі установлювати рН 7,8–8,0, додаючи розчин двоамінофосфорнокислого калію.

Зважаючи на поради [54], розроблено й описано [22] методику приготування агарового середовища на основі бульйону з настою серцевого м'язу ВРХ. У нього при 60 °С додають до 5 % дефібрированої крові будь-якого виду тварин. Суміш двічі кип'ятять і видаляють «шоколадні пластівці» шляхом пропускання через фільтрувальний папір у стерильних умовах при температурі близько 70 °С, установлюють рН 7,8–8,0; стерилізують текучою парою 5–10 хвилин, охолоджують до 50–55 °С, додають 20 % стерильної сироватки крові коня, розливають у пробірки по 5–7 мл, охолоджують до 20 °С і зберігають при 4 °С. Перед застосуванням нагрівають у водяній бані до 50–55 °С і скошують.

Для виділення мікоплазм з легень свиней, уражених серозно-катаральним запаленням, успішно застосували поживне середовище, у складі якого було 39 % збалансованого розчину Хенкса, 30 % бульйону з легеневої тканини поросят, 20 % інактивованої сироватки крові свиней, 10 % гідролізату лактальбуміну, 0,5 % екстракту дріжджів та пеніцилін і оцтовокислий талій [55]. Згодом R. Goodwin і J. Pryor (1970) замінили в ньому бульйон з легеневої тканини на триптичний перевар м'язу серця ВРХ.

При вивченні мікоплазмозу птахів та інфекційного синуситу індиків використовували поживні середовища BVF, D. Едварда і інші. R. Lemcke (1965) [70] увів у середовище BVF екстракт дріжджів, чим значно підвищив його якість [45].

Отже, D. Edward, H. Morton зі співавт., R. Chanock зі співавт., E. Klineberger – Nobel й інші дослідники суттєво вплинули на подальші дослідження щодо розробки методів виготовлення якісних поживних середовищ для культивування мікоплазм.

Подальші успіхи і проблеми в розробці методів приготування поживних середовищ та їх значення для науки і практики. З 1960 року збільшилася кількість публікацій про мікоплазм та захворюваннях, які вони спричиняють у людей, тварин, птиці й рослин. 1974 року в Бордо проходить Перший міжнародний конгрес з мікоплазменних захворювань рослин і тварин, а 1976 року створюється Міжнародна організація з мікоплазмології (МОМ). 1978 року на Другому конгресі МОМ у Мюнхені й Міжнародному конгресі мікробіологів у Мюнхені було вирішено всі знання про мікоплазми об'єднати в окрему науку мікоплазмологію.

До сьогодні відкрито й описано властивості понад 200 видів мікоплазм. Значна їх частина є збудниками (чи підозрюються в цьому) захворювань людини, тварин, рептилій, риб, членистоногих та рослин [5, 32, 40, 80].

Розробляються нові та удосконалюються уже відомі методи й засоби їх діагностики, профілактики та боротьби з ними. На озброєнні вчених і практиків ветеринарної і гуманної медицини є цілий комплекс методів досліджень властивостей мікоплазм та особливостей мікоплазмозів від мікробіологічного (мікоплазмологічного, культурального) до сучасних генетичних і молекулярних на зразок полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Мікоплазмологічний метод є «золотим стандартом» діагностики захворювань, спричинених молікутами. Тільки з його допомогою можна одержати культури мікоплазм, вивчити їхні біологічні властивості, виготовити з них діагностичуми та вакцини. Він є базовим методом діагностики, а решта – додатковими [2, 3, 5–7, 19, 33, 39, 41, 50, 59].

На виконання мікоплазмологічного методу необхідно мати поживні середовища, які б забезпечували мікоплазми пластичним матеріалом і енергією, та знати умови для їх успішного культивування [1, 4, 5, 7, 16, 18, 20–25, 30–33, 39, 41, 43, 54, 58, 60, 62, 63, 79]. Отже, можна припустити, що проблема культивування молікутів уже розв'язана. Проте це далеко не так. Дехто з авторів [5, 9, 80, 81] підкресливали, що мікоплазми дуже важко культивувати. Вони ростуть слабо й повільно на більшості запропонованих сьогодні поживних середовищ. Це стримує подальше, більш глибоке вивчення властивостей мікоплазм та розробку лабораторних методів діагностики захворювань, які вони спричиняють. Уже більше 30 років усе ще безрезультатно докладають великих зусиль щодо культивування *in vitro* хоча б однієї з фітоплазм, які інфікують комах та рослин. Допускають, що вони потребують анаеробних умов [67, 68, 81].

Паразити еритроцитів тварин – *Haemobartonella* і *Eperythrozoon* – мають ознаки, властиві мікоплазмам. Про це свідчать результати вивчення їх філогенезу, послідовності генів 16 S рибосомальної РНК, відсутність клітинної стінки, чутливість до тетрациклінів, можливість виявлення з допомогою

ПЛР тощо. Їх, як і фітоплазм, поки що не вдається вирощувати на безклітинних поживних середовищах. Тому назріла необхідність у проведенні повторної класифікації молікютів [46, 71].

Культуру чергового виду з класу Mollicutes – *M. penetrans* ізолювали S. C. Lo, et al. (1991, 1992) з сечі людини, зараженої вірусом імунодефіциту, застосовуючи середовище SP 4 [9, 81] через 29 років після ідентифікації агента Ітона як мікоплазми [51]. Це призвело до висновку, що на сьогодні вдалося культивувати лише частину з усієї кількості видів молікютів, існуючих у природі. Тому пошуки їх у різних господарів треба продовжувати, але із застосуванням більш досконалих селективних поживних середовищ [5, 48, 50, 81]. Вони потрібні і для розв'язання інших проблем біології. Зокрема, мікоплазми є зручною моделлю для вивчення геномів мікроорганізмів і дослідів у новому науковому напрямі – синтетичній біології. Зокрема, Крейг Вентер зі співавт. створили штучний геном із синтезованих хімічним шляхом фрагментів ДНК, які методами клонування були зшиті та вставлені до мікроструктурної одиниці наявного у природі виду – *M. genitalium*. Її культура лишилася життєздатною, але з властивостями, зміненими відповідно до штучного геному, до речі, у якому виявили й низку генів з невідомими функціями [53].

Напрями в розробці методів удосконалення якості основних компонентів поживних середовищ. За походженням мікоплазми є гілкою грампозитивних бактерій, які втратили значну частину генів, що забезпечували асимілятивні процеси. У них залишились тільки гени, які найбільш потрібні для збереження життєдіяльності. З іншого боку, в них розвинулись генетичні системи, які забезпечують мінливість зовнішніх протеїнів та ліпопротеїнів. Завдяки цьому мікоплазми уникають контролю імунної системи господаря і виживають лише як паразити [81].

Для успіху в удосконаленні вже схвалених чи розробці нових методів приготування компонентів та поживних середовищ з них дослідники, як правило, беруть до уваги літературні дані; біологічні властивості мікоплазм, зокрема, хімічний склад їх мікроструктурних часток (клітин), потреби в живленні й інші умови, необхідні для росту і розмноження.

У мембранах мікоплазм є в межах 51,0–80,0 % білків, 19,0–40,0 % ліпідів та 0,2–9,0 % вуглеводів. Вони не можуть синтезувати жирні кислоти з довгим ланцюгом та використовувати одну жирну кислоту замість іншої, добавленої в середовище. *A. laidlawii* синтезує лише насичені жирні кислоти, а ненасичені засвоює з середовища. Тому їх туди треба добавляти. На ріст мікоплазм позитивно впливають жирні кислоти з розгалуженим ланцюгом (ізопальмітинова, ізостеаринова й інші) та трансмоноєнові кислоти (елаїдат і інші), індиферентно – з прямим ланцюгом та цисмоноєнові жирні кислоти й негативно діють жирні кислоти, які мають більшу кількість подвійних зв'язків та метильні групи в них. Арахідонова кислота засвоюється мікоплазмами дуже слабо. У мембранах є до 40 % холестеролу, але синтезувати його мікоплазми не можуть. Жирні кислоти й холестерол треба добавляти в середовище як спиртові розчини (спирт до 0,5 %, а холестерол до 10 мкг/мл). Холестерол розчиняють також у твіні-80 (спочатку холестерин розчиняють у спирті 20 мг/мл, а потім в 10 % розчині твіну-80). У мембранах мікоплазм трапляються такі вуглеводи, як галактоза, манноза, фукоза, галактозамін, глюкозамін, глюкоза й сіалова кислота. Сіалова кислота забезпечує негативний електричний заряд на поверхні мікроструктурної частки еукаріота [66–69].

Вимогливі та «некультивуєчі» штами *M. hyorhinae* мають такі ж потреби в живленні, як і культивуєчі, але вони чутливіші до інгібіторної активності окремих компонентів середовища з невизначеним хімічним складом. РНК стимулювала ріст *M. arginini* і *M. hominis*, а сироватка крові плодів – *M. hyorhinae*. Автори запропонували мікоплазменне рідке та щільне поживні середовища CMRL–1066 (M–CMRL), які готують за затвердженими схемами, але додають сироватку крові плоду ВРХ, витриману у водяній бані при 56 °С протягом 30 хв. Щільне середовище готують на основі рідкого з добавкою агарози [4–7, 18, 23–25].

Основа. Ще в попередньому столітті запропоновані як обов'язкові компоненти поживних середовищ для мікоплазм основа (бульйон), сироватка крові та екстракт дріжджів [45, 54]. Вони залишилися такої ж якості в мікоплазменних середовищах, приготовлених за раніше відомими й сучасними прописами. Методики приготування цих компонентів мали деяку відмінність у різних авторів. Широко відомою основою середовищ була і є витяжка з м'язу серця ВРХ і бактопептон [73]. Одержані позитивні результати при випробуванні для цього перевару плаценти, бактопептону, агару і асцитної рідини [56].

М. Ogata (1967) випробував екстракти серця і м'яса декількох видів тварин; екстракти дріжджів, приготовлені різними методами; пептони різного походження й сироватки крові тварин декількох видів. Він дійшов висновку, що найкращий ріст мікоплазм був при застосуванні в середовищах відва-

ру серцевого м'язу ВРХ, сироватки крові коня, свіжого екстракту дріжджів і пептону фірми ВВЛ [45].

У модифікованих середовищах Всесоюзного інституту експериментальної ветеринарії (ВІЕВ) основою були бульйони з екстракту м'яса ВРХ, пептону Мартена, або триптичного гідролізату серцевого м'язу ВРХ [4, 6, 7, 9, 23, 24, 25, 51].

Сироватка крові. Більшість дослідників вводили в поживні середовища для мікоплазм сироватку крові коней чи свиней у 20 % концентрації, що сприятливо впливало на ріст більшості видів мікоплазм. Сироватка крові ВРХ уже в 10 % концентрації затримувала ріст деяких видів мікоплазм [23]. Окремі серії сироваток крові тварин можуть затримувати ріст мікоплазм. Токсичність сироватки крові свиней зникала після обробки її березовим чи кістковим активованим вугіллям (60–70 г/л). Застосування для цього соляної кислоти (до рН 3–3,5), поліетиленгліколю, поліетиленіміну було неефективним [26]. Нативну сироватку крові в середовищі заміняли, правда не завжди з позитивними результатами, сироватковою фракцією ПППО фірми Діфко [47], свіжим знежиреним молоком корів [14], альбуміном сироватки крові ВРХ і свиней [34] чи людини [27], сумішшю альбуміну, холестерину й жирних кислот [84].

Екстракт дріжджів. У середовищах для мікоплазм випробувані екстракти хлібних дріжджів [1, 5, 51, 59, 65], пивних [5, 29, 54, 64] чи будь-яких інших [6, 18, 32, 45, 75]. Екстракт пресованих дріжджів Московського заводу краще стимулював ріст мікоплазм, ніж Лохвицького, а ще краще – рідких дріжджів Полтавського пивзаводу. Всі три види екстрактів готували на дистильованій воді. Але самі дріжджі готували із застосуванням води місцевих водогонів. Крім того, вони відносилися до одного виду – *Saccharomyces cerevisiae*, але різних рас. Навіть на одному заводі можлива заміна однієї раси іншою. На Полтавському пивзаводі замінили расу 11 на РН – мутанта. Причому екстракт з дріжджів раси 11 був кращим стимулятором росту мікоплазм, ніж з РН – мутанту [5].

Екстракт дріжджів є одним з компонентів середовища, без якого неможливий задовільний ріст мікоплазм. З іншого боку, він може містити речовини, які пригнічують їх ріст [61, 78, 81]. Тому на екстракт дріжджів ми звернули особливу увагу. В порівняльному аспекті вивчили можливість впливу на якість екстрактів п'яти зрізів дріжджів, які мали різницю за видами (хлібні, пивні дріжджі), комерційними формами (пресовані, рідкі, сухі) і їх виробниками (Полтавський пивзавод, Львівські пресовані й сухі, Одеські пресовані і Французькі сухі), методиками виготовлення та оптимальною кількістю в середовищі. Завись львівських пресованих дріжджів 25 % концентрації мала 2,8 % білка і її взяли за стандарт. Проби зависів з інших видів дріжджів готували так, щоб вони мали таку ж кількість білку. Для цього, наприклад, сухих дріжджів брали по 6,6 г. Для одержання осаду пивні дріжджі центрифугували при 2000 об./хв протягом 15–20 хвилин. Усі зависі дріжджів готували на бідистильованій або знесоленій воді.

Наші спостереження показали, що екстракт дріжджів інтенсивно стимулював ріст мікоплазм, як що був прозорим, без осаду і мав слабкий жовто-зелений колір. Такі показники зовнішнього вигляду мав екстракт дріжджів з рН 4,5 після фільтрації через азбестові пластини СФ. Але методика його приготування є більш складною, ніж шляхом витримування в автоклаві при 121 °С. В останньому випадку в екстракті з'являлись коричневий колір, опалесценція чи осад. Імовірно, що ці ознаки свідчили про наявність у екстракті інгібіторів росту мікоплазм.

Прозорий екстракт пивних дріжджів з рН 7,8 одержали після попереднього витримування їх при 37 °С протягом 2 годин, пресованих – 2–3 –разового промивання їх зависі фізіологічним розчином натрію хлориду у співвідношенні 1 : 5 – 1 : 10, а осад усунули шляхом двохступеневого витримування екстракту в автоклаві при 121 °С. Спочатку екстракт витримували при 121 °С протягом 5 хв., охолоджували до 20–22 °С і пропускали через фільтрувальний папір. Фільтрат остаточно стерилізували при 121 °С протягом 20 хв. [12–13]. Подібний методичний прийом уже застосовували [5], але щодо бульйонів у середовище для мікоплазм.

Краще за інших стимулювали ріст мікоплазм екстракт полтавських пивних і львівських сухих дріжджів. Оптимальною для росту мікоплазм є концентрація екстракту дріжджів у межах 2–4 об'ємних відсотків.

Мікоплазми, які розкладають аргінін, краще ростуть у середовищі з екстрактом дріжджів з рН 7,8, а глюкозу – рН 4,5 [1, 5, 10–13].

Назви найбільш уживаних селективних поживних середовищ та результати власних пошуків щодо їх удосконалення. Деякі дослідники їх умовно поділяють на середовища з компонентами частково відомим та відомим складом. Частково відомий хімічний склад мають основа (бульйон),

екстракт дріжджів і сироватка крові.

У літературі відомо сотні прописів та методів виготовлення поживних середовищ частково відомого складу для виділення та культивування різних видів молюкутів. Вони включають основу (теплову витяжку з м'язу серця ВРХ, пептон Мартена тощо), екстракт дріжджів, сироватку крові тощо. Сироватку крові лише частково можуть замінити фосфоліпіди, сироватковий альбумін і холестерин, розчинений у 0,01 % розчині твіну-80. Складні мікоплазменні середовища потрібні для забезпечення потреб у живленні мікоплазм і нейтралізації токсичних для них речовини [5, 78]. Експериментально показано, що «некультивуючі мікоплазми» є досить чутливими до токсичних речовин, які є в пептоні та екстракті дріжджів [61], зокрема, жирних кислотах [78, 81].

Від якості компонентів та рецептів приготування середовищ залежить успіх у вирощуванні «дуже вимогливих» до умов культивування і «некультивуючих» мікоплазм. Важливою умовою цього є відсутність у поживному середовищі речовин, які пригнічують їх ріст. Тому контроль якості мікоплазменного середовища треба починати з контролю якості усіх складників його компонентів [5, 16, 92].

Мікоплазми – факультативні анаероби. Тому при первинній ізоляції їх культури краще вирощувати в атмосфері вуглекислого газу. Анаероплазми та астероплазми є суворими анаеробами, бо вони втратили системи, які нейтралізують токсичні властивості кисню. *M. hyorhinis* вимагає аеробної атмосфери [61]. *M. hyopneumoniae* пропонують культивувати на курячих ембріонах, які розвиваються [28].

Описані методики й рецепти приготування середовищ для культивування мікоплазм: модифіковане ВІЕВ, Едварда, середовище на основі триптичного гідролізату м'язів серця ВРХ, Р. Р. Чалквіста для ізоляції *M. synoviae* й інші., а також уреоплазм: модифіковані середовища Хейфліка і Лівінгстона [24].

У гуманній медицині застосовують середовища Хейфліка, Г. Я. Каган, SP – 4, для уреоплазм, агаризоване середовище, А5К і інші [32, 33].

У наступному джерелі [57] приведені рецепти приготування найбільш відомих середовищ для культивування мікоплазм:

1. В – модифіковане середовище Л. Хейфліка (1965), на якому добре ростуть культури більшості видів мікоплазм і ахолоплазм.

2. N є кращим, ніж середовище В для вирощування *M. anatis*, *M. bovigentialium*, *M. edwardii*, *M. felis*, *M. maculosum*, *M. meleagridis*, *M. sputans* та *M. verecundum*.

3. ВАСУ – для культивування *M. faucium* і *M. lipophilum*.

4. F – запропоноване Frey для культивування *M. synoviae*.

5. А26 застосували [85] для вирощування *M. hyopneumoniae* і *M. floccularae*.

6. FF [58 у модифікації 85] для культивування *M. hyopneumoniae*, *M. floccularae* і *M. dispar*.

7. GS, адаптоване R. N. Gourlay and R. H. Leach (1970), для *M. dispar*.

8. SP-4 розроблене для культивування спіроплазм, але ростуть і класичні мікоплазми – *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. fermentans*, *M. dispar*, *M. synoviae*, *M. fastidiosum*, *M. feliminutum*, *M. alvi* та *M. sualvi* [89, 90].

Середовища В, N, ВАСУ і F застосовують в FAO/WHO Міжнародного центру стандартів мікоплазм тварин [57].

Відомі праці щодо розробки й удосконалення компонентів і середовищ для культивування мікоплазм науковцями України [5, 10, 15, 21, 34, 41, 44].

Запропоновано середовище для вирощування *M. mycoides* subsp. *mycoides* (C2) з частково відомим складом, куди входила і знежирена сироваткова фракція С у солюбілізованому холестеролі. В його модифікаціях – середовища С4 та С5 додавали холестерол і жирні кислоти як розчини в етанолі. Середовища попередньо підігрівали. В них був альбумін сироватки крові ВРХ, звільнений від жирних кислот [52, 83]. Середовище С4 запропоновано для вирощування *M. mycoides* subsp. *mycoides* штам Y, а С5 – *M. capricolum* [82]. Ще одне середовище з частково відомим складом рекомендоване для вирощування штамів PG8 і PG9 *A. laidlawii* [76]. У його удосконаленому варіанті тріс – НСІ буфер замінили на буфер з натрієвої солі НЕРЕС, 1 % розчин альбуміну сироватки крові ВРХ фракцію У – на 0,2 % розчин альбуміну сироватки крові ВРХ, обробленого активованим вугіллям, та добавлено елаїдинову кислоту, коензим А і ферментативно гідролізований казеїн без вітамінів як джерело необхідних амінокислот [84].

Наступні автори [25] детально описали методики приготування компонентів і мікоплазменних середовищ:

А. Сироватки крові, екстракту дріжджів, аутолізату дріжджів, ферментативного гідролізату м'яса ВРХ, кислотного гідролізату фаршу шлунків свиней (пептону Мартена), кислотного аутолізату печі-

нки та розчинів цистеїну гідролізату, талію оцтовокислого, НАД та ДПН.

Б. ВІЕВ, УНДІЕВ, М. Хофстада і Л. Доерр, Д. Едварда, Турнера зі співавт., Д. Шіммеля, Р. Р. Чалквіста, Л. Хейфліка, Ф. Фріза та Ф. Ф. Фрея, Ерно і Л. Штіпковича, Р. Горлей і Р. Ліч, Р. Гудвіна і П. Уїттлстоуна, синтетичного середовища для *A. laidlawii*.

В. Середовищ для уреазплазм: У9Ц Шепарда і Лунцендорфа (1970), Робертсона, Ховарда, С. В. Лівінгстона, диференціального щільного середовища А 8. синтетичного середовища для *A. laidlawii* [18, 25].

Г. Середовище для анаероплазм Робінсона.

Д. Середовищ для спіроплазм: МІА, SP-4 [89], BSR [18].

Фірми BBL і Difco (США) готують для мікоплазменних середовищ сухі агарову і бульйонну основи, бульйонну основу для *M. synoviae* (Freu) та добавки (екстракт дріжджів і натуральна сироватка крові коня). Himedia Laboratories (Індія) реалізує в Україні три названі основи з тваринних та рослинних компонентів. Крім того, є також бульйонна основа для урогенітальних мікоплазм і добавка (5 % розчин сечовини) [66].

Середовища відомого складу готувати досить важко. В них треба мати певну кількість ліпідів у нетоксичній формі і не зв'язаних з протеїном. Більшість видів мікоплазм має потребу в жирних кислотах з довгим ланцюгом та в стеролі. Виключення складають ахолеплазми, термоплазми й деякі анаероплазми. Оскільки жирні кислоти з довгим ланцюгом навіть у низькій концентрації викликають лізис мікоплазм, то вони повинні бути в нетоксичній формі, а неестеризована жирна кислота – у зв'язаній з сироватковим альбуміном. Якщо потрібний чіткий контроль кількості жирних кислот у мембранах ліпідів, то бажано видаляти ендогенні жирні кислоти з комерційних препаратів сироваткових альбумінів. Склад жирних кислот в комерційних препаратах є дуже важливим. Так звані чисті препарати жирних кислот в альбуміні сироватки крові ВРХ можуть мати значну кількість жирних кислот і холестеролу. Кількість жирних кислот в альбуміні сироватки крові ВРХ зменшують шляхом обробки активованим вугіллям [52] чи слабо лужним метанолом [83].

Автор [5] випробував якість мікоплазменних середовищ, виготовлених за 56 прописами, у яких перемінною величиною був лише бульйон. Але в них була загальна схема пропису, наведена в таблиці.

Склад середовищ для мікоплазм, яке застосували для випробування різних видів бульйонів

Компоненти середовища	Кількість, мл
Бульйон	650,5
Сироватка крові коня	200,0
Екстракт дріжджів	40,0
Середовище Ігла або 199	40,0
5 % розчин гідролізату лактоальбуміну	50,0
0,2 % розчин ДНК, РНК або їх солей	10,0
5 % розчин талію оцтовокислого	5,0
0,5 % розчин фенолового червоного	2,0
Розчин пеніциліну (100000 Од/мл)	2,5

Джерело: [5].

Їх основу складали бульйон з перевару Хоттінгера; бульйон з пептону, виготовленого зі шлунків поросят (бульйон Мартена); розчин Хенкса, бульйон з легень поросят, бульйон з пептонів шлунків та легень поросят, бульйон з печінки ВРХ, бульйон з пептонів шлунків та печінки поросят, бульйон з триптичного гідролізату серцевого м'язу ВРХ і в поєднанні його з пептоном сухим ферментативним; ферментативний казеїно-дріжджовий аутолізат, виготовлений у Всесоюзному науково-дослідному і технологічному інституті біологічної промисловості й бульйон сухий мікоплазменний (БСМ), виготовлений там же за технологією В. П. Бердника (1986, 1991) [5]; пептон сухий ферментативний, виготовлений згідно з ДГСТ 13805–76 у ППБ Хабаровського науково-дослідного інституту експериментальної медицини; ферментативний гідролізат м'язових білків (ВІЕВ), гепатопептон (Щолковський біокомбінат), бактопептон (Чехословаччина), аутолізат дріжджів, обезводнені компоненти фірми Діфко – бактосерцево-мозковий настій та бакто ПППО бульйон. Найбільшу чутливість при виділенні мікоплазм з патологічного матеріалу і урожайність їх культур спостерігали при застосуванні середовищ, у яких основою був бульйон зі шлунків поросят 4–8-місячного віку або бульйон з триптичного гідролізату серцевого м'язу ВРХ. На середовищі з БСМ, який зберігали у скляному флаконі під гумовою

пробкою протягом 28 років, відмітили такий же рівень урожайності культур мікоплазм, як і на середовищі (контроль), у якому був бульйон, свіжоприготовлений із застосуванням пептону зі шлунків поросят і екстракту м'яса ВРХ.

З метою пошуку стимуляторів росту мікоплазм випробувано 57 видів солей хімічних елементів у різних концентраціях. Їх по одному вводили в поживні середовища, на які висівали одну зі свіжовирощених культур штамів 407 *M. arginini*; П 42, П 63 і Ч-2 *M. hyorhinis*; *M. hyopneumoniae* і 10116 *A. laidlawii*. Вони по-різному впливали на ріст штамів навіть одного виду. Тому було зроблено висновок, що мікоплазменні середовища треба удосконалювати не шляхом додавання компонентів, а поліпшенням якості води (бідистильована, знесолена) і чітким виконанням методик їх приготування, зокрема, бульйону та сироватки крові тварин. Зважаючи на це, автор [5] готував окремо середовища для культивування мікоплазм, які розкладають аргінін, глюкозу та сечовину.

Поживні середовища для мікоплазм продовжують удосконалювати до сьогоднішнього дня по мірі поглиблення наших знань про їхні біологічні властивості. В нашій країні це змушує робити і досить висока вартість компонентів для виготовлення поживних середовищ для мікоплазм фірм Difco, BBL, Numedia тощо. Причому їх якість є на рівні компонентів і середовищ вітчизняного виготовлення. Це було підтверджено і в наших дослідженнях. За їх результатами розроблено два нові методи приготування рідкого поживного середовища [10, 11]. В обох з них основою є сухий ферментативний пептон виробництва «Синбіаз» та в першому був екстракт з сухих дріжджів «Саф – момент» з рН 7,7–7,9, а у другому – екстракт з пивних дріжджів з рН 7,7–7,9. Середовища випробували в порівняльному аспекті з середовищами, описаними в літературі [5, 59, 85] чи виготовленими з відомих компонентів [66], при мікоплазмологічному дослідженні проб легень, уражених серозно-катаральним запаленням, відібраних від 30 свиней з 3 неблагополучних щодо мікоплазмозу господарств. Культури мікоплазм виділили в середньому від 23 (76,7 %) поросят, або в межах від 62,5 до 83,3 % поросят. Чутливість культурального методу в інших авторів складала 87,9 % [5], 56,6 % [19], 50,8 % [29], 91,0 % [36], 50,0–70,0 % [37], 42,5–49,0 % [42] тощо. В асоціації з мікоплазмами найчастіше виділяли від свиней усіх трьох господарств культури *Staphylococcus aureus* (14 голів або 46,7 %), двох – *C. pyogenes* і *Streptococcus pyogenes* по 8 (по 26,7 %) голів і одного господарства – *Bordetella bronchiseptica* 4 (13,3 %) голови. Подібні результати одержали також і інші автори [5, 38]. Антигени з вирощених на наших середовищах культур епізоотичних і еталонних штамів мікоплазм та антисироватки до них, одержаних від кроликів і свиней, випробувані в реакції аглютинації, реакції тривалого зв'язування комплекменту в мікрооб'ємі та в пробі затримки росту. Активність і специфічність одержаних антигенів і антисироваток загалом були на такому ж рівні, як і в опублікованому джерелі [5] чи, навіть, кращими порівняно з одержаними на середовищі, виготовленому з компонентів Numedia. Вартість 1 л середовища з вітчизняних компонентів є в 7–8 разів меншою, ніж із закордонних, при кращій якості. На стільки ж зменшаться і витрати на проведення мікоплазмологічних досліджень патологічного матеріалу та виготовлення мікоплазменних діагностиків і вакцин. Тому є економічна вигода готувати мікоплазменні середовища із застосуванням вітчизняних компонентів.

Висновки

Мета роботи полягала у проведенні огляду та здійсненні аналізу результатів, одержаних упродовж понад 120-річного періоду декількома поколіннями дослідників та авторами статті при розв'язанні однієї з основних проблем мікоплазмології – розробці й удосконаленні селективних мікоплазменних поживних середовищ. Аналіз літературних публікацій за понад столітній період становлення та розвитку мікоплазмології свідчить, що досягнуто певних успіхів у вивченні біологічних властивостей молікутів, зокрема, морфології й хімічного складу мікроструктурних часток, біохімічних особливостей, патогенності та форм її прояву. На основі цих даних розроблені методи приготування компонентів і сотні прописів приготування поживних середовищ з них для культивування молікутів. Ще ніхто не зміг виготовити одне універсальне середовище для всіх описаних їх видів, бо вони мають різні потреби щодо живлення та умов культивування. Певні середовища є придатними для культивування лише декількох видів мікоплазм. Не розроблені поживні середовища для культивування фітоплазм і гемоплазм та інших ще невідомих нам видів молікутів, які, імовірно, населяють організми тварин і рослин.

Перспективи подальших досліджень полягають у подальшій розробці заходів щодо удосконалення засобів та методів культивування молікутів.

References

1. Berdnik, V. P. (1973). Nekotorye biologicheskie svoystva mikoplazm svinej. *Candidate's thesis*. Vsesoyuznij institut eksperimentalnoj veterinarii, Moskva [In Russian].
2. *Tekhnicheskie usloviya TU 10–19–493–87 ot 01.10.1987. Nabor dlya diagnostiki mikoplazmoza svinej v reakcii agglyutinacii (RA)*. Utverzhden 1987-08-14. (1987). GUV Gosagroproma SSSR. Moskva [In Russian].
3. *Tekhnicheskie usloviya TU 10–19–494–87 ot 01.10.1987. Nabor dlya diagnostiki mikoplazmoza svinej v reakcii dlitel'nogo svyazyvaniya komplekta v mikroobeme (RDSKM)*. Utverzhden 1987-08-14. (1987). GUV Gosagroproma SSSR. Moskva [In Russian].
4. Berdnik, V. P., Nastenka, V. D., Dushuk, R. V., Androsik, N. N., Yarcev, M. Ya., Pautov, Yu. N., & Kolesnikov, A. Ya. (1987/1988). *Metodicheskie ukazaniya po diagnostike, profilaktike i meram borby s mikoplazmozom svinej*. Moskva [In Russian].
5. Berdnik, V. P. (1991). Mikoplazmoz svinej. *Doctor's thesis*. Vsesoyuznyj gosudarstvennyj nauchno-kontrolnyj institut veterinarnykh preparatov. Moskva [In Russian].
6. Berdnyk, V. P., Berdnyk, I. Iu., Bublyk, O. O., & Shcherbak, V. I. (2008). Istoriia stanovlennia ta perspektyvy rozvytku muzeiu shtamiv mikoplazm tvaryn i liudyny Poltavskoi ZNDVS. *Veterynarna Biotekhnolohiia*, 13 (1), 214–221 [In Ukrainian].
7. Berdnyk, V. P., Aranchii, S. V., Berdnyk, I. Iu., Bublyk, O. O., & Shcherbak, V. I. (2012). *Metodychni rekomendatsii iz diahnostryky, profilaktyky mikoplazmozu svynei ta zakhodiv borotby z nym*. Poltava [In Ukrainian].
8. Bolotin, V. I., Herilovych, A. P., & Stehni, B. T. (2008). Molekuliarno–biolohichni metody i zasoby v diahnostryti khvorob tvaryn ta kontrol yakosti veterynarnykh preparativ. *Veterynarna Biotekhnolohiia*, 13 (2), 300–308 [In Ukrainian].
9. Borhsenius, S. N., Chernova, O. A., Chernov, V. M., & Vonskij, M. S. (2002). *Mikoplazmy: molekulyarnaya i kletochnaya biologiya, vzaimodejstvie s imunnoj sistemoj mlekoopitayushih, patogennost, diagnostika*. Sankt-Peterburg: Nauka [In Russian].
10. Bublyk, O. O., Berdnyk, V. P., & Berdnyk, I. Iu. (2009). Patent Ukrainy № 54866. Kyiv: Ukrainyskyi instytut intelektualnoi vlasnosti [In Ukrainian].
11. Bublyk, O. O., Berdnyk, V. P., & Berdnyk, I. Iu. (2009). Patent Ukrainy № 54867. Kyiv: Ukrainyskyi instytut intelektualnoi vlasnosti [In Ukrainian].
12. Bublyk, O. O. (2011). Patent Ukrainy № 5718. Kyiv: Ukrainyskyi instytut intelektualnoi vlasnosti [In Ukrainian].
13. Bublyk, O. O. (2011). Patent Ukrainy № 5719. Kyiv: Ukrainyskyi instytut intelektualnoi vlasnosti [In Ukrainian].
14. Vertiev, Yu. V., & Ezepchuk, Yu. V. (1969) Molochnaya sreda dlya kultivirovaniya *M. pneumoniae*. *Labornoje Delo*, 12, 743–746 [In Russian].
15. Hliebova, K. V., Obukhovska, O. V., & Zarembo, I. A. (2009). Vychennia kulturalnykh vlastyvoitei pozhyvnykh seredovyshch dla nakopychennia bakterialnoi masy ptashynykh mikoplazm. *Visnyk Poltavskoi Derzhavnoi Ahrarnoi Akademii*, 3, 129–132 [In Ukrainian].
16. Golovko, A. N. (Ed.). (2007). *Mikrobiologicheskie i virusologicheskie metody issledovanij v veterinarnoj medicynie: spravochnoje posobie*. Kiev. NTMT [In Russian].
17. Hontar, A. M. (1997). Rozrobka ekspres–metodu indykatsii mykoplazm velykoi rohatoi khudoby. *Extended abstract of candidate's*. Instytut eksperymentalnoi i klinichnoi veterynarnoi medytsyny UAAN, Kharkiv [In Ukrainian].
18. Grosheva, G. A., & Shtipkovich, L. (1987). Laboratornaya diagnostika. Izolyaciya mikoplazm, aholeplazm, ureaplazm, spiroplazm. V G. F. Koromyslov, Ya. Mesarosh, L. Shtipkovich (Reds.), *Mikoplazmy v patologii zhivotnyh* (s. 169–184). Moskva: VO «Agropromizdat» [In Russian].
19. Zhonholovych, A. E. (2008). Etyoepyzoetolohycheskye osobennosti mykoplazmoza svynei y usovershenstvovanye metodov eho dyahnostryky y lecheniia. *Candidate's thesis*. Institut veterinarnoj medicynie Federal'nogo gosudarstvennogo obrazovatel'nogo uchrezhdeniia vysshogo profesional'nogo «Omskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet», Omsk [In Russian].
20. Kalashnyk, N. V. (1996). Udoskonalennia skladu zhyvylnoho seredovyshcha dla kultyvuvannia mikoplazm. *Extended abstract of candidate's*. Instytut eksperymentalnoi i klinichnoi veterynarnoi medytsyny UAAN, Kharkiv [In Ukrainian].
21. Kipyrych, V. V., Obukhovska, O. V., Stehni, B. T., Hliebova, K. V., & Buzun, I. A. (2006). Patent

Ukrainy № 18521. Kyiv: Ukrainskiy instytut intelektualnoi vlasnosti [In Ukrainian].

22. Klineberger, N. E. (1966). *Plevropnevmoniepodobnye organizmy (PPPO)*. (A. P. Strelnikov, Trans.). Moskva: Kolos [In Russian].

23. Kovalenko, Ya. R. (1976). *Mikoplazmozy zhyvotnyh*. Moskva: Kolos [In Russian].

24. Kovalenko, Ya. R., Shegidevich, Ye. A., Yablonskaya, I. A., Grosheva, G. A., Mahi, E. T., Frolov, V. S., Pisarenko, N. I., Kazimova, N. A., Shtipkovich, L., Nad, G., Kartashova, V. M., Ignatev, S. V., Vinohodov, O. V., Gaffarov, H. Z., Kurbanov, I. A., Mitrofanov, P. M., Dushuk, R. V., Berdnik, V. P., & Pustovar, A. Ya. (1982). *Metodicheskie rekomendacii po vydeleniyu, kultivirovaniyu i identifikacii mikoplazm, aholeplazm i ureaplazm*. Moskva [In Russian].

25. Koromyslov, G. F., Mesarosh, Ya., Shtipkovich, L., Grosheva, G. A., Dyakonov, L. P., Nad, G., Shegidevich, Ye. A., & Yablonskaya, I. A. (1987). *Mikoplazmozy v patologii zhyvotnyh*. Moskva: Agropromizdat [In Russian].

26. Kurnosov, A. N., Shevchenko, L. V., & Yurkov, S. G. (1986). Detoksikaciya syvorotki krovi svinej, ispolzuej pri kultivirovanii kletok. *Veterinariya*, 1, 24–26 [In Russian].

27. Menshikov, L. F., & Bajzhomartov, M. S. (1977). Pitatel'naya sreda dlya kultivirovaniya Mycoplasma pneumonia. C. c. 560909 USSR, MPK C12K 1/06. *Byul.* 21 [In Russian].

28. Mistejko, M. M. (2005). Kultivirovanie Mycoplasma hyopneumoniae na razvivayushihsiya kurinyh embrionah. *Vesci Nacyyanal'naj Akademii Navuk Belarusi*, 5, 177 – 179 [In Russian].

29. Pautov, Yu. N. (1989). Etiologicheskoe znachenie mikoplazm i stafilokokkov pri enzooticheskoj pnevmonii svinej. *Doctor's thesis*. Institut eksperimentalnoj veterinarii Sibiri i Dalnego Vostoka OO VASHNIL. Novosibirsk [In Russian].

30. Pritulin, P. I., Pilipenko, A. A., & Dushuk, R. V. (1967). Izuchenie roli mikoplazm v etiologii virusnoj (enzooticheskoj) pnevmonii svinej. *Byulleten VIEV*, 3, 13–16 [In Russian].

31. Pritulin, P. I., & Berdnik, V. P. (1972). Rol mikoplazm v patologii svinej. *Byulleten VIEV*, 13, 37–46 [In Russian].

32. Prozorovskij, S. V., Pokrovskij, V. I., & Vasileva, V. I. (1978). *Mikoplazma pnevmonii infekciya*. Moskva: Medicina [In Russian].

33. Prozorovskij, S. V., Rakovskaya, I. V., & Vulfovich, Yu. V. (1995). *Medicinskaya mikoplazmologiya*. Moskva: Medicina [In Russian].

34. Prokofeva, M. T., Kiprych, V. V., & Bobryshev, V. I. (1972). Albumin syrovatky yak zaminnyk syrovatky krovi teplokrovnykh tvaryn u zhyvylynykh seredovyshchakh pry kultyvuvanni *Mycoplasma gallisepticum*. *Veterynariia: Respublikanskiy mizhvidomchyi tematychnyi naukovyi zbirnyk*, 33, 39–42 [In Ukrainian].

35. Rakovskaya, I. V. (1999). *Mikoplazmy i mikoplazmozy cheloveka: rukovodstvo dlya vrachej*. Moskva: Medicina [In Russian].

36. Savostyanova, N. Yu. (2006). Mnogokomponentnaya terapiya vospalitelnyh zabolevanij organov malogo taza, svyazannyh s ureaplazmennoj infekciej. *Extended abstract of candidate's*. GOU VPO Moskovskij gosudarstvennyj mediko-stomatologicheskij universitet, Moskva [In Russian].

37. Sviridova, A. N. (2007). Diagnostika i lechenie telyat pri mikoplazmoz-associirovannoj infekcii. *Candidate's thesis*. Institut veterinarnoj medicyny Federalnogo gosudarstvennogo obrazovatel'nogo uchrezhdeniya vysshogo profesional'nogo «Omskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet», Omsk [In Russian].

38. Symonenko, H. O. (2007). Koniunktyvalno-synovialnyi syndrom mikoplazmennoho pokhodzhennia u molodniaka velykoi rohatoi khudoby. *Extended abstract of candidate's*. Natsionalnyi ahrarnyi universytet, Kyiv [In Ukrainian].

39. Skripal, I. G., & Malikovskaya, L. P. (1984). Sreda SMIMV72 dlya kultivirovaniya fitopatogennyh mikoplazm. *Mikrobiologicheskij Zhurnal*, 46 (2), 71–75 [In Russian].

40. Skrypal, I. H. (2005). Molikuty yak zbudnyky zakhvoriuvan tvaryn, komakh i roslyn. *Ahroekologichnyi Zhurnal*, 1, 7–15 [In Ukrainian].

41. Stehnyi, B. T., Kiprych, V. V., Obukhovska, O. V., Hliebova, K. V., & Buzun, I. A. (2008). *Metodychni rekomendatsii: diahnozyka mikoplazmoziv ptytsi*. Kharkiv [In Ukrainian].

42. Suncova, O. A. (2004). Uovershenstvovanie laboratornoj diagnostiki asociativnogo respiratornogo mikoplazmoza ptic. *Candidate's thesis*. Institut veterinarnoj medicyny Federalnogo gosudarstvennogo obrazovatel'nogo uchrezhdeniya vysshogo profesional'nogo «Omskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet», Omsk [In Russian].

43. Timakov, V. D., & Kagan, G. Ya. (1973). *L-formy bakterij i semejstvo Mycoplasmataceae v patologii*. Moskva: Medicina [In Russian].
44. Ushkalov, V. O., Andrushchenko, V. V., & Tyndyk, V. S. (2009). Patent Ukrainy № 41971. Kyiv: Ukrainskyi instytut intelektualnoi vlasnosti [In Ukrainian].
45. Shegidevich, E. A. (1976). Pitatelnye sredy, metody vydeleniya i identifikacii mikoplazm. V Ya. R. Kovalenko (Red.) Mikoplazmozy zhivotnyh (s. 68–83). Moskva: Kolos [In Russian].
46. Baccaro, M. R., Moreno, A. M., Barbarini, O., Umehara, O., Gonçalves, L. C. B., & Hawkins, P. A. (2002). Field evaluation of the efficacy of the vaccine Respire in the control of enzootic pneumoniae in swine. *Arquivos do Instituto Biológico*, 69 (1), 19–22.
47. Baernstein, H. D., & Quilligan, J. J. (1963). Cultivation of *Mycoplasma pneumoniae* (Eaton agent). *Journal of Bacteriology*, 86 (2), 339–339. doi: 10.1128/jb.86.2.339-339.1963.
48. Betts, A. O., & Beveridge, W. I. B. (1952). Investigations on a virus pneumonia of long duration prevalent in pigs. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 64, 247.
49. Beveridge, W. I. B. (1958). Viruspneumonie der Schweine. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 100 (10), 525–532.
50. Bomelli, W. R., & Nicolet, J. A. (1983). A method for the evaluation of the enzymelinked immunoassay results for diagnostic pneumoniae in pig herds. *Proceedings of the 23rd International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*.
51. Chanock, R. M., Hayflick, L., & Barile, M. F. (1962). Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 48(1), 41–49. doi:10.1073/pnas.48.1.41.
52. Chen, R. F. (1967). Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *Journal OF Biological Chemistry*, 242, 173–181.
53. Kreih Venter. *Vikipediia*. Retrieved from: https://uk.wikipedia.org/wiki/Крейґ_Вентер [In Ukrainian].
54. Edward, D. G. F. (1947). A selective medium for pleuropneumonia-like organisms. *Microbiology*, 1 (2), 238–243. doi: 10.1099/00221287-1-2-238.
55. Edward, D. G., & Fitzgerald, W. A. (1952). A growth factor needed to isolate organisms of the pleuropneumonia group from the genital tract of cattle. *Veterinary Record*, 64, 395.
56. Freundt, E. A. (2009). The occurrence of micromycetes (pleuropneumonia-like organisms) in the female genito-urinary tract. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 32 (4), 468–480. doi: 10.1111/j.1699-0463.1953.tb00275.x.
57. Freundt, E. A. (1983). Culture media for classic mycoplasmas. *Methods in mycoplasmaology*, 127–135. doi: 10.1016/b978-0-12-583801-6.50029-9.
58. Friis, N. F. (1971). Mycoplasmas cultivated from the respiratory tract of Danish pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 12, 69–79.
59. Friis, N. F. (1975). Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nordisk Veterinaermedicin*, 27 (6), 337–339.
60. Friis, N. F., Ahrens, P., & Larsen, H. (1991). *Mycoplasma hyosynoviae* isolation from the upper respiratory tract and tonsils of pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 32 (4), 425–429.
61. Gardella, R. S., & Del Giudice, R. A. (1995). Growth of *Mycoplasma hyorhinis* cultivar alpha on semisynthetic medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (5), 1976–1979. doi: 10.1128/aem.61.5.1976-1979.1995.
62. Goodwin, R., & Pryor, J. (1970). Direct isolation of mycoplasma suis pneumoniae on solid medium from pneumotic lesions in pigs. *Veterinary Record*, 87 (23), 726–727. doi: 10.1136/vr.87.23.726.
63. Goodwin, R. F., Pomeroy, A. P., & Whittlestone, P. (1965). Production of enzootic pneumonia in pigs with a mycoplasma. *Veterinary Record*, 77, 1247–1249.
64. Hayflick, L. (1965). Tissue cultures and mycoplasmas. *Texas Reports on Biology and Medicine*, 23 (1), 285–303.
65. Herderscheê, D. (1963). An improved medium for the cultivation of the Eaton Agent. *Antonie van Leeuwenhoek*, 29 (1), 154–156. doi: 10.1007/bf02046046.
66. *HiMedia. Culture Media Catalogue. HiMedia Laboratories*, (2007). 08,1, 374.
67. Jensen, J. S., Hansen, H. T., & Lind, K. (1996). Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (2), 286–291. doi: 10.1128/jcm.34.2.286-291.1996.
68. Konai, M., Hackett, K. J., Williamson, D. L., Lipa, J. J., Pollack, J. D., Gasparich, G. E., Clark, E. A., Vacek, D. C., & Whitcomb, R. F. (1996). Improved cultivation systems for isolation of the colorado potato

- beetle spiroplasma. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (9), 3453–3458. doi: 10.1128/aem.62.9.3453-3458.1996.
69. Laidlaw, P. P., & Elford W. J. (1936). A new group of filtrable organisms. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences*, 120, 292–303.
70. Lemcke, R. M. (1965). Media for the Mycoplasmataceae. *Laboratory practice*, 14 (6), 712–715.
71. Messick, J. B. (2004). Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology*, 33 (1), 2–13. doi: 10.1111/j.1939-165x.2004.tb00342.x.
72. Moore, R. W., Redmond, H. E., & Livingston, C. W. Jr. (1966). Mycoplasma as the etiology of a metritis – mastitis syndrome in sows. *Veterinary medicine, small animal clinician*, 61 (9) 883–887.
73. Morton, Y. E., Smith, P. F., & Leberman, P. E. (1951). Investigation of the cultivation of pleuropneumonia-like organisms from man. *American Journal of Syphilis, Gonorrhea, and Venereal Diseases*, 35, 361–369.
74. Nocard, E., Roux, E. R., Borrel, A., Salimbeni, A. T., & Dujardin-Beaumetz, L. (1898). Le microbe de la peripneumoniae. *Annales de l'Institut Pasteur*, 12 (1), 240–262.
75. Pftzner, H., & Schimmel, D. (1979). Untersuchungen zur Mykoplasmenmastitis des Rindes. 4. Serologische Einordnung isolierter Mykoplasma mastamme aus 3 Bestande. *Archives of experimental veterinary medicine*, 33 (3), 439–444.
76. Razin, S., & Cohen, A. (1963). Nutritional Requirements and Metabolism of Mycoplasma laidlawii. *Journal of General Microbiology*, 30 (1), 141–154. doi: 10.1099/00221287-30-1-141.
77. Razin, S., & Rottem, S. (1976). Techniques for the manipulation of Mycoplasma membranes. In A. H. Maddy (Ed.). *Biochemical Analysis Membranes* (pp. 3–26). London: Chapman & Hall.
78. Razin, S. (1978). The mycoplasmas. *Microbiological Reviews*, 42 (2), 414–470. doi: 10.1128/mmbr.42.2.414-470.1978.
79. Razin, S., & Tully, J. G. (Ed.). (1983). *Methods in Mycoplasmaology: Vol. 1–2*. Academic Press: N.Y., London et al.
80. Razin, S., & Tully, J. G. (1995). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. doi: 10.1016/b978-0-12-583805-4.x5000-6.
81. Razin, S., Yogeve, D., & Naot, Y. (1998). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1094–1156. doi: 10.1128/mmbr.62.4.1094-1156.1998.
82. Rodwell, A. W. (1969). A defined medium for Mycoplasma strain Y. *Journal of General Microbiology*, 58 (1), 39–47. doi: 10.1099/00221287-58-1-39.
83. Rodwell, A. W., & Peterson, J. E. (1971). The effect of straight-chain saturated, monoenoic and branched-chain fatty acids on growth and fatty acid composition of Mycoplasma strain Y. *Journal of General Microbiology*, 68 (2), 173–186. doi: 10.1099/00221287-68-2-173.
84. Rodwell, A. W. (1983). Defined and partly defined media. *Methods in Mycoplasmaology*, 163–172. doi: 10.1016/b978-0-12-583801-6.50033-0.
85. Rose, D. L., Tully, J. G., & Wittler, R. G. (1979). Taxonomy of some swine mycoplasmas: *Mycoplasma suis pneumoniae* Goodwin et al. 1965, a later, objective synonym of *Mycoplasma hyopneumoniae* Mare and Switzer 1965, and the status of *Mycoplasma flocculare* Meyling and Friis 1972. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29 (2), 83–91. doi: 10.1099/00207713-29-2-83.
86. Schoetesack, H. M. (1934). Pure cultivation of the filterable virus isolated from canine distemper. *Kitasato archives of experimental medicine*, 11, 277.
87. Switzer, W. P. (1972). Mycoplasmal pneumonia of Swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 160 (4), 651–653.
88. Tang, F. F., Wei, H., McWhiter, D. L., & Edgar, J. (1935). An investigation of the causal agent of bovine pleuropneumonia. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 40 (2), 391–406. doi: 10.1002/path.1700400220.
89. Tully, J. G., Rose, D. L., Whitcomb, R. F., & Wenzel, R. P. (1979). Enhanced isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from throat washings with a newly modified culture medium. *Journal of Infectious Diseases*, 139 (4), 478–482. doi: 10.1093/infdis/139.4.478.
90. Tully, J. G. (1983). General cultivation techniques for Mycoplasmas and Spiroplasmas. *Methods in Mycoplasmaology*, 99–101. doi: 10.1016/b978-0-12-583801-6.50024-x.

91. Turner, A. W. (1935). A study of the morphology and life cycles of the organism of pleuropneumonia contagiosa boum (*Borrelomyces peripneumoniae* nov. gen.) by observation in the living state under dark-ground illumination. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 41 (1), 1–32. doi: 10.1002/path.1700410102.

92. Windsor, D., & Windsor, H. (1998). Quality-Control Testing of Mycoplasma Medium. *Mycoplasma Protocols*, 61–67. doi: 10.1385/0-89603-525-5:61.

Стаття надійшла до редакції: 21.02.2020 р.

Бібліографічний опис для цитування

Бердник В. П., Бердник І. Ю., Ушкалов В. О. Історія пошуку методів приготування селективних поживних середовищ для культивування мікоплазм. *Вісник ПДАА*. 2020. № 1. С. 202–215.

© Бердник Василь Петрович, Бердник Ірина Юріївна, Ушкалов Валерій Олександрович, 2020