

ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

КОЗАК НАТАЛІЯ ІГОРІВНА

УДК 619:616.98:579.873.21

ДИСЕРТАЦІЯ

**ФІЛЬТРІВНІ ФОРМИ ДИСОЦІАНТІВ *MYSOBACTERIUM BOVIS*:
ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ЇХ БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ**

Галузь знань: 21 – Ветеринарна медицина

Спеціальність: 211 – Ветеринарна медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Н. І. Козак

Науковий керівник:

Ткаченко Олексій Андрійович, доктор ветеринарних наук, професор
--

Зажарський Володимир Володимирович,
кандидат ветеринарних наук, доцент

Дніпро – 2021

АНОТАЦІЯ

Козак Н. І. «Фільтривні форми дисоціантів *Mycobacterium bovis*: ідентифікація та їх біологічні властивості». – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – Ветеринарна медицина» – Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, 2021.

Дисертаційна робота присвячена вивченню біологічних властивостей (культуральні, тинкторіальні властивості, морфологія, ферментативна активність, вірулентність) дисоціативних форм *Mycobacterium bovis* і їх фільтривних форм та визначенню ефективної методики ідентифікації фільтривних форм.

Проблема туберкульозу актуальна як для ветеринарної, так і для гуманної медицини. Складності у вирішенні цієї проблеми обумовлені надзвичайною гнучкістю метаболічних процесів в мікобактеріальних клітинах, їх здатністю змінювати морфологію та ферментативну активність у відповідь на дію зовнішніх факторів – це значно ускладнює діагностику цього захворювання та можливість викорінення збудника. В дослідженні використано 15 культур *M. bovis*, які зберігали на живильному середовищі протягом 9–12 років в умовах низьких плюсових температур ($3,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Використані культури протягом тривалого часу піддавались впливу декількох несприятливих чинників: низька температура, нестача поживних речовин і зниження вмісту кисню через використання мікобактеріями в процесі життєдіяльності.

Установлено, що багаторічно збережені мікобактерії, проявляють свою життєздатність і за пересіву на свіже живильне середовище здатні утворювати субкультури. З'ясовано, що така здатність на 28,0 % вища в культур, які зберігалися на середовищі з рН 6,5. Виявлено здатність мікобактерій субкультур швидкорослого штаму *M. bovis* зростати за

температури $3,0\pm 0,5$ °C, чого раніше не спостерігали. Встановили, що за висіву на свіже живильне середовище лише 66,7% із багаторічно збережених культур виявились здатними утворювати нові субкультури. В інших 33,3 % росту не виявили за жодного температурного режиму, що може свідчити про втрату здібності розмножуватись після тривалого зберігання.

Порівнявши морфологію мікобактерій до зберігання та за проходження 9-12 років відмітили поліморфізм (паличкоподібні, довгі ниткоподібні варіанти, зерна, та L-форми). Довготривале зберігання призвело до формування зерен та L-форм та втрати кислотостійкості більшістю бактеріальних клітин. Дослідивши мікобактерії культур методом скануючої електронної мікроскопії відмітили незвичну рельєфність поверхні клітини, за багаторічного зберігання культур, в той час, як в клітин молодих культур поверхня була гладенькою.

Культуральні властивості отриманих субкультур відрізнялись від вихідних культур. Деякі субкультури виявились пігментоутворюючими. Більшість субкультур за температури культивування $37,0\pm 0,5$ °C мали жовтий та помаранчевий, а за $3,0\pm 0,5$ °C – синьо-зелений пігменти. Поверхня в більшості культур була гладка (S).

У культурах багаторічно збережених та субкультурах, отриманих з них, реєструвався поліморфізм мікобактерій. Під час мікроскопії виявляли палички різної довжини та товщини із заокругленими кінцями, довгі ниткоподібні форми, зерна (елементарні тільця), округлі та овальні L-форми різної величини. Мікобактерії субкультур в переважній більшості не були кислотостійкими.

Біологічною пробою на морських свинках встановлено втрату вірулентності дослідними культурами. Під час біопроби в заражених тварин не спостерігали зниження маси тіла, утворення виразок в місці введення завису мікобактерій та збільшення пахвинних лімфатичних вузлів, алергічна реакція на введення ППД-туберкуліну була відсутня. По закінченню терміну дослідів (90 діб) констатували відсутність патологоанатомічних змін в

органах. Після першої біологічної проби з органів лабораторних тварин вдалось виділити культури в 100,0 % випадків, після другої біопробы – 50,0 %, а після третьої – жодної культури не було виділено.

Доведено існування в популяції мікобактерій фільтривних форм, здатних проходити через бактеріальні фільтри з розміром пор 0,05 та 0,1 мкм. Такі форми за висіву на живильне середовище здатні реверсувати в паличко-, овало- та кокоподібні морфологічні форми, зерна та рости утворюючи нові культури. Дослідженням встановлено, що низька температура культивування – $3,0 \pm 0,5$ °C сприяє кращому виділенню культур мікобактерій з фільтратів, отриманих за проходження через фільтри з порами обох розмірів (0,05 і 0,1 мкм).

Генерування в фільтривних форм в культурах мікобактерій не є постійною ознакою та коливається в залежності від зміни середовища існування. Найвища здатність до генерування фільтривних форм спостерігалась в культурах, які отримали після одноразового пасажування культур адаптованих до існування *in vitro* через організм морських свинок (виділяли 100,0 % культур). В культурах отриманих після дворазового пасажування через організм лабораторних тварин фільтривних форм виділялось менше – 75,0 %, а в культур багаторічно збережених *invitro* та молодих субкультур лише 50,0 %.

Культури, отримані з фільтратів мали культуральні властивості, відмінні від вихідних (зміна форми, розміру колоній і пігменту) і меншу інтенсивність росту. Мікроскопічним дослідженням культур виявлено елементарні тільця та L-форми. Культура отримана із завису фільтрованого через бактеріальний фільтр з розміром пор – 0,05 мкм, повністю змінила свою морфологію та була утворена клітинами з дефіцитною клітинною стінкою. За тинкторіальними властивостями мікобактеріальні клітини, які утворювали ці культури, не володіли кислотостійкістю.

Розміри бактеріальних клітин в культурах, отриманих після проходження через бактеріальні фільтри, були більші, ніж в контрольних

(нефільтрованих). Чим меншим був діаметр пор фільтра, тим більшими виявлялись клітини мікобактерій в культурах отриманих з фільтратів.

Дослідженням за допомогою методу скануючої електронної мікроскопії встановлено, що мікобактерії досліджених культур здатні розмножуватись трьома різними способами: бінарний поділ, асиметричне ділення та брунькування. При розмноженні паличкоподібних та овалоподібних форм бінарним поділом реєструвалось характерне V-подібне розташування клітин. За розмноження асиметричним способом ділення з довгої ниткоподібної форми утворювались дві та більше паличкоподібних. Розмноження брунькуванням було характерне для гігантських L-форм мікобактерій. За цього типу розмноження спостерігалось утворення на одному з кінців бактеріальної клітини брунькоподібного відростку, який поступово збільшувався в розмірах і перетворювався на нову бактеріальну клітину з дефіцитною клітинною стінкою, подібну до материнської. Після остаточного формування дочірньої клітини та набуття її розмірів наближених до материнської відбувалось їх роз'єднання

Мікобактерії здатні змінювати біохімічну активність під впливом зовнішніх факторів. У дисоціативних форм (117-а, 117-б, 117-в, 118) зі збільшенням кількості пересівів субкультур підвищується активність нітратредуктази та знижується активність пероксидази, дегідрогенази та каталази (порівнювали 15 і 240 генерації). Низька плюсова температура культивування ($3,0 \pm 0,5$ °C) сприяє підвищенню каталазної активності та здатності до гідролізу ТВІН-80.

Після одноразового пасажування через організм морських свинок, *M. bovis* підвищує активність дегідрогенази та каталази, знижує нітратредуктазну активність і здатність до гідролізу ТВІН-80. Після другого пасажу через організм морських свинок в отриманих культур знизилась дегідрогеназна активність, підвищились здатність до редукції нітратів і до гідролізу ТВІН-80 порівняно з культурами, отриманими після першого пасажу через організм лабораторних тварин. В культурах, отриманих з

фільтратів, ферментативна активність дегідрогенази, нітритредуктази та здатністю до гідролізу ТВІН-80 була нижчою, проте каталазна активність була виражена в мікобактерій майже всіх культур. Пероксидазна активність була відсутня в усіх культурах окрім контрольного вірулентного штаму.

Результати дисертаційної роботи можна використовувати в науково-дослідницькій роботі кафедр і в освітньому процесі для підготовки фахівців зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина», а також при виділенні фільтривних форм бактерій в науково-дослідних установах і плануванні заходів діагностики, боротьби та профілактики туберкульозу в господарствах

Ключові слова: мікобактерії, фільтрування, туберкульоз, L-форми, елементарні тільця, виживання, адаптація, морфологія, кислотостійкість, біохімічні властивості, ферментативна активність.

ANNOTATION

Kozak N.I. Filtrable forms of *Mycobacterium bovis* dissociation: identification and their biological properties. – Qualifying work on the rights of the manuscript.

The thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 211 «Veterinary Medicine» – Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, 2021.

The aim of the thesis is to study biological properties (cultural, tinctorial properties, morphology, enzymatic activity, virulence) of dissociative forms of *Mycobacterium bovis* and their filtrable forms and to develop effective methods of these forms identification.

The problem of tuberculosis is relevant for both veterinary and humane medicine. It cannot be solved easily because of extreme flexibility of metabolic processes in mycobacterial cells, their ability to change morphology and enzymatic activity in response to external factors, so the diagnosis of this disease and the possibility of the pathogen eradication are very complicated. The study used 15 cultures of *M. bovis*, which were stored on nutrient medium for 9–12 years at low above-zero temperatures ($3,0 \pm 0,5$ °C). For a long time used cultures have been exposed by several adverse factors: low temperature, lack of nutrients and reduced oxygen content due to the use of mycobacteria in the life process.

The research confirmed that mycobacteria, which have been stored for many years, show their viability and are able to form subcultures when transplanted to fresh nutrient medium. This ability is by 28.0% higher in cultures stored in a medium with a pH of 6.5. The study showed that fast-growing strain of subcultures mycobacteria of *M. bovis* can grow at a temperature of $3,0 \pm 0,5$ °C, which was not observed before. Only 66.7% of long-term stored cultures were able to form new subcultures after placing on fresh nutrient medium. The other 33.3% did not grow

at any temperature, which may indicate a loss of reproductivity after prolonged storage.

Comparing the morphology of mycobacteria before storage and after 9-12 years storage period, we noted polymorphism (rod-shaped, long filamentous variants, granules, and L-forms). Long-term storage has led to the formation of granules and L-forms and loss of acid resistance by most bacterial cells. Examining the cultures mycobacteria by scanning electron microscopy we noted that the long-term storage cultures have unusual cell relief, while the surface of young cultures cells was smooth.

The cultural properties of the obtained subcultures differed from the original ones. Some subcultures turned out to be pigment-forming. Most subcultures had yellow and orange pigments at cultivation temperatures of $37,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, and blue-green pigments at $3,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. The surface of the most cultures was smooth (S).

Mycobacterial polymorphism was registered in long-term storage cultures and subcultures obtained from them. Microscopy revealed rods of different lengths and thicknesses with rounded ends, long filamentous shapes, granules (elementary bodies), rounded and oval L-shapes of different sizes. Most of subcultures mycobacteria were not acid-resistant.

The guinea pig bioassay revealed loss of virulence by experimental cultures. During the bioassay there was no decrease in animals body weight, ulceration at the site of injection of mycobacterial suspension and enlargement of inguinal lymph nodes. Allergic reaction to the introduction of PPD-tuberculin was absent. At the end of the experiment (90 days) we stated the absence of pathological changes in the organs. After the first biological sample from the organs of laboratory animals we managed to isolate cultures in 100.0% of cases, after the second - 50.0%, and after the third – no culture was isolated.

The experiment proved the existence of filtrate forms capable to pass through bacterial filters with a pore size of 0.05 and 0.1 μm . After an inoculation on a nutrient medium such forms are able to reverse into rod-, oval- and coccoid morphological forms, granules and grow to form new cultures. The study found

that the low culture temperature - $3,0 \pm 0,5$ °C promotes better isolation of mycobacteria cultures from the filtrates obtained by passing through filters with pores of both sizes (0.05 and 0.1 μm).

Creation of filterable forms in mycobacteria cultures is not a constant feature and varies depending on habitat changes. The highest ability to generate filter forms was observed in cultures obtained after a single passage of cultures adapted to the existence *in vitro* through the body of guinea pigs (isolated 100.0% of cultures). In cultures, obtained after two passages through the body of laboratory animals, it was released less filtrate forms - 75.0%, and in cultures of long-term storage *in vitro* and young subcultures only 50.0%.

Cultures, which obtained from the filtrates, differed from the original ones (change in shape, size of colonies and pigment) and had lower growth intensity. Microscopic examination of cultures detected elementary bodies and L-forms. The culture, obtained from inoculation, which was filtered through a bacterial filter with a pore size of 0.05 μm , completely changed its morphology and was formed by cells with a deficient cell wall. According to tinctorial properties, the mycobacterial cells that formed these cultures did not have acid resistance.

The size of bacterial cells in cultures obtained after passing through bacterial filters were larger than in control (unfiltered). The smaller the pore diameter of the filter was, the larger the mycobacterial cells in the cultures obtained from the filtrates were.

Scanning electron microscopy has shown that the mycobacteria of the studied cultures are able to reproduce in three different ways: binary division, asymmetric division and budding. During the reproduction of rod-shaped and oval-shaped forms by binary division, the V-shaped arrangement of cells was registered. During reproduction by asymmetric method of division, two or more rod-shaped ones were formed from a long filamentous one. Reproduction by budding was characteristic of giant L-forms of mycobacteria. In this type of reproduction, the formation of a bud-like process at one end of the bacterial cell was observed, which gradually increased in size and turned into a new bacterial cell with a

deficient cell wall similar to the mother's one. After the final formation of the daughter cell and after its size was close to the mother's, their separation took place.

Mycobacteria are able to change biochemical activity under the influence of external factors. In dissociative forms (117-a, 117-б, 117-B, 118) with increasing number of subculture inoculation, the activity of nitrate reductase increases and the activity of peroxidase, dehydrogenase and catalase decreases (compared 15 and 240 generations). The low above-zero cultivation temperature ($3,0 \pm 0,5$ °C) increases the catalase activity and the ability to hydrolyze TWIN-80.

After a single passage through the body of guinea pigs, *M. bovis* increases the activity of dehydrogenase and catalase, reduces nitrate reductase activity and the ability to hydrolyze Tween-80. After the second passage through the body of guinea pigs dehydrogenase activity in the obtained cultures decreased, the ability to reduce nitrates and hydrolysis of Tween-80 increased compared with cultures obtained after the first passage. In the cultures obtained from the filtrates, the enzymatic activity of dehydrogenase, nitrite reductase and the ability to hydrolyze TWIN-80 was lower, but the catalase activity was expressed in mycobacteria of almost all cultures. Peroxidase activity was absent in all cultures except the control virulent strain.

The results of the dissertation can be used in research work of departments and in the educational process for teaching applicants in the specialty 211 "Veterinary Medicine", as well as in the selection of filtrate forms of bacteria in research institutions and in planning measures for diagnosis, control and prevention of tuberculosis on farms.

Key words: mycobacteria, filtration, tuberculosis, L-forms, elementary bodies, survival, adaptation, morphology, acid resistance, biochemical properties, enzymatic activity.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Наукові праці, в яких опубліковано основні результати дисертації:

1.1. Статті у фахових виданнях України:

1. **Козак, Н. І.** (2018). Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія *M. bovis* різних морфологічних форм за тривалого зберігання та низьких плюсових температур. Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету, (1-2), 36-41 (*Здобувач провела дослідження та підготувала статтю до публікації*).

2. Ткаченко, О. А., **Козак, Н. І.**, Білан, М. В., & Пономаренко, А. Р. (2019). Залежність біохімічної активності *Mycobacterium bovis* від пасажів та температури культивування. Theoretical and Applied Veterinary Medicine, 7(2), 84–89. doi:10.32819/2019.71015 (*Здобувач провела дослідження та підготувала статтю до публікації*).

1.2. Статті у наукових виданнях, включених до наукометричних баз даних

Web of Science, Scopus

3. Tkachenko, O., Bilan, M., Hlebeniuk, V., **Kozak, N.**, Nedosekov, V., & Galatiuk, O. (2020). Dissociation of *Mycobacterium bovis*: Morphology, Biological Properties and Lipids. Advances in Animal and Veterinary Sciences, 8(3). doi:10.17582/journal.aavs/2020/8.3.317.326 (*Здобувач брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті*).

4. Tkachenko, O., **Kozak, N.**, Bilan, M., Hlebeniuk, V., Alekseeva, N., Kovaleva, L., ... Galatiuk, O. (2021). The Effect of Long-Term Storage on *Mycobacterium bovis*. Polish Journal of Microbiology, 70(3). doi:10.33073/pjm-2021-031 (*Здобувач брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті*).

2. Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

5. Ткаченко О.А., **Козак Н.І.** Вплив середовища на частоту виділення фільтривних форм мікобактерій. Аграрний вісник Причорномор'я. Ветеринарні науки. Випуск 93 181-187. *Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми епізоотології та заразних хвороб тварин» присвяченій 80-річчю від дня народження професора Атамася В. Я.*, Одеса, 24–26 жовтня 2019 року. (Здобувач провела дослідження та підготувала статтю до друку.)

6. **Козак Н. І.** Вплив температури культивування та віку культур *Mycobacterium bovis* на появу L-форм. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Вирішення сучасних проблем у ветеринарній медицині»*, Полтава, 14–15 лютого 2019 року, С 92 – 93. (Здобувач провела дослідження та підготувала тези до друку.)

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	15
ВСТУП.....	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	22
1.1. Мікобактерії в історії людства.....	22
1.2. Атипові форми мікобактерій.....	24
1.3. Характеристика бактеріальних L-форм.....	27
1.4. Поняття фільтривності.....	32
1.5. Значення L-форм в інфекційному процесі	34
1.6. Ферментативна активність мікобактерій.....	41
1.7. Висновок з огляду літератури.....	49
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	51
2.1. Місце проведення досліджень.....	51
2.2. Матеріали досліджень.....	51
2.2.1. Дослідні культури мікобактерій.....	51
2.2.2. Живильні середовища.....	52
2.3. Методи досліджень.....	53
2.3.1. Бактеріологічні дослідження.....	53
2.3.2. Фільтривні методи.....	55
2.3.3. Метод растрової електронної мікроскопії.....	58
2.3.4. Біохімічні методи.....	59
2.3.5. Статистичні методи	61
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	62
3.1. Морфологія, тинкторіальні та культуральні властивості мікобактерій дослідних культур.....	62
3.1.1. Морфологія, тинкторіальні та культуральні властивості мікобактерій багаторічно витриманих культур.....	62

	14
3.1.2.Морфологія, тинкторіальні та культуральні властивості мікобактерій отриманих субкультур.....	68
3.1.3.Електронна мікроскопія мікобактерій дослідних культур.....	72
3.2.Визначення ступеня вірулентності мікобактерій дослідних культур....	74
3.3. Особливості фільтривних форм мікобактерій.....	79
3.3.1.Здатність мікобактерій дослідних культур проходити через бактеріальні фільтри.....	79
3.3.2.Морфологія, тинкторіальні та культуральні властивості фільтривних форм мікобактерій.....	84
3.3.3.Електронна мікроскопія фільтривних форм.....	89
3.4. Ферментативна активність мікобактерій дослідних культур.....	98
3.4.1. Коливання активності ферментів мікобактерій залежно від кількості пасажів та температури культивування.....	98
3.4.2. Вплив пасажування через організм лабораторних тварин на ферментативну активність мікобактерій.....	101
3.4.3. Ферментативна активність фільтривних форм.....	104
3.4.4. Здатність мікобактерій дослідних культур розмножуватись і накопичуватись на простих живильних середовищах і за наявності натру саліциловокислогою.....	108
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	115
ВИСНОВКИ.....	134
ПРОПОЗИЦІЇ ИРОБНИЦТВУ.....	136
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	137
ДОДАТКИ.....	166

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АСМ – атомно-силова мікроскопія

ГНК – препарати групи гідразидів ізонікотинової кислоти

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЗАТ НТЦ – закрите акціонерне товариство, науково-технічний центр

МО – міжнародні одиниці

МПА – м'ясо-пептонний агар

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон

МФАС – Мікрофільтраційна мембрана, суміш ацетатів целюлози

ПЕМ – просвічуюча електронна мікроскопія

ППД –protein purified derivativate

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РЕМ – растрова електронна мікроскопія

СЕМ – скануюча електронна мікроскопія

ТБ – туберкульоз

Ф-0,05 – фільтрат отриманий після проходження завису мікобактерій через бактеріальний фільтр з діаметром пор 0,05 мкм

Ф-0,1 – фільтрат отриманий після проходження завису мікобактерій через бактеріальний фільтр з діаметром пор 0,1 мкм

CWD –cell wall defictient / defective – бактерії з відсутньою / дефектною клітинною стінкою

ВСТУП

Актуальність теми. На сьогодні проблема туберкульозу залишається актуальною як у ветеринарній, так і в гуманній медицині. Мікобактеріями туберкульозу інфіковано близько третини населення світу, однак ці мікроорганізми здатні роками та десятиліттями виживати в організмі не завдаючи йому шкоди (Bloom & Murray, 1992; Jasmer et al., 2002; Anuchin et al., 2009; Катола, 2013). На думку багатьох вчених висока виживаність мікобактерій у організмі та поза ним пов'язана з неймовірною метаболічною гнучкістю цих мікроорганізмів (Edson, 1951; Ramakrishnan et al., 1972; Niederweis, 2008; Akbar & Farni, 2012; Gotsulia et al., 2018; Sosnytsky, 2018; Zazharskyi et al., 2020; Бібен et al., 2021).

Морфологічна форма збудника туберкульозу, на певному етапі циклу розвитку має особливі біологічні властивості, які часто не ідентифікуються, але мають суттєве значення в інфекційному та епізоотичному процесах. Останнім часом у фахових виданнях все частіше зустрічаються повідомлення ряду авторів про можливість одночасного існування деяких альтернативних шляхів розмноження мікобактерій та існування цих збудників у декількох морфологічних формах (Vera & Rettger, 1940; Smeulders et al., 1999; Bentrup & Russell, 2001; Young et al., 2005; Anuchin et al., 2009; Velayati et al., 2009; Farnia et al., 2010; Singh et al., 2010; Shleeva et al., 2002, 2011; Markova et al., 2012; Akbar & Farni, 2012; Лысенко et al., 2015; Ткаченко et al., 2017; Цинзерлинг & Агапов, 2017). Зокрема повідомлення Ткаченка вказують на те, що фільтривні форми є одним з альтернативних шляхів розмноження мікобактерій та способом їх пристосування до умов навколишнього середовища (Ткаченко et al., 2009; Ткаченко, 2014, 2017). Вони відіграють важливу роль у репродуктивному циклі *M. bovis* і здатні самостійно розвиватись в різних напрямках залежно від одержаного стимулу. Некислотостійкі *M. bovis* нитко- та паличкоподібної форми здатні

реверсувати за безпосередньої участі фільтривних форм у вихідну бактеріальну кислотостійку форму.

В умовах сьогодення, ефективній діагностиці туберкульозу бактеріологічними методами перешкоджають різноманіття атипівних форм мікобактерій, а також наявність ультрадрібних форм. Без сумніву, відсутність досконалих знань про біологічні властивості фільтривних форм мікобактерій визначає ефективність профілактики та викорінення інфекції.

Це свідчить про необхідність удосконалення методики та техніки ідентифікації фільтривних форм, а також дослідження їх біологічних властивостей. З'ясування цих питань може сприяти більш глибокому розумінню біології мікобактерій, що, в свою чергу, має безпосередній вплив на вирішення питань боротьби з інфекцією.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планами науково-дослідних робіт кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету «Розробка системи профілактики та боротьби з туберкульозом тварин, який викликаний швидкорослими штамами *M. bovis*, *M. avium* та їх дисоціативними формами» (2010–2020 рр.), номер державної реєстрації – 0110U002413; «Вивчення епізоотологічних особливостей мікобактеріальних інфекцій та з'ясування біологічних властивостей їх збудників, вдосконалення засобів профілактики та боротьби з ними» (2021–2025 рр.), номер державної реєстрації – 0121U109321.

Мета і завдання. Мета роботи – дослідити фільтривні форми дисоціантів *M. bovis* культивовані за різних температур у динаміці багаточисельних пасажів через щільне живильне середовище та лабораторних тварин, з'ясувати їх біологічні властивості та розробити методику ідентифікації.

Для досягнення мети поставлено такі завдання:

- вивчити культуральні, тинкторіальні властивості та морфологію *M. bovis* музейних штамів;
- дослідити зміни морфології, культуральних, тинкторіальних та біохімічних властивостей *M. bovis* за різних термінів зберігання;
- визначити патогенність *M. bovis* в залежності від тривалості зберігання (без пересівів) за умов різних температур;
- оцінити ступінь генерування фільтривних форм в культурах мікобактерій в залежності від віку культур і пасажування через лабораторних тварин;
- вивчити залежність коливання ферментативної активності *M. bovis* від терміну пасажування через лабораторних тварин і фільтрації.
- розробити методику ідентифікації фільтривних форм *M. bovis*

Об'єкт дослідження – збудник туберкульозу, швидкорослі *M. bovis*, їх дисоціативні варіанти, фільтривні форми.

Предмет дослідження – морфологічні, тинкторіальні, культуральні властивості; ферментативна активність; ідентифікація фільтривних форм дисоціантів *M. bovis*.

Методи дослідження: бактеріологічний (мікроскопія, виділення культур мікобактерій), біохімічний (визначення каталази, пероксидази, дегідрогенази, редукції нітратів, гідролізу ТВІН-80), біологічний (зараження морських свинок), патолого-анатомічний (встановлення макроскопічних змін в органах і тканинах за туберкульозу), аналітичний, статистичний.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше доведена можливість *M. bovis* генерувати ультрадрібні форми, здатні проходити через бактеріальні фільтри з діаметром пор 0,05 мкм.

Вперше розроблена та експериментально підтверджена методика ідентифікації фільтривних форм *M. bovis*. Визначено ефективність культивування за температури $3,0 \pm 0,5$ °C для виділення культур мікобактерій з фільтратів.

Визначено, що культури мікобактерій отримані з фільтратів, володіють низькою активністю ферментів нітратредуктази, дегідрогенази, здатністю до гідролізу ТВІН-80; низькою здатністю утворювати культури на звичайних живильних середовищах та яєчному середовищі з додаванням натру саліцилату.

За допомогою електронно-мікроскопічних досліджень детально вивчено спосіб розмноження мікобактерій різних морфологічних форм. Встановлено тенденцію до втрати кислотостійкості в мікобактерій багаторічно (9-12 років) витриманих культур, генерування в їх популяції поліморфних та L-форм.

У дисертаційній роботі вирішено актуальне наукове завдання, яке полягає у виявленні фільтривних форм дисоціантів *M. bovis* у динаміці багаточисельних пасажів через щільне живильне середовище та лабораторних тварин і за тривалого зберігання, з'ясуванні їх біологічних властивостей та розробці методики ідентифікації. У дисертаційній роботі досягнуто таких наукових результатів: науково обґрунтовано значення та роль фільтривних форм в біологічному циклі розвитку дисоціантів *M. bovis*; детально досліджено біологічні властивості ультрадрібних форм дисоціантів *M. bovis*; розроблено методику ідентифікації фільтривних форм.

Практичне значення одержаних результатів полягає в можливості застосування наукових положень і висновків досліджень у практичній діяльності епізоотологів і бактеріологів; у процесі викладання дисциплін з епізоотології та мікробіології у вищих навчальних закладах; під час написання навчальних посібників; під час проведення лабораторних досліджень та аналізу їх результатів; під час планування заходів діагностики, боротьби та профілактики туберкульозу в господарствах. Розроблену методику ідентифікації фільтривних форм мікобактерій культуральним методом на щільному яєчному живильному середовищі Мордовського (рН 6,7) за температурного режиму культивування $3,0 \pm 0,5$ °С, доцільно використовувати під час досліджень в науково-дослідних установах, та

лабораторіях, оскільки вона проста у виконанні та не потребує закупівлі високовартісного обладнання та спеціальних синтетичних живильних середовищ.

Матеріали дисертаційної роботи використовуються в освітньому процесі та науково-дослідній роботі викладачів і студентів спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» на кафедрі епізоотології та інфекційних хвороб тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету; на кафедрі епізоотології, мікробіології та вірусології Національного університету біоресурсів і природокористування; на кафедрі епізоотології та мікробіології Державного біотехнологічного університету; на кафедрі інфекційних та інвазійних хвороб Подільського державного аграрно-технологічного університету; на кафедрі ветсанекспертизи, мікробіології, зоогієни та безпеки і якості продуктів тваринництва Сумського національного аграрного університету; на кафедрі епізоотології, паразитології та мікробіології ім. проф. В. Я. Атамася Одеського державного аграрного університету.

Особистий внесок здобувача. Здобувач самостійно опрацювала та провела аналіз наукової літератури з напрямку досліджень, освоїла методи та виконала весь запланований обсяг експериментальних досліджень, їх статистичну обробку, узагальнила одержані результати, сформулювала висновки та пропозиції виробництву. Разом з науковим керівником сформульовано тему, мету та завдання роботи, сплановано експериментальні дослідження, проведено аналіз одержаних результатів.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації доповідались та обговорювались на наукових конференціях професорсько-викладацького складу, наукових співробітників та аспірантів Дніпровського державного аграрно-економічного університету (Дніпро, 2017–2021 рр.); на міжнародній науково-практичній конференції «Інфекційна патологія тварин: сучасні методи діагностики, лікування та профілактики» (Дніпро, 21–22 вересня 2018 р.); на всеукраїнській науково-практичній конференції «Вирішення

сучасних проблем у ветеринарній медицині» (Полтава, 14–15 лютого 2019 р.); на міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми епізоотології та заразних хвороб тварин» присвяченій 80-річчю від дня народження професора Атамася В. Я. (Одеса, 24–26 жовтня 2019 р.); на IV міжнародній науково-практичній конференції «Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування» (Львів, 19-22 вересня 2021 р.).

Публікації. Основний зміст дисертаційної роботи викладено у 6 наукових працях, із яких 2 опубліковано у фахових виданнях України, 2 – у періодичних наукових виданнях інших держав, які входять до складу Європейського Союзу, включених до наукометричних баз даних Scopus, 1 – матеріали конференції, 1 – тези наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Основний зміст дисертації викладений на 136 сторінках комп'ютерного тексту та ілюстрований 27 таблицями та 27 рисунками. Робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел літератури, який складається із 237 найменувань, у тому числі 185 – латиницею та 10 додатків.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Мікобактерії в історії людства

Проблема туберкульозу супроводжує людство багато віків. Видоутворення членів *Mycobacterium tuberculosis complex*, за оцінками дослідників, сталось приблизно 15 000–20 000 років тому (Sreevatsan et al., 1997; Brosch et al., 2002). Що стосується саме *M. bovis*, деякі вчені (Broschet al., 2002) припускають, що в процесі еволюції, *M. tuberculosis* – найпоширеніший етіологічний агент туберкульозу людини, перетворився на збудника туберкульозу великої рогатої худоби шляхом специфічної адаптації збудника людини до нового господаря – тварини (Stead et al., 1995). До такого висновку вчені прийшли завдяки генетичному аналізу, з'ясувавши, що геном *M. bovis* менший, ніж у *M. tuberculosis* (Gordon et al., 2001). Це здається правдоподібним, бо *M. bovis* є кінцевим членом окремого роду, представленого *M. africanum* (RD9), *M. microti* (RD7, RD8, RD9, RD10) і *M. bovis* (RD4, RD5, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, RD13), що розгалужується від родоначальника *M. tuberculosis*. Послідовна втрата ДНК могла спричинити клональну експансію та появу більш успішних збудників у нових господарів (Brosch et al., 2002; Бібен et al., 2021).

З часу утворення та до сьогодні даний мікроорганізм розвивався разом із господарем протягом тисячоліть. За підрахунками, в доантибіотичну еру *M. bovis* був причиною приблизно 6% смертей від туберкульозу в людей (Hardie & Watson, 1992; O'Reilly & Daborn, 1995; Hershkovitz et al., 2008). Це підтверджують вагомні докази того, що мікобактеріальні інфекції траплялись на землі кілька тисяч років тому. Ідентифікація кислотостійких бактерій, а також ПЛР-ампліфікація IS6110 з перуанських мумій, дозволяють припустити, що туберкульоз існував у доколумбових товариствах Центральної та Південної Америки (Salo et al., 1994). Хворобу підтверджено ПЛР дослідженням зразків кісток із типовими ураженнями за туберкульозу

жінки та немовляти, які були поховані разом на затопленому зараз місці Атліт-Ям у Східному Середземномор'ї, датованому 9250-8160 роками тому. Мікобактеріальну ДНК також було виділено з 17000-річного скелета зубрів (Rothschild et al., 2001; Brosch et al., 2002). Відомо, що на туберкульоз хворіли древні єгиптяни під час правління фараонів, оскільки в мумії того періоду (3500-2650 pp. До н. Е.) (Zink et al., 2001), були виявлені зміни скелета притаманні для захворювання на туберкульоз, такі як колапс хребців (хвороба Потта), реактивні ураження окістя та остеомієліт (Ortner & Putschar, 1985; Nerlich et al., 1997). Подібні палеопатологічні зміни були зареєстровані в Швеції в період неоліту (3200-2300 pp. До н. Е.) (Brosch et al., 2002). Це найдавніші випадки туберкульозу, підтверджені ДНК-аналізом. Давніші випадки, визнані лише скелетними змінами, були виявлені в неоліті в Італії на початку IV тисячоліття до нашої ери (Formicola et al., 1987; Canci et al., 1996). Ерозійні ураження, що свідчать про туберкульоз, були виявлені на викопній фауні з печери Natural Trap Cave у штаті Вайомінг, починаючи з 17 000 до 20 000 років (Rothschild & Martin, 2011), а туберкульоз в одному зразку був підтверджений біомолекулярними методами (Rothschild et al., 2001). Свідченням старовини хвороби є виявлення неспецифічних морфологічних змін, що відповідають туберкульозу в скам'янілості *Homoerectus* з Туреччини, що датується середнім плейстоценом (490-510 000 років до н. е.) (Karpelman et al., 2008; Hershkovitz et al., 2008).

У теперішній час, туберкульоз великої рогатої худоби – хвороба міжнародного значення, яка має наслідки для здоров'я як тварин, так і людей. Стратегію викорінення цієї хвороби необхідно постійно переглядати та оновлювати, виявляючи і, по можливості, усуваючи перешкоди для прогресу (Collins, 2006; Good & Duignan, 2011; Sheridan, 2011; Dawson et al., 2014). Хоча програми ліквідації були успішними в багатьох державах-членах Європейського Союзу (ЄС) і в таких країнах, як Австралія та Великобританія, за останні 20 років підвищився рівень захворюваності. Хоча в ЄС існує план викорінення цієї хвороби, захворюваність продовжує рости

незважаючи на інтенсивні заходи контролю (Karolemeas et al., 2011; Shcherbyna et al., 2018; Zazharskyi et al., 2020).

Це все є підтвердженням того, що мікобактерії мають неймовірний потенціал до виживання, і протягом віків залишаються здатними викликати туберкульоз як у тварин так і у людей. Хоча вчені вже багато десятиріч досліджують ці мікроорганізми, не зважаючи на всі досягнення в цій області мікробіології, захворювання й досі залишається не викореним. Причиною цього, ймовірноше всього, є неймовірна пластичність мікобактерій, здатність, у відповідь на зміни середовища існування, значно трансформуватися морфологічно, змінювати метаболізм і біохімічні процеси всередині бактеріальних клітин, та навіть зазнавати змін на генетичному рівні. Вивчення цих змін, а також їх впливу на виживаність клітин мікобактерій може дати уявлення про можливі шляхи подолання цього захворювання в майбутньому.

1.2. Атипові форми мікобактерій

G. Enderlein сформулював теорію, де науково обґрунтував явище поліморфізму та неможливості мономорфізму, оскільки природа не створює статичних, незмінених життєвих форм, та існування різних стадій, фаз і форм розвитку та репродукції мікроорганізмів (Катола, 2013).

Туберкульозна паличка є прототрофною (тобто вона може побудувати всі свої компоненти з основних джерел вуглецю та азоту) і гетеротрофною (тобто використовує вже синтезовані органічні сполуки як джерело вуглецю та енергії) метаболічно гнучкою бактерією (Ramakrishnan et al., 1972; Niederweis, 2008). Успіх туберкульозних паличок як патогена можна пояснити його надзвичайною здатністю адаптуватись до змін навколишнього середовища протягом усього періоду інфекції (Edson, 1951; Mattman, 1970; Ramakrishnan et al., 1972; Atlas, 2017). Серед факторів, які можуть впливати на форму клітин мікобактерій: вік культур, забезпеченість поживними речовинами, фізичні умови (гіпоксія, температура, рН, осмотичний тиск) та

інші умови екзогенного стресу (Vera & Rettger, 1940; Young et al., 2005; Anuchin et al., 2009; Velayati et al., 2009; Farnia et al., 2010; Singh et al., 2010; Shleeva et al., 2002, 2011; Markova et al., 2012; Atlas, 2017). Мікобактерії володіють високою життєздатністю та стійкістю до висушування та заморожування, хімічних і фізичних факторів, зберігаючи патогенність (Палій et al., 2016).

В останні роки спостерігаються зміни в біології збудників туберкульозу і прояву інфекції. Тривале пасажування культур мікобактерій, дія на них антибактеріальних препаратів та опромінення можуть призвести до явища дисоціації, розвитку пігментних і некислотостійких варіантів, зумовити L-трансформацію клітин та утворення ультрадрібних форм мікобактерій, здатних до реверсії (Палій, 2013, 2018; Gotsulia et al., 2018).

За даними наукової літератури мікобактерії туберкульозу можуть існувати в різних формах, які можна об'єднати в ряд груп:

- фільтривні, ультрадрібні, спороподібні форми, зерна Муха, «уламки» Шпенглера, світлопереломлюючі зерна (Fontes, 1910; Гольшевская, 2003; Ghosh et al., 2009; Beran et al., 2012);
- некислотостійкі паличкоподібні та колбоподібні форми (грампозитивні та грамнегативні, незернисті та із зернами) ;
- некислотостійкі кокковидні форми (дипло-, тетра-, стрепто-, міко-);
- кулясті, овоїдні, осмотично низькорезистентні L-форми ;
- округлі «їжакоподібні» (з голчатими виростами) структури (Асташова, & Кадочкин, 1989);
- фунгоїдні та ниткоподібні форми;
- протопласти (скупчення зернистої маси), симпласти, шестигранні утворення (Бондарев et al., 1976; Земскова & Дорожкова, 1984; Николаева & Дорожкова, 1988; Власенко, 1998; Chandrasekhar & Ratnam, 1992; Guliang & Tefu, 1999; Mattman, 2000; Markova et al., 2008; Лемиш, 2008; Beran et al., 2012; Lysenko et al., 2015).

Існує кілька варіантів походження атипичних мікобактерій:

1) потрапляння в організм ззовні сапрофітів, споріднених з туберкульозними мікобактеріями, що мають з ними схожі тинкторіальні та антигенні властивості;

2) атипові форми мікобактерій можуть бути перехідними етапами між звичайними мікобактеріями та їх L-формами;

3) при активному розмноженні мікобактерій, особливо брунькуванням, молоді мікроорганізми спочатку набувають саме атипової форми;

4) можливий зворотний процес: перетворення звичайних форм в кокоподібні в кінці життєвого циклу, коли клітини коротшають і приймають кокоподібну форму. Кокоподібні клітини деякий час продовжують розмножуватись, а потім переходять в стан спокою. Таким чином, мікобактерії в своєму розвитку проходять цикл перетворень з паличкоподібних форм в кокоподібні (Chandrasekhar & Ratnam, 1992; Шлеева et al., 2010; Veran et al., 2012; Цинзерлинг & Агапов, 2017).

За роки досліджень було досягнуто значного прогресу в характеристиці різних аспектів мікобактеріальної інфекції та адаптації до різних умов навколишнього середовища (Young et al., 2005; Boshoff & Barry, 2005; Anuchin et al., 2009).

Так, у своїх дослідях Vera & Rettger, (1940) показали, що за несприятливих умов (тобто при обмеженому запасі поживних речовин або нестачі кисню), мікобактерії виглядають опуклими. Вони вивчали чотири штами *M. tuberculosis (hominis)*, «Кох», 607, 75 і H37. Коли вони перекрили подачу повітря, невдовзі з'явилися різні морфологічні варіанти. Бактерії дещо опукли, цитоплазма стала менш чіткою та гладкою. Ці набряклі структури ставали все більш рефракційними та більш різко відмежованими, поки, нарешті, не набули певної подібності зі спорами (Akbar & Farni, 2012).

Мікобактерії стають коротшими в старіших культурах, мають ниткоподібний характер всередині макрофагів і яйцеподібні під час голодування. Після перенесення в свіже живильне середовище сферичні

бактерії здатні регенерувати в паличкоподібні клітини (Young et al., 2005; Farnia et al., 2010; Shleeva et al., 2011).

Stewart-Tull (1965) у своїй роботі представив культури *M. tuberculosis*, *M. kansasii* і *M. phlei* які піддались голодуванню. У результаті вони спочатку втратили кислотостійкість, але в цьому хромофобному стані вони вижили не менше двох років, і після цього утворили культури кислотостійких швидкорослих бактерій при перенесенні на свіже живильне середовище.

У моделі Уейна (Wayne & Hayes, 1996) культури бактерій піддавались поступовому самогенеруючому виснаженню кисню шляхом інкубації в герметичних пробірках з мішалкою. Після повільного зсуву аеробного зростання *M. tuberculosis* в анаеробні умови культура виявилась здатною адаптуватись і виживати за анаеробіозу, переходячи в стан нереплікуючої персистенції (Акбар & Farni, 2012).

Хоча феномен утворення L-форм характерний для багатьох прокариотів, у мікобактерій ця властивість має особливий інтерес, тому що саме просторова структура та хімічний склад клітинної стінки забезпечують їх унікальні властивості: починаючи від тинкторіальних і закінчуючи імуносупресивними (Цинзерлинг & Агапов, 2017).

Наразі атипові мікобактерії складають вагому проблему для господарств, адже їх наявність в гуртах може значно ускладнювати діагностику туберкульозу лікарями ветеринарної медицини. Так, за даними вітчизняних дослідників (Завгородній, & Котляр, 2014; Завгородній et al., 2012; Глебенюк & Теліженко, 2015; Палій, 2018), серед поголів'я ВРХ у благополучних щодо туберкульозу господарствах України, циркулює багато видів атипових мікобактерій, що зумовлює реакції на туберкулін (ППД) для ссавців.

1.3. Характеристика бактеріальних L-форм

L-форми були вперше виявлені Еммі Клінебергер-Нобель в 1945 році. Вони були виділені з культур *Streptobacillus moniliformis* і утворювали типові

колонії форми «смажені яйця». Безстінкові варіанти L-форм дослідниця названа на честь закладу в якому вона працювала – Англійського Інституті Лістера (Klieneberger-Nobel, 1951).

Період між 1882 і 1940 роками, після того як Роберт Кох виявив причину туберкульозу, був відзначений низкою робіт, в яких повідомлялось про появу елементів L-форм в культурах мікобактерій, таких як фільтривні форми, розгалужені нитки, синцитіальний ріст, великі сфери та «строкатий міцелій», всі з яких характеризували ріст мікобактерій.

Підвищений інтерес до утворення L-форм туберкульозними мікобактеріями спостерігався в середині ХХ ст., коли вже був накопичений значний матеріал, що стосувався спостережень фільтривних форм збудника, що мають атипову морфологію та нестабільні тинкторіальні властивості, саме відкриття процесу втрати бактеріями клітинної стінки допомогло просунутись в цьому напрямку. Принциповим моментом в дослідженнях L-форм мікобактерій стало відкриття та повсюдне впровадження хіміотерапевтичних методів лікування туберкульозу, що ознаменувало новий етап у вивченні мікобактерій з нетиповою морфологією, коли стало зрозуміло, що L-трансформація викликана безпосередньо антибактеріальними засобами (Цинзерлинг & Агапов, 2017).

Mattman et al. (1960, 1970, 2001) узагальнила відомі дані про здатність *M. tuberculosis* перетворюватись в форми з дефіцитом клітинної стінки та припустила «L-цикл» для мікобактерій – коли за певних обставин бактерії можуть проявити незбалансований ріст і проходити складні життєві цикли, що включають різні морфологічні перетворення. Термін «дефіцит клітинної стінки» – це зміни в складі бактеріальної клітинної стінки, що виникає в результаті видалення та неправильного синтезу компонентів стінки. Вважається, що дисбаланс здатності клітини руйнувати та синтезувати її класичну товсту стінку призводить до дефіциту клітинної стінки. Втрата пептидоглікану є відмінною характеристикою клітинної стінки недосконалих форм (L-форм) (Markova, 2012) .

Важливі характеристики бактеріальних L-форм – це плеоморфізм і втрата жорсткості через відсутність шару мерініна. Мікобактерії з дефіцитною клітинною стінкою характеризуються неузгодженим поширенням, появою сильно плеоморфних форм і цілком інакшою бацилярною фізіологією.

Залежно від ступеня втрати клітинної стінки прийнято виділяти протопласти та сферопласти. Протопласти повністю позбавлені клітинної стінки подібно мікоплазмам. Сферопласти знаходяться в проміжному положенні зважаючи на неповну втрату клітинної стінки, отже, їх фізіологічні та тинкторіальні властивості також мають риси як звичайних кислотостійких мікобактерій, так і справжніх L-форм (Markova et al., 2012).

Морфологічно модифіковані L-форми *M. tuberculosis* важко ідентифікувати та тому вони часто залишаються невизнаними (Markova et al., 2008; Markova, 2009). Різноманітні морфологічні форми мікобактерій спостерігались багатьма авторами, які описували їх як великі «амебоподібні клітини», гігантські неклітинні структури або «брунькоподібні дріжджоподібні структури», «елементарні тіла та ниткоподібні структури», «ендоспори», «яйцеподібні клітини» та мікрококи (Merkal et al., 1973; Imaeda, 1975; Koch, 2003; Ghosh et al., 2009; Traag et al., 2009; Shleeva et al., 2011; Markova et al., 2012; Цинзерлинг & Агапов, 2017).

Те, що у різних джерелах атипові форми мікобактерій мають різні назви, в черговий раз підтверджує високий ступінь поліморфізму, викликаного різними поєднаннями таких процесів, як нерівномірний поділ, брунькування, протрузія-екструзія елементарних тілець і гранул, внутрішньоклітинна фрагментація цитоплазми та ін. Описано так звані материнські клітини – своєрідні симпласти, які при розпаді дають безліч гранулярних структур.

Виходячи з вищесказаного зрозуміло, що в прямій залежності від стану клітинної стінки мікобактерій знаходяться і їх тинкторіальні властивості, особливо на прикладі класичного забарвлення за Цілем-Нільсенем.

Безпосередні механізми втрати клітинної стінки ще належить вивчити. Зокрема, існує варіант, за якого синтез компонентів клітинної стінки не припиняється та вони продовжують через мембранні пори виходити на зовнішню поверхню клітини, однак в подальшому не з'єднуються в єдину структуру.

Провідним елементом процесу зникнення бактеріальної клітинної стінки з подальшою втратою форми клітини (через відсутність жорсткого каркаса) є втрата пептидогліканів, несучих опорну функцію, пригнічення біосинтезу яких є одним з основних напрямків L-трансформуючої дії протитуберкульозних препаратів.

За відсутності потужної клітинної стінки, яка затрудняє обмін речовинами з навколишнім середовищем, L-форми мікобактерій демонструють здатність до прискореного, а в порівнянні зі звичайним повільним метаболізмом мікобактерій – буквально бурхливого зростання на будь-яких стандартних середовищах, особливо в вигляді кокоподібних і вегетуючих форм (Цинзерлинг & Агапов, 2017).

Дефіцит клітинної стінки (наявність без жорстких стінок) у мікобактерій і його виникнення в природних умовах – один з можливих шляхів, завдяки яким туберкульозні бактерії можуть виживати, розмножуватись і зберігатись протягом тривалого періоду прихованого туберкульозу в організмі з ризиком реактивації захворювання, у випадку повернення до класичних туберкульозних паличок при зміні імунного статусу господаря. По суті, дефіцит клітинної стінки або здатність бактерій існувати як популяції форм, що само відтворюються, з дефектною або повністю відсутньою клітинною стінкою (L-форми), вважається адаптивною стратегією, за якої бактерії виживають і розмножуються за несприятливих обставин.

Деякі автори вважають, що спонтанне виникнення L-форм – це природна фаза їхнього способу життя. Широко підтримується думка про те, що конверсія в L-форми – це універсальна особливість бактерій. Унікальність бактеріальних L-форм обумовлена тим, що незалежно від їх

походження у них існує загальний морфологічний фенотип і подібні характеристики росту (Markova et al., 2008; Allan et al., 2009; Domingue, 2010; Markova, 2009; Beran et al., 2012; Markova et al., 2012).

У роботі Markova (2009) була висунута гіпотеза «Інь-Ян», яка ґрунтується на ідеї, що класичні форми та форми з дефіцитною клітинною стінкою співіснують у природних мікобактеріальних популяціях. Морфологічне різноманіття в бактеріальних популяціях часто пов'язане з гетерогенністю середовищ, що спостерігається за природних умов. Морфологічну мінливість і появу дефіциту клітинної стінки *M. tuberculosis* можна вважати природним явищем, що забезпечує адаптаційну стратегію цього патогена під час зміни середовища існування бактерій (Mattman, 2001).

Автори виявили, що у клінічних, свіжовиділених із мокротиння хворих, штаммах *M. tuberculosis*, співіснують як класичні форми, так і форми з дефіцитною клітинною стінкою (L-форми) (Michailova et al., 2005). Це підтверджує, що мікобактеріальна популяція зазвичай складається з класичних форм туберкульозних паличок і невеликої кількості L-форм. Існують дані, що свідчать про співіснування класичних форм та форм з дефіцитними клітинними стінками (L-форм) в природних популяціях інших бактерій, а також про взаємодію між ними за різних умов (Fodor & Rogers, 1966; Boris et al., 1969; Markova, 2012).

Здатність *M. tuberculosis* виробляти варіанти L-форм була продемонстрована *in vitro* з використанням як клінічних, так і референтних штамів. Markova et al. (2012) спостерігали, що мікобактеріальні L-форми втрачають кислотостійкість і змінюють морфологію. Крім того, спостерігалась широка морфологічна мінливість, наявність великих і елементарних тіл, кокоідів і дрібних гранульованих форм, а також поява незвичайного нерегулярного ділення клітин. В процесі спостереження за гігантським L-корпусом, автори побачили вихід численних ізольованих гранул. Дуже дрібні гранульовані елементи, були здатні проходити через бактеріальні фільтри з розміром пор 0,22 мкм.

У дослідженні Slavchev et al. (2013) для виділення варіантів L-форм використовували моделі, в яких застосовували криогенні стресові реакції *Mycobacterium bovis*, а також метод фільтрації з подальшим культивуванням в напівтвердому середовищі. Авторам вдалось отримати життєздатні фільтривні форми з контрольного штаму *M. bovis*. При спостереженні за нормальною культурою *M. bovis*, виявили, що вона містить невеликі L-тіла, здатні проходити через фільтри з розміром пор 0,22 мкм.

1.4. Поняття фільтривності

Фільтривність або здатність проходити через фільтри з розміром пор 0,22 мкм – одна з характеристик бактеріальних L-форм, вперше продемонстрована в 1951 році Emmy Klieneberger-Nobel для L-форм *Streptobacillus moniliformis* і пізніше підтверджена для L-форм інших бактерій. Таким чином, прийнято вважати, що фільтривні тіла – найменший репродуктивний елемент і відіграють важливу роль в життєвому циклі L-форм. Domingue (2010) припускає, що L-форми, як відомо, стійкі до факторів стресу навколишнього середовища, а також здатні розвиватися в недиференційовані клітини, які мають потенціал для необмеженого зростання та ділення. Він також стверджує, що ці крихітні L-тіла – основний елемент бактеріальної персистенції, адже вони можуть містити бактеріальний геном і володіти мінімальною метаболічною здатністю, достатньою для початку розмноження (Slavchev et al.; 2013).

В роботі Ткаченка (2017) стверджується, що елементарні тільця є невід'ємною складовою біологічного циклу розвитку мікобактерій, бо саме з них (фільтривних форм) утворюються паличкоподібні форми цього виду мікроорганізмів. Також дослідження дисоціативних варіантів *M. bovis* засвідчили, що фільтривні форми мікобактерій генеруються в популяції мікроорганізмів постійно та за багаточисельних пасажів через штучне живильне середовище підвищується частота утворення ультрадрібних форм. Робота переконуюче стверджує, що дисоціативні елементарні тільця можуть

культивування одночасно з іншими формами, зберігаючи можливість реверсії в некіслотостійкі форми збудника туберкульозу.

Результати, отримані в експериментах Slavchev et al. (2013) по фільтрації, підтвердили, що фільтривні форми життєздатні, оскільки з них розвивались культури шляхом подальшого культивування. Цікаво відзначити, що фільтривні форми, отримані з культур L-форми, викликали новий L-цикл, отримані з контрольного штаму, показали процес агрегації та подальше відновлення бацилярної морфології. Виходячи з таких спостережень, автори припускають, що наявність дуже малих (фільтривних) L-тіл в популяції *M. bovis* може вказувати на потенціал цього патогена для отримання варіантів L-форми в умовах стресу.

Експеримент по фільтрації Markova et al. (2012) з L-формами *M. bovis* BCG показав також наявність у вакцинному штамі найменших L-тіл, які могли проходити через бактеріальні фільтри та утворювати колонії.

Domingue & Woody (1997) припускають роль малих електронно-щільних тіл (фільтривних гранул) в якості стійких форм патогенні бактерії. Halabarder (1958, 1963) зазначив, що L-форми мікобактерій помітно відрізняються від L-форм інших видів в їх стійкості до фізичних і хімічних агентів. Подібно пріонам, мікобактеріальні L-форми уникають руйнування імунною системою організму та, здавалося би, нетлінні. Ці L-форми мікобактерій містять як РНК, так і білки ДНК, але погано фарбуються звичайними барвниками. З іншого боку, передбачається, що найменші та найстійкіші до впливу навколишнього середовища фільтривні L-гранули, які містять ДНК, можуть володіти ядерними функціями (Klieneberger-Nobel, 1951). Крім того, хромосому ДНК, особливо в L-симплазмі, слід розглядати як істотну масу нуклеоїдного тіла, яка може динамічно взаємодіяти з іншими компонентами (Allan et al, 2009). Це проблемне питання все ще обговорюється, тим не менш, незалежно від того, наскільки маленьким і, на перший погляд, енуклеюваними, деякі з цих L-форм здаються, вони здатні повернутись назад до вірулентних мікобактерій.

З точки зору теорії L-циклу, перехід мікобактерій з кислотостійких в некислотостійкі форми відбувається швидше одночасно з появою поліморфних клітин з дефіцитною клітинною стінкою у відповідь на стрес. L-форми розвиваються в кілька етапів і призводять до утворення поліморфних або кокоподібних швидкозростаючих клітин. Початкова фаза L-перетворення, ймовірно, відповідає «невидимій» стадії, коли бактерії перестають утворювати колонії на твердому живильному середовищі та ростуть у рідких середовищах. Markova (2012) припускає, що формування та збереження гігантських структур L-форм (філаменти, синцитія та «материнська клітина»), вкривають і втілюють багато індивідуумів в загальній оболонці, що являє собою унікальний механізм виживання та може нагадувати «невидимий» або загадковий стан розвитку L-форм. Однак в якийсь момент розвитку L-форм, ці гігантські сферичні або ниткоподібні форми починають розпадатись, поступаючись місцем гранульованим і кокоподібним формам, які іноді стають переважаючими елементами в L-популяції. Кокоподібні форми мікобактерій, так звані «мікрококи», були отримані *in vitro* Csillag в 1964 році. Мікрококи були вирощені з *M. tuberculosis* і були схожі морфологічно на стафілококів. Однак генетичний аналіз мікобактеріальних кокоїдів, виконаний Markova (2012), підтвердив належність до *M. tuberculosis*. Автори вважають, що за невидимою фазою L-конверсії йде стан активного розмноження некислотостійких швидкозрослих і нерозпізнаних як мікобактерії L-форм, зазвичай з кокоподібною морфологією.

1.5. Значення L-форм в інфекційному процесі

Повернення L-форм до нормальних батьківських бактерій є важливою властивістю та індукується шляхом зміни умов культивування *in vitro* або відбувається мимовільно *in vivo* за сприятливих для патогена обставин. Mattman (2001) визначила суттєві фактори для реверсії, найбільш розповсюдженими з яких є припинення впливу індукуючого агента, зміни в

живленні, концентрація популяцій, інокуляція лабораторним тваринам та інше. Особливий інтерес представляє реверсія, стимульована продуктами мікробного походження. Ratnam & Chandrasekhar (1976) повідомили про повернення фільтривних варіантів бактерій з мокротиння шляхом культивування з ад'ювантом Фрейнда. Цікаво відзначити, що повернення L-форм мікобактерій до нормальних бактерій туберкульозу виявляється більш складним та повільним, у порівнянні з іншими бактеріями.

Було встановлено, що бактерії володіють специфічною системою авторегуляції росту та розвитку, яка бере участь у контролі клітинної диференціації на рівні регуляції функціональної активності субклітинних компонентів і клітини в цілому (Шлеева, et al., 2010; Markova, 2012).

Lysenko et al. (2013) стверджують, що «стерильні» комерційні туберкуліни містять життєздатні туберкульозні бактерії з дефіцитною клітинною стінкою (CWD), які з часом можуть повернутись до класичного вірулентного збудника туберкульозу.

У центрифугатах з туберкулінів за фарбування мазків за методом Циль-Нільсена. Автори виявляли прозорі дрібні сфери та великі сфери з темно-синіми центрами та напівпрозорою периферією. Тривале культивування ізолятів з туберкулінів (1-3 місяці) на середовищах MусoCel DW або класичному Левенштейна-Йєнсена, призвело до появи у всіх випадках класичних кислотостійких туберкульозних паличок. ПЛР дослідження ізолятів підтвердило їх належність до *M. tuberculosis* і *M. bovis*.

Після дворазового пасажування ізоляту *M. bovis* через організм морських свинок, тварини залишались живими протягом двох місяців, але за розтину виявляли гранульоми в печінці діаметром 1-2 мм у половини тварин. Культури CWD-бактерій, виділені з туберкуліну, не відразу викликали туберкульозні ураження в морських свинок, але були здатні зберігатись в якості типового збудника туберкульозу (Fontes, 1910; Sentkowski et al., 2005).

Після введення туберкуліну в курячі ембріони та їх розтину на 9 добу істотних патологічних змін не було. Але коли рідина з кожного алантоїсного

мішка зараженого курячого ембріона була нанесена на середовище MусoCel DW зі стимулятором росту, відмічали ріст як CWD, так і класичних форм туберкульозних бактерій. Останнє свідчить про те, що за автоклавування «продуктів зростання» та лізису мікобактерій при виробництві туберкуліну залишаються терморезистентні CWD форми, здатні повернутись до життя. Про існування таких термостабільних фільтривних туберкульозних форм відомо вже деякий час (Fontes, 1910). Дійсно, незалежно від того, піддавались нагріванню чи ні, фільтривні форми мікобактерій туберкульозу спричинювали однакові ураження в лімфатичних вузлах (Hababou-Sala, 1928). Chandrasekhar & Ratnam (1992) показали, що такі туберкульозні CWD форми можуть легко продукувати типові захворювання за імунодефіциту (Ma, 1995; Lysenko et al., 2013).

Багато статей, оглядів (Gumpert & Taubeneck, 1983; Domingue & Woody, 1997; Zhang, 2004; Onwuamaegbu et al., 2005; Allan et al., 2009; Domingue, 2010; Beran et al., 2012) і кілька монографій (Prozorovski et al., 1981; Taylor-Robinson, 1983; Mattman, 2001), підтримують концепцію, що L-форми можуть бути індуковані *in vivo*, можуть зберігатись там протягом значного проміжку часу і можуть бути причиною латентних, хронічних і рецидивуючих інфекцій, а також захворювань невідомого інфекційно-алергічного або аутоімунного походження.

За даними Завгороднього та ін. (2014) в організмі хворих на туберкульоз тварин збудник *Mycobacterium bovis* може циркулювати у L-формі. Такі форми здатні реверсувати в бактеріальну (R) форму та викликають сенсibilізацію до туберкуліну, а за експериментального зараження спричинюють характерні для туберкульозу ураження.

З усіх бактерій, L-форми переважають і мають вирішальне значення для виживання *M. tuberculosis in vivo*, стверджують багато авторів (Berezovskii & Salobai, 1988; Dorozhkova et al., 1989, Khomenko et al., 1980). Вважається, що мікобактерії, які проходять трансформацію в L-форми, мають клінічне значення в частоті рецидивів і є прогностичним несприятливим показником.

Kochemasova et al. (1970, 1975) змогли ізолювати L-форми *M. tuberculosis* зі спинномозкової рідини, з різних органів хворих на туберкульоз, а також з сечі хворих на туберкульоз нирок протягом тривалого часу, поки тривала хіміотерапія (Berezovski & Golanov, 1981). L-варіанти *M. tuberculosis* спостерігались під час антибактеріальної терапії туберкульозного менінгіту. Особливо цікавими були доповіді різних авторів про виділення *Mycobacterium tuberculosis* L-форм з мокротиння і каверн хворих на туберкульоз легень (Takahashi, 1979; Tsybulkina, 1979; Zhu et al., 2000) виявляли форми *M. tuberculosis* з дефіцитною клітинною стінкою в біологічному матеріалі, зокрема мокротинні та крові, у хворих на легеневий туберкульоз.

Гіпотеза Cardona (2009) свідчить про те, що латентна туберкульозна інфекція обумовлена постійною ендегенною реінфекцією латентними бактеріями. Враховуючи цю гіпотезу, постійна «втеча» бактерій із гранульом є основним ендегенним джерелом бактерій. Макрофаги здатні підтримувати стресове середовище, що зберігає бактерії в нереплікуючому стані, але, з іншого боку, дозволяють їм втекти з гранульом, що робить їх більш стійкими до майбутніх стресових умов (Cardona, 2000, 2004, 2009; Cardona et al, 2003).

Cantwell (1982) також припускав, що некислотостійкі швидкорослі мікроорганізми, виявлені в шкірних лімфатичних вузлах і легеневій тканині у пацієнтів із саркоїдозом, були формами мікобактерій з дефіцитними клітинними стінками. Judge & Mattman (1982) культивували мікобактеріальні форми з дефектом клітинних стінок (переважно кокоподібні форми, великі L-форми та короткі палички) з крові хворих з саркоїдозом. Зразки від пацієнтів з саркоїдозом для виявлення мікобактеріальної ДНК були піддані ПЛР і у половини хворих на саркоїдоз були виявлені туберкульозні ДНК.

Мікобактерії з дефектною клітинною стінкою виділяли також з уражень шкіри та спинномозкової рідини пацієнтів хворих на саркоїдоз та ідентифікували як *M. a.paratuberculosis* або інший комплекс *M. avium-intracellulare* (El-Zaatarietal., 1996). Взаємозв'язок між формами з дефіцитною

клітинною стінкою *M. a. paratuberculosis* і хворобою Крона був відмічений деякими авторами, хоча цей етіологічний агент ще не був остаточно доведений (Hulten., 2000; Schwartz et al., 2000; Hulten et al., 2000, 2001; Sechi et al., 2001; Hermon-Taylor & Bull, 2002; Sechi et al., 2001; Markova, 2012).

У 2010 році Singh et al. стверджували, що туберкульозні захворювання з високим ступенем фільтрації туберкульозних бактерій можуть передаватись навіть через їжу, яку ми їмо, не дивлячись на існуючі протоколи стерилізації. Foddaï et al. (2010), в тому ж році, показали дані, які по суті підтвердили те ж саме для *M. avium subsp.* та паратуберкульозу, незважаючи на пастеризацію (Lysenko et al., 2013).

Шляхом інкубації типових кислотостійких мікобактерій туберкульозу в спеціальних стимуляторах росту та посіву на живильні середовища ВКГ і Мікофаст, Лисенко зі співавторами (2015) отримали змінені (CWD) некислотостійкі форми *Mycobacterium bovis* і BCG. Отримані CWD форми *M. bovis* і BCG мали таку ж морфологію, як і ізоляти з крові туберкулінопозитивних корів і ППД туберкуліну. Відносно рідко та в незначних кількостях, вони трансформувались в типові кислотостійкі палички.

З утворенням L-форм пов'язують і феномен дормантності – переходу мікобактерій в стан спокою у вигляді цисто- або спороподібних форм (в тому числі всередині макрофагів при незавершеному фагоцитозі), що дозволяє уникати взаємодії з імунною системою макроорганізму, але значно знижує потенціал до росту та ділення (або повністю виключає цю можливість). Одним із прикладів тривалого існування мікобактерій в дормантному вигляді на тлі зниженого імунного статусу є щеплення BCG у пацієнтів з ВІЛ-інфекцією, у яких навіть через багато років після вакцинації знаходять персистуючі мікобактерії саме того штаму, який використовувався у введеному препараті (Шлеева et al., 2010; Цинзерлинг & Агапов, 2017).

У своєму дослідженні Markova et al. (2008) вивчили зміни морфології бактерії BCG, втрату клітинної стінки і перетворення в L-форми під час

фагоцитозу перитонеальними макрофагами в морських свинок. Щоб дізнатися, як *M. bovis* BCG може зберігатися *in vivo* після внутрішньочеревного введення BCG морським свинкам, відбирали зразки перитонеальної рідини на першу, 14 і 45 добу.

Спостереження Markova et al. (2008) на пізніх етапах інфекції виявило утворення L-форм всередині макрофагів. Виявляли пари або групи клітин L-форм різного розміру та оптичної щільності. Розмір клітин L-форм варіював приблизно від 0,2 мкм до 30 мкм в діаметрі. При цьому відсоток L-форм, що утворилися на 14 добу, становив близько 15%, на 45 добу дослідники не виявляли жодних бактерій BCG з нормальною морфологією, тобто всі клітини перебували в L-формі. Також виявляли ознаки розмноження L-форм – брунькування, бінарний поділ і формування елементарних тілець, які розпізнавалися всередині материнських клітин.

Перетравлення L-форм у макрофагах не відбувалось, відповідно, повний фагоцитоз не спостерігався. Деякі L-форми, розташовані всередині макрофагів, були оточені мультимембраною, так само, з мембраною навколо, вони знаходились у позаклітинному просторі. Цикл вивільнення L-форм і поглинання новими фагоцитами на пізній стадії інфекції передбачає, що L-форми, ймовірно, використовують апоптотоподібний шлях як засіб повернення до позаклітинного середовища і для подальшого нового циклу поглинання макрофагами.

Дані Markova et al. (2008) показують, що бактерії BCG можуть конвертувати до форм із дефектною клітинною стінкою (L-форми) всередині макрофагів під час інфекції у морських свинок. Виділення культур L-форм із селезінки тварин на 45 добу інфекції свідчить про те, що форми з дефектною клітинною стінкою утворені *in vivo*, життєздатні. Морфологія клітин L-форм із цієї культури була подібною до L-форм, за якими спостерігали, при взаємодії з перитонеальними фагоцитами. Рядом авторів були представлені докази того, що дефектні варіанти клітинної стінки можуть утворюватися в макрофагах (Thacore & Willett, 1966; Michailova et al., 2000; Mattman, 2001).

Що стосується феномена конверсії L-форм, він розглядається як явище адаптації, за впливу різних пошкоджуючих факторів, однак коли L-форми перебували в фагоцитарних вакуолях, деякі з них мали змогу розмножуватись (брунькування, бінарний розподіл і формування елементарних тіл) (Markova et al., 2008).

Дані експериментальних інфекцій з L-формами продемонстрували їх атипові взаємодії з фагоцитарними клітинами, неповний і неефективний фагоцитоз. Можна припустити, що тривале неспецифічне подразнення імунної системи L-формами може стати причиною побічних ефектів алергічного або аутоімунного походження (Mihailova et al., 1993; Markova et al., 1997; Mihailova et al., 2000; Mihailova et al., 2007; Markova et al., 2012).

Дослідження Markova et al. (2012) демонструє успішну ізоляцію культур L-форм з крові болгар, які раніше були вакциновані VCG, але не мали в анамнезі контакту з туберкульозом. Характеристики росту культур, ізольованих з крові 141 людини, однозначно продемонстрували відповідність їх до бактеріальних L-форм. Електронна мікроскопія виявила морфологію та специфічні характеристики популяції бактеріальних L-форм (елементи з дефіцитною поліморфною клітинною стінкою зі зміненою формою та розміром). Вдалось генетично довести, що ці L-форми мають мікобактеріальне походження. Оскільки досліджені люди були вакциновані VCG, автори припускають, що ідентифіковані мікобактеріальні L-форми можуть бути отримані шляхом збереження живої вакцини VCG.

Слід зазначити, що культури L-форм були однаково виділені від здорових людей (добровольців) без будь-якої додаткової клінічної історії з лікуванням антибіотиками та від людей з неінфекційними проблемами зі здоров'ям (онкологічні, аутоімунні хвороби та трансплантації), які лікувались кортикостероїдами, цитостатичними препаратами та антибіотиками (Markova et al., 2015).

1.6. Ферментативна активність мікобактерій

Атипові мікобактерії не відрізняються від збудника туберкульозу за морфологією та тинкторіальними властивостями, але суттєво різняться за культуральними, біохімічними та біологічними (вірулентними) ознаками (Овдиенко et al., 2002; Кассіч, 2004, 2013). Для полегшення однозначної ідентифікації виду оцінюють відмінності в біохімічних і молекулярних характеристиках серед декількох членів комплексу *Mycobacterium tuberculosis*, які не є *M. tuberculosis* (Niemann et al., 1999).

Мікобактерії ідентифікують, спираючись на їх фенотипові особливості: швидкість росту, морфологію колоній, пігментоутворення та біохімічні властивості. У лабораторній практиці виникає необхідність диференціювати *Mycobacterium tuberculosis* і *Mycobacterium bovis*, що входять до основних представників мікобактерій туберкульозного комплексу. Для цього рекомендовано застосовувати ніациновий тест, тест на редукцію нітратів і тест на здатність рости на середовищі з 5 мкг/мл ТСН (Thiophene-2-carboxylic acidhydrazide), а також ряд допоміжних тестів, у тому числі таких, як встановлення наявності пероксидазної та каталазної активності (Дорожкова et al., 2000; Kondratjuk & Sybirna, 2008).

У роботах деяких авторів наведені схеми видової диференціації мікобактерій за біохімічними властивостями (каталазна, пероксидазна, дегідрогеназна активність, наявність редукції нітратів, гідроліз ТВІН-80). Так, за даними Кассіча (2013), *M. tuberculosis* характеризується негативною каталазною активністю та редукцією нітратів і нестабільною здатністю до гідролізу ТВІН-80; *M. bovis* не володіє каталазною активністю та здатністю до редукції нітратів і гідролізу ТВІН-80. У роботі Tkachenko et al. (2007) зазначено, що реакція редукції нітратів позитивна у людського виду мікобактерій та деяких атипових (*M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*) і негативна у *M. bovis*, *M. avium*, *M. marinum*. У дослідженнях Torikko et al. (1997) показано, що *M. avium*, легко відрізнити від інших видів мікобактерій за негативним результатом тесту ТВІН-80, що було додатково підтверджено

за допомогою використання комерційних генетичних зондів. Досліди Sosnytsky (2018) також підтверджують не здатність *M. avium* гідролізувати ТВІН-80, а також засвідчують відсутність ферментативної активності каталази в цього виду мікобактерій. За даними Завгороднього та ін. (2012) *M. paratuberculosis* теж гідролізує ТВІН-80, але не мали низьку каталазну активність. Згідно даних Дяченка зі спіавт. (2009) *M. bovis* штам *Valle* та *M. tuberculosis* штам *Dt/st* синтезують фермент каталазу помірної активності (+ +). У роботі Яворської та Сибірної (2009) також стверджується, що *M. tuberculosis* та *M. bovis* володіють каталазною та пероксидазною активністю. У дослідженнях Kondratjuk & Sybirna (2008) у Волинській області було виділено 14 штамів збудника *Mycobacterium tuberculosis complex* від хворих на позалегеневі форми туберкульозу різної локалізації. Виділені бактерії в усіх випадках володіли нітратредукуючими властивостями, каталазною та пероксидазною активностями. У роботі Tkachenko et al. (2007) оцінювалась біохімічна активність *M. bovis* та його дисоціативних форм та висвітлено, що патогенний *M. bovis* володіє слабкою біохімічною активністю, а саме відсутністю каталази, пероксидази, нітратредуктази та слабкою дегідрогеназною активністю (знебарвлює метиленову синьку протягом 6–24 год), тоді як дисоціативні форми, навпаки, мають виражену каталазну, пероксидазну та дегідрогеназну активність (знебарвлення метиленової синьки протягом 15–30 хвилин).

Таким чином, виходячи з досить неоднозначних даних, висвітлених в опрацьованих літературних джерелах, можна зробити висновок, що внаслідок варіацій фенотипових характеристик мікобактерій, однозначна ідентифікація їх підтипів біохімічними методами не представляється можливою, адже, вони значно ускладнюються мінливістю біохімічних характеристик мікобактерій (Niemann et al., 1999). Розрізнявальна сила біохімічних тестів поодинці обмежена, оскільки різні види можуть проявляти подібні або ідентичні результати в одних і тих самих реакціях (Wayne & Sramek, 1992). Для ідентифікації на рівні виду, дослідниками (Torkko et al.,

1997) рекомендується додатково проводити аналіз жирних кислот, доповнених виявленням швидкості росту бактерій.

Такі твердження є доречними, оскільки, з досліджень Ткаченка (2017) відомо що мікобактерії володіють високим ступенем мінливості, а зміна біологічних властивостей *M. bovis* (культуральних, тинкторіальних, морфології) може супроводжуватись й іншими змінами, зокрема метаболізму, з яким тісно пов'язані синтетазні системи (ферменти зокрема). Результати, отримані в дослідженнях Tkachenko et al. (2007) свідчать про те, що за дисоціації *M. bovis* отримані форми володіють вищою ферментативною активністю, ніж мікроорганізми материнського штаму, та стверджують про набуття ними ферментативних властивостей, які непритаманні патогенним мікобактеріям, а характерні атипичним.

Це підтверджують дослідження й інших авторів, в результаті яких було встановлено, що біохімічні властивості мікобактерій можуть частково змінюватись у певних стадіях розвитку. Біохімічні властивості паличкоподібних і змінених форм мікобактерій не завжди співпадають. З цього виходить, що використання стандартних біохімічних тестів не дає можливості ідентифікувати вид мікобактерій, вирощених на живильних середовищах.

Зміна морфології клітини веде до зміни біохімічних властивостей. Так, в досліджах Лысенко et al. (2011) показано, що мікобактерії, які відносяться до збудника бичачого виду, вирощені на середовищі Гельберга дали, на відміну від туберкульозу людського виду, суворо негативний результату в реакції відновлення нітратів, тоді як, молоді мікобактерії бичачого виду, вирощені на середовищі ВКГ, в цій же реакції – позитивний результат. Здатність відновлювати нітрати отримали всі досліджувані молоді культури, отримані при вирощуванні на середовищі ВКГ.

Крім того, проявлення дегідрогеназної активності у *M. bovis* через 30 хвилин після постановки реакції, дозволяє припустити, що на певному етапі

розвитку мікобактерії туберкульозу проходять стадії сапрофітизації, або схожих із сапрофітами структурних елементів і біохімічних властивостей.

Не дивлячись на це, знання про наявність тих чи інших ферментних систем у мікобактерій дозволяє краще зрозуміти такі особливості мікобактерій, як вірулентність і стійкість до антимікобактеріальних препаратів (Яворська & Сибірна, 2009).

Так, у роботі Tkachenko et al. (2007) зазначено, що вірулентні мікобактерії туберкульозу володіють слабкою дегідрогеназною активністю і знебарвлюють метиленову синьку протягом 3–12 год. Непатогенні мікобактерії володіють активністю і навіть знебарвлюють метиленову синьку за 30 хв.

Досить важливим і цікавим, на сьогодні, є дослідження окисно-відновних ферментів у мікобактерій туберкульозу. В окисно-відновних процесах антиоксидантного захисту мікробної клітини активну участь беруть такі ферменти, як каталаза і пероксидаза. Каталаза-пероксидаза *Mycobacterium tuberculosis* є багатофункціональним гемозалежним ферментом, який активує основний протитуберкульозний препарат, ізоніазид (Bertrand et al., 2004; Kondratjuk & Sybirna, 2008; Яворська & Сибірна, 2009).

Мікобактерії туберкульозу мають відносно високу стійкість перекису водню та органічними пероксидами. Резистентність може опосередковуватись мікобактеріальною каталазою-пероксидазою (KatG) і, можливо, алкілом гідропероксидредуктазою (AhpC). У дослідженнях Manca et al. (1998) для визначення взаємозв'язку між чутливістю до H_2O_2 , каталазною та пероксидазною активністю та швидкістю росту бактерій, їх вимірювали як внутрішньоклітинно (в моноцитах людини), так і в живильному середовищі. Автори досліджували один лабораторний штам, два клінічних ізоляти та три рекомбінантних штами *M. tuberculosis* з різними рівнями KatG і AhpC. Результати досліджень вказаних авторів свідчать про те, що штами, що не виявляли експресію KatG або активність каталази, були відносно чутливі (від 43 до 67%) до знищення екзогенним H_2O_2 . Проте коли

була присутня навіть мінімальна активність каталази (0,56-6,2 од/мг) виживало значно більше бактерій (85%).

Ізоніазид, який широко використовується в якості антимікобактеріального агента, вимагає активації KatG перед здійсненням летального ефекту. Стійкість до ізоніазиду в більшості клінічних ізолятів є результатом точкових мутацій в KatG. Резистентні до ізоніазиду мутанти, виділені *in vitro*, часто втрачають KatG повністю.

Ці дослідження дали суперечливі результати. Деякі дослідники не виявили кореляції між втратою активності KatG і вірулентністю *M. tuberculosis* у мишей і морських свинок і відсутність кореляції між рівнями KatG та сприйнятливістю до перекису водню. Проте інші знайшли явну кореляцію між статусом KatG і *M. tuberculosis* і вірулентністю.

Ізоніазид-стійкі мутантні штами *M. tuberculosis*, які не мають виявленої активності KatG, отримують компенсаторну мутацію, що призводить до регуляції експресії AhpC. Було висловлено припущення, що цей білок надає захист проти пошкодження H₂O₂ навіть при відсутності адекватної активності каталази та пероксидази, що сприяє виживанню мікроорганізму в середовищі фагоцита.

Результати Манса et al. (1998) дають зрозуміти кореляцію між пероксидазною активністю штамів *M. tuberculosis* і здатністю бактерій (будь то лабораторні рекомбінантні або клінічні ізоляти) виживати внутрішньоклітинно в людських моноцитах *in vitro*. Ці висновки підтверджуються спостереженням, що у пацієнтів з генетичною нездатністю генерувати пероксиди, після імунізації BCG часто відбуваються, дисеміновані інфекції *M. bovis* BCG, рідко фатальні.

Результати Li et al. (1998) підтверджують те, що KatG сприяє здатності *M. tuberculosis* рости і виживати в інфікованих тканинах господаря (в селезінці), що було підтверджено в лабораторних експериментах на мишах і морських свинках.

Яворською та Сибірною (2009) проводились дослідження каталазної та пероксидазної *M. fortuitum*, *M. avium* і *M. kansasii* на різні доби вирощування. Автори відзначали залежність збільшення ступеня активності каталази з часом культивування (вона збільшувалася). Ступінь пероксидазної активності також змінювався залежно від часу культивування. Очевидно, мікобактерії здатні швидко змінювати метаболічні процеси та пристосуватись до умов оточуючого середовища.

Результати досліджень Дяченка зі співавт. (2009) показали, що адаптовані до антибактеріальних препаратів в умовах експерименту *in vitro* штами мікобактерій змінюють деякі фенотипові властивості. Важливо відмітити, що каталаза штаму мікобактерій *Valle* збудника туберкульозу великої рогатої худоби, адаптованого до стрептоміцину, виявила термостабільність за 68 °С, що не було властивим для досліджуваної вихідної культури. Отримані експериментальні дані показали, що основні три види збудника туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*) та умовно-патогенних (*Mycobacterium fortuitum*) бактерій володіють надзвичайною пластичністю адаптаційних можливостей, що, в свою чергу, що може ускладнити бактеріологічну діагностику туберкульозу сільськогосподарських тварин.

Kondratjuk & Sybirna (2008) встановлено, що мікобактерії туберкульозу стійкі до препаратів ГІНК (тубазиду, фтівазиду та інших), втрачають здатність синтезувати ендогенну каталазу і розщеплювати перекис водню. Тому активність цих ферментів різко знижена або відсутня. При визначенні пероксидазної активності колонії ледь забарвлюються, на відміну від нетуберкульозних мікобактерій, незалежно від стійкості до ГІНК. У *Mycobacterium tipus humanus* і *M. bovis*, чутливих до ГІНК, виявляється активність обох ферментів паралельно. При цьому у чутливих культур іде активне виділення пухирців кисню, що зумовлене діяльністю каталази, а також забарвлення колоній у темно-коричневий колір, що обумовлене діяльністю пероксидази. Поява коричневого кольору пояснюється переходом

пірогалолу в пурпурогалин за присутності перекису водню під впливом пероксидази (Дорожкова et al., 2000).

Kondratjuk & Sybirna (2008) було досліджено 14 штамів збудника від хворих на позалегеневі форми туберкульозу та встановлено, що збудники мають ряд особливостей. Так, за туберкульозу центральної нервової системи тест на редукцію нітратів був слабковираженим, тоді як за туберкульозу периферичних лімфатичних вузлів, туберкульозу кісток і суглобів, туберкульозу сечостатевого органів штами мікобактерій туберкульозу посилено редукували нітрати та спостерігалась яскраво виражена реакція.

При цьому дослідженні культури при позалегеневих формах туберкульозу мали слабо виражену каталазну та пероксидазну активність, хоча після дослідження їх чутливості було встановлено стійкість до препарату ізоніазиду. Це свідчить про те, що не завжди культури мікобактерій туберкульозу, стійкі до препаратів ГІНК, втрачають здатність синтезувати ендогенну каталазу і розщеплювати пероксид водню.

Мікобактерії туберкульозу можуть використовувати різні живильні речовини, включаючи нітрати в якості джерела азоту. Асиміляція нітрату забезпечується редукцією нітрату через нітрит до амонію, який потім включається в метаболічні шляхи.

Мікобактерії туберкульозу мають обмежений доступ до поживних речовин в інфікованих тканинах (Munoz-Elias & McKinney, 2006). Однак, нітрат присутній у інфікованій тканині, оскільки він спонтанно утворюється з оксиду азоту (NO), продукту синтезу оксиду азоту (Bogdan, 2001; Malm et al., 2009). Асиміляція азоту в мікобактеріальному метаболізмі є істотною для виживання *M. tuberculosis in vitro* та *in vivo*. Багаторічні дослідження роду *Mycobacterium* показали, що *M. tuberculosis* має здатність редукувати нітрати до нітритів, тоді як *M. bovis* і *M. bovis* BCG не мають помітної активності нітратредуктази (Fritz, 2002). Про засвоєння нітрату *M. tuberculosis* було повідомлено більше 50 років тому (DeTurk & Bernheim, 1958; Hedgcock &

Costello, 1962; Virtanen, 1960). Однак його молекулярні основи залишаються невідомими.

Асиміляція нітратів вимагає узгодженої дії нітрату і нітритредуктази з подальшим включенням амонію в клітинний метаболізм через глутамінсинтетазу та глутаматсинтазу.

У дослідженні Malm et al. (2009) описуються молекулярні механізми, необхідні для асиміляційного зниження нітратів і нітритів, і його транскрипційний контроль у *M. tuberculosis*. Показано, що нітрат накопичується в хронічно інфікованих тканинах, головним чином як продукт спонтанної деградації оксиду азоту і тому може бути доступним для *M. tuberculosis* в якості живильної речовини в організмі господаря. Він може бути використаний як альтернативний субстрат у випадках обмеження азоту (Fritz, 2002).

Деякі дослідники (Philippot & Højberg, 1999; Fritz, 2002) припускають, що *M. bovis* (досліджувався вакцинний штам BCG) використовує нітрати як ключове джерело живлення, підтримуючи бактеріальний метаболізм у легенях, печінці та нирках через відновлення нітрату до нітриту. Автори стверджують, що нітрат, може забезпечити енергію для бактеріального метаболізму навіть у анаеробному середовищі.

Аналіз на наявність ферменту нітратредуктази широко використовують в лабораторній практиці в якості альтернативного методу виявлення резистентності до протитуберкульозних препаратів, таких як ізоніазид, рифампіцин, етамбутол, офлоксацин, стрептоміцин та деякі інші. Цей метод є досить недорогим і швидким. Заснований він на здатності *M. tuberculosis* редукувати нітрат до нітриту, який легко виявити за допомогою конкретних реагентів (Martin et al., 2005; Lemus, 2006).

Даний метод був протестований багатьма дослідниками (Angeby et al., 2005; Martin et al., 2005; Montoro et al., 2005; Lemus, 2006; Fonseca et al., 2012;) на клінічних ізолятах *Mycobacterium tuberculosis*. Результати показали високу чутливість і специфічність методу.

1.7. Висновок з огляду літератури

З аналізу даних наукової літератури можна зробити висновки, що ряд питань, що стосується біологічних властивостей мікобактерій, залишається остаточно не з'ясованими. З літературних джерел стає ясно, що мікобактерії володіють неймовірною пластичністю, можуть, за потреби, змінювати свої біологічні властивості, щоб пристосуватись до умов середовища існування. Це, в свою чергу, веде до зміни ферментативної активності, культуральних і тинкторіальних властивостей (втрата кислотостійкості) та появи різноманітних морфологічних форм. Все, що перераховано вище, значним чином знижує інформативність класичних методів виявлення мікобактерій, таких як мікроскопія, дослідження культуральних властивостей, типізація завдяки біохімічним тестам. Через це діагностика туберкульозу стає вкрай складною.

Не дивлячись на багаторічне вивчення вченими даного мікроорганізму, захворюваність на туберкульоз в світі є досить високою, тому подальші дослідження мікобактерій залишаються актуальними. Особливо цікавим є існування фільтривних форм мікобактерій, біологічні властивості яких є не достатньо вивченими.

Виходячи з даних, висвітлених у науковій літературі, можна зробити висновки, що мікобактерії здатні змінювати свої біологічні властивості, пристосовуючись до умов існування. Тому вчені стверджують, що мікобактерії туберкульозу можуть існувати в різних морфологічних формах (паличко-, коко- і ниткоподібні, фільтривні ультрадрібні, L-форми). Змінюватись може також і кислотостійкість. Існує думка, що атипових форм мікобактерії набувають внаслідок впливу на них різних фізичних факторів (гіпоксія, температура, рН, осмотичний тиск), також мають значення вік культур, забезпеченість поживними речовинами.

Важливі характеристики бактеріальних L-форм – це плеоморфізм і втрата жорсткості через відсутність шару мерініна. Виникнення дефіциту клітинної стінки у мікобактерій за природних умов – один з можливих

шляхів, завдяки яким туберкульозні палички можуть виживати, розмножуватись і зберігатись протягом тривалого періоду прихованого туберкульозу в організмі з ризиком реактивації захворювання, у випадку повернення до класичних туберкульозних бактерій за зміни імунного статусу господаря.

З літературних джерел відомо, що в життєвому циклі L-форм відіграють важливу роль фільтривні тіла, як найменший репродуктивний елемент Domingue (2010). Він також стверджує, що ці крихітні L-тіла – основний елемент бактеріальної персистенції, адже вони можуть містити бактеріальний геном і володіти мінімальною метаболічною здатністю, достатньою для початку розмноження. Ткаченко (2017) стверджує, що фільтривні елементарні тільца можуть культивуватися одночасно з іншими формами, зберігаючи можливість реверсії в некислотостійкі форми збудника туберкульозу. Тому, настільки важливим стає питання вивчення властивостей L-форм, причин їх виникнення і механізмів, які сприяють виживанню за несприятливих умов та можливому поверненню до класичних форм.

У розділі 1 використано матеріали з відповідним посиланням на такі наукові джерела зі списку літератури: [1, 3, 5-15, 17, 18, 20, 23- 28, 31, 32, 35, 37, 39, 40, 42-44, 46-48, 50-58, 60-65, 67-71, 74, 75, 77, 82, 84-88, 92-110, 112, 114, 115, 118, 119, 121-123, 125-127, 131, 133-138, 141, 142, 146-150, 152, 153, 155, 157-159, 162-167, 170-172, 175, 176, 178, 180-192, 195, 196, 198, 201- 205, 207, 208, 210, 213- 215, 218-223, 235-237].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Місце проведення досліджень

Дослідження проводили на базі навчальної лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпровського державного аграрно-економічного університету впродовж 2017–2021 рр. Дослідження з растрової електронної мікроскопії проводили на базі лабораторії електронної мікроскопії Сумського національного аграрного університету.

2.2. Матеріали досліджень

2.2.1. Дослідні культури мікобактерій

У роботі використано музейний вірулентний швидкорослий штам *M. bovis*, виділений з біологічного матеріалу реагуючої на туберкулін (ППД) для ссавців корови (Ткаченко et al. 2009 Ткаченко та ін. 2017; Ткаченко, 2004), пасажований через щільне живильне яєчне середовище з різним рН (6,5; 6,7; 7,1). Вихідні культури зберігали на середовищі Мордовського без пересівів у пробірках закритих гумовими корками за температури $3,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ протягом 9–12 років. А також дисоціативні варіанти *M. bovis* 117-а, б, в і 118 пересіву двісті сорокової генерації. Дисоціанти були отримані внаслідок відщеплення авірулентних клітин від вірулентного епізоотичного штаму *M. bovis*, що відбулось після 116-ти разового пересівання завису вірулентної культури на щільне живильне середовище та зберігання культур 117 пасажу впродовж 20 місяців за умови низьких плюсових температур (Глебенюк, 2007; Ткаченко, 2017; Кулішенко et al., 2015; Ткаченко et al., 2010). Контролем слугував патогенний вірулентний лабораторний штам *M. bovis*. Схема постановки досліду представлена на рис. 2.1.

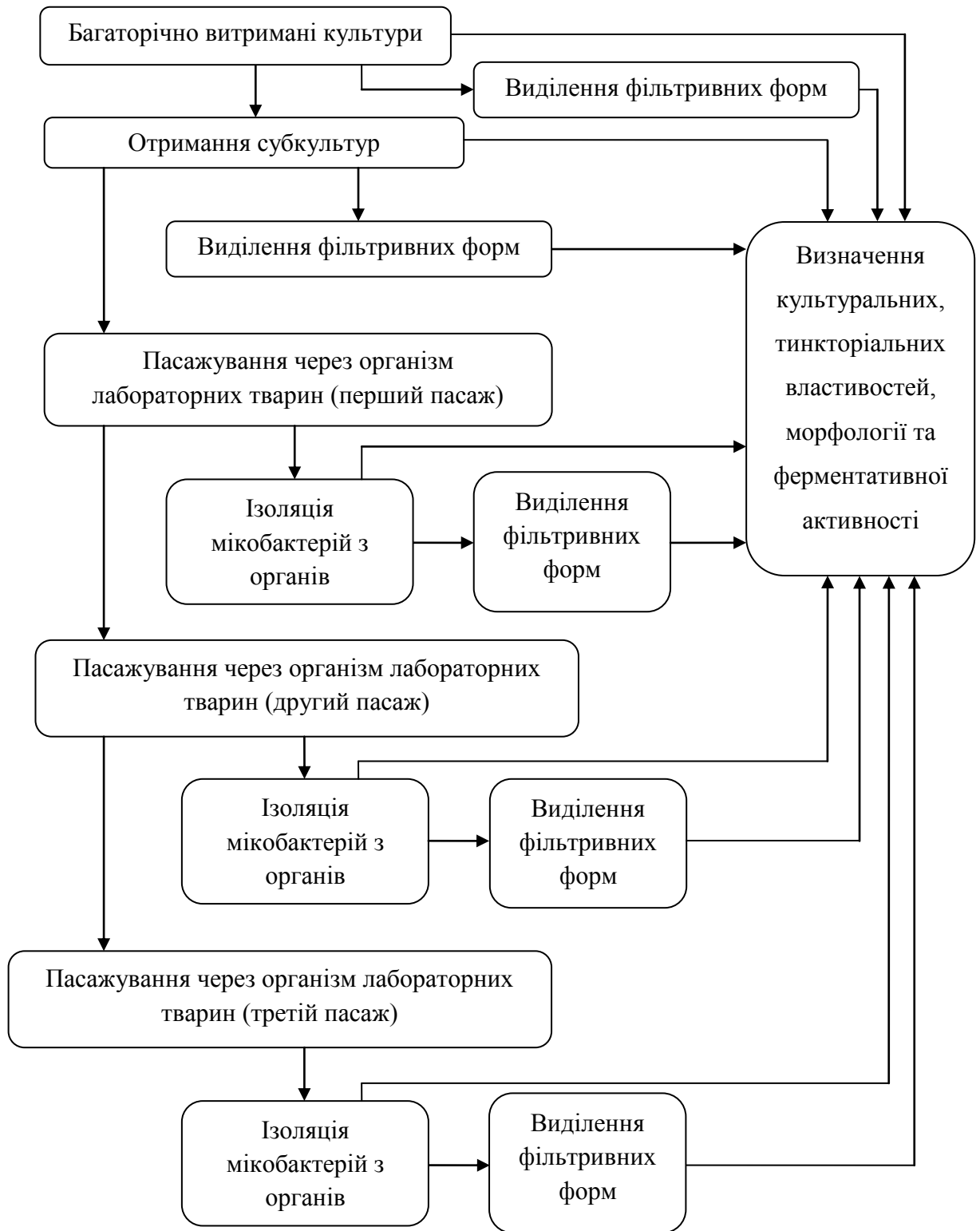


Рис. 2.1. Загальна схема проведення досліджень

2.2.2. Живильні середовища

Для ізоляції та культивування мікроорганізмів використовували наступні живильні середовища: щільне ячне живильне середовище Мордовського (Нове), яке містило в своєму складі калій фосфорнокислий

однозаміщений, натр лимоннокислий, магній сірчаноокислий, глікокол, гліцерин, жовток курячих яєць; м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), середовище Мордовського з додаванням натрусаліцилату ($C_7H_5NaO_3$) в концентрації 0,1 г на 1,0 см³ середовища (Мордовской, 1988; Ткаченко et al., 2010; Журило, 2010).

2.3. Методи досліджень

2.3.1. Бактеріологічні дослідження

З метою вивчення тинкторіальних властивостей та морфології з багаторічно витриманих культур *M. bovis* готували мазки та проводили мікроскопію користуючись мікроскопом OLYMPUS серії XS з цифровим мікроскопічним комплексом Cyberlink You Cam (за збільшення $\times 1600$ під імерсією).

Проводили пересів культур на відповідне живильне середовище Мордовського з рН 6,7 для культивування за $37,0 \pm 0,5$ °C та $3,0 \pm 0,5$ °C. Одержували субкультури, з'ясовували швидкість росту колоній, пігментоутворення, характеризували зовнішній вигляд. Проводили мікроскопію, досліджуючи тинкторіальні властивості, морфологію мікобактерій.

Окремі культури в пробірках, закритих гумовими корками, після культивування в термостаті за $37,0 \pm 0,5$ °C зберігали за $3,0 \pm 0,5$ °C без пересіву на підтримуюче живильне середовище протягом 9-12 років. Проте проводився зовнішній огляд пробірок досліджуваних культур. Через 9-12 років приготували мазки з досліджуваних культур, провели мікроскопію вивчаючи тинкторіальні властивості та морфологію, пересів культур на відповідне живильне середовище з рН 6,7 (для визначення рН середовища використовували лабораторний рН/mV&Temperature метр ADWA AD1030) для культивування за $37,0 \pm 0,5$ °C та $3,0 \pm 0,5$ °C. Одержували субкультури, з'ясовували швидкість росту колоній, пігментоутворення, характеризували

зовнішній вигляд культури. В кожній культурі визначали наступні показники:

- інтенсивність росту: слабкий, помірний, пишний;
- характер росту: росинчастий, наліт, димка, окремі колонії, їх скупчення, суцільний ріст;
- характеристику колоній: кількість (поодинокі, численні), величину (дрібні, середні, великі), форму (правильна, неправильна, з нерівними, зубчастими краями), характер поверхні (гладенька – S-форма, шорстка – R-форма, зморшкувата, складчаста, суха, волога), консистенцію (крихка, в'язка, слизова, волокниста), пігментоутворення, прозорість (прозорі, напівпрозорі, матові), емульгованість у фізіологічному розчині (задовільна, слабка, відсутня) (Ткаченко et al., 2010)

Проводили мікроскопію, досліджуючи тинкторіальні властивості, морфологію мікобактерій. Морфологію мікобактерій багаторічно збережених культур оцінювали за наступними показниками (Ткаченко et al., 2010):

- довжина: довгі ($\geq 2,5$ мкм), короткі (≤ 1 мкм), кокоподібні;
- товщина: товсті ($\geq 0,5$ мкм), тонкі ($\leq 0,3$ мкм);
- форма: прямі, вигнуті, гіллясті, ниткоподібні, розташовані під кутом;
- кінці: заокруглені, загострені, із здуттям;
- зернистість: виражена, відсутня;
- розташування: поодинокі, невеликі скупчення, купки.

Вірулентні властивості дослідних штамів з'ясовували за допомогою біологічної проби на морських свинках за методикою Манченко (1994). Лабораторних тварин заражали зависом із дослідних культур і суспензією з біоматеріалу (1 мг/см^3 ізотонічного розчину). З метою підвищення ефективності біологічної проби використали по вісім морських свинок для зараження кожним варіантом із варіантів субкультур, контролем слугували свинки, заражені патогенним материнським штамом *M. bovis*. Для зараження суспензією з органів, отриманих від морських свинок, обробку патматеріалу проводили за методикою Алікаєвої, тварин заражали в дозі $1,0 \text{ г/см}^3$

(Ткаченко et al., 2010). Завис та суспензію тваринам вводили парентерально з внутрішньої сторони стегна.

При утриманні дослідних тварин дотримувались основних принципів біоетики, а саме – недопущення спраги, недоїдання, голоду, дискомфорту при утриманні та стресу при проведенні експерименту. Впродовж експерименту (90 діб): тварин зважували, досліджували утворення виразки в ділянці інокуляції мікобактерій, прояв алергічної реакції на ППД-туберкулін для ссавців в дозі 25 МО в 0,1 см³ ізотонічного розчину. Туберкулінізацію проводили через 30, 60 і 90 діб після зараження тварин, а облік реакції через 24-48 год. після введення туберкуліну (Галатюк & Радзиховський, 2013; Кассіч et al., 2017; Kassish et al., 2019).

На 90 добу досліду проводили евтаназію тварин ефірним наркозом, що забезпечує швидке безболісне настання смерті відповідно до Європейської Конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.) (додаток Б). Проводили патолого-анатомічні дослідження. Біологічний матеріал, потриманий після біопроби, досліджували бактеріологічно з культивуванням за $3,0 \pm 0,5$ і $37,0 \pm 0,5$ °C (Ильина, 1980; Ткаченко et al., 2010; Журило, 2010).

Всі роботи з бактеріальними культурами та біоматеріалом проводили в спеціалізованій лабораторії, дотримуючись загальноприйнятих у бактеріологічній практиці технічних прийомів, що унеможливають контакту шкіри рук зі заразним матеріалом і потрапляння його в навколишнє середовище. Після завершення робіт з біологічним матеріалом і культурами, робоче місце дезінфікували 5% розчином хлораміну. Весь контамінований мікроорганізмами посуд, інструменти, біологічний матеріал і культури знешкоджували шляхом автоклавування за 1,5 атм. протягом 90 хвилин (Ткаченко et al., 2010).

2.3.2. Фільтривні методи

Для фільтрації дослідних культур використовували фільтри мембранні дискові типу МФАС –Б1 та МФАС – Б2, діаметром 25 мм, матеріал мембран

– мікропористий плівковий, приготований на основі суміші ацетатів целюлози, з розміром пор 0,1 та 0,05 мкм і загальною пористістю 80-85 %, виробник ЗАТ НТЦ «Владіпор» (м. Володимир, Російська Федерація); ТУ 6-55-221-879-88 + змін. 1,2. Схема проведення досліду з фільтрації представлена на рис. 2.2.



Рис. 2.2. Схема постановки досліду з фільтрації

Технічні особливості фільтрів: гофруються у водному аерозолі, витримують стерилізацію автоклавування та γ – опроміненням, нетоксичні.

Робочі характеристики фільтрів:

- продуктивність по дистильованій воді при $P = 0,05$ МПа мл/(см²хв):
0,50 – 0,99 – для МФАС – Б – 1 та 1,00–2,99 – МФАС – Б – 2;

- Мінімальний тиск проходження бульбашки через змочену водою мембрану – 0,4 МПа (для обох фільтрів).

Фільтри, фіксували у фільтротримачі для мембранних фільтрів моделі DN25PWT1-1, матеріал фільтротримача – тефлон, виробник AWL Tech (Чехія) (рис. 2.3.).

Стерилізація фільтрів проводилась автоклавуванням (1,5 атм. протягом 30 хвилин), а стерилізація фільтротримача – кип'ятінням в стерилізаторі (30 хвилин від моменту закипання).

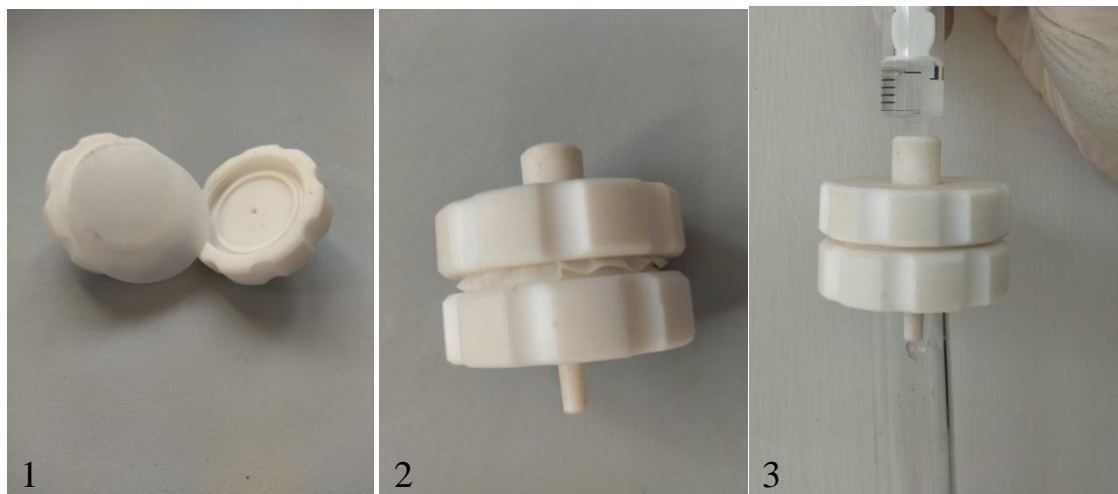


Рис. 2.3. Підготовка і проведення фільтрування завису мікобактерій: 1 – фільтр із фільтротримачем у розібраному стані; 2 – фільтр зафіксований у фільтротримачі; 3 – процес фільтрування завису

Підготовлений завис бактеріальних клітин у фізіологічному розчині (концентрацією мікробних клітин 1 мг/см³) набирали у стерильний шприц. Шприц під'єднували до фільтротримача. Фільтротримач з під'єднаним

шприцом встановлювали над отвором стерильної пробірки. Проводили фільтрацію завису. При натисканні на поршень шприця, завис під створеним тиском проходив через бактеріальний фільтр і з вихідного отвору фільтротримача в пробірку витікала профільтрована рідина (фільтрат) (рис. 2.3.).

Фільтрати Ф-0,1 (фільтр МФАС – Б1 0,1 мкм) та Ф-0,05 (фільтр МФАС – Б2 0,05 мкм), кожного дослідного зразка висівали на яєчне живильне середовище Мордовського (Нове) з рН 6,7 і культивували за температур $3,0 \pm 0,5$ та $37,0 \pm 0,5$ °С. Контролем слугували пробірки з живильним середовищем засіяні зависом мікобактерій, який не підлягав фільтрації.

2.3.3. Метод растрової електронної мікроскопії

Дослідження *Mycobacterium bovis* методом растрової електронної мікроскопії проводили на електронному мікроскопі «РЕМ-106-и». Відбір проб для електронної мікроскопії проводили шляхом приготування суспензії мікробних клітин у дистильованій воді. Для цього одну бактеріологічну петлю бактеріальної маси розчиняли у 2 мл дистильованої води попередньо наливої в центрифужні пробірки. Для ущільнення клітин мікроорганізмів пробірки центрифугували 15 хв. за режиму 3000 об/хв. По закінченню зайву надосадову рідину видаляли піпеткою.

Фіксацію матеріалу проводили фіксатором на основі глютаральдегіду, який вносили до пробірок, що містили 0,1 мл відцентрифугованого осаду бактерій дослідних зразків. Пробірки струшували для рівномірного суспензування осаду та залишали за температури танучого льоду на 30 хв., струшуючи через 15 хв. По закінченню експозиції проби центрифугували за 1500 об/хв протягом 15 хв., піпеткою видаляли фіксатор, залишаючи осад. Фіксацію матеріалу проводили двічі.

З метою видалення зайвої води з бактеріальних клітин, дослідні зразки зневоднювали методом обробки спиртами різної концентрації (30–100%), які

додавали до проб у співвідношенні 1:10. Зі збільшенням концентрації спирту, яким обробляється зразок, збільшували і час експозиції.

Після закінчення зневоднення проб у абсолютному спирті та центрифугування дослідні зразки наносили зверху на вуглецеву стрічку та висушували на повітрі.

Для надання електропровідності проводили напилення дослідних зразків сріблом у ВУП-5 при вакуумі порядку 10⁻⁵ мм рт. ст. Підготовлені зразки вміщували в електронний мікроскоп та проводили мікроскопію (Carr, 1971; Дж, et al., 1984; Куо, 2007; Karcz, 2009).

2.3.4. Біохімічні методи

Серед біохімічних властивостей визначали: каталазну, пероксидазну та дегідрогеназну активність, редукцію нітратів, реакцію гідролізу ТВІН-80.

Визначення каталазної та пероксидазної активності проводили одночасно (модифікована методика Богена). З цією метою до культур додавали свіжовиготовлену суміш 2% розчину перекису водню та 0,5% розчину пірогалолу А, які змішували безпосередньо перед постановкою реакції. Облік проводили через 15 та 30 хвилин (каталаза) та через 1,5-2 годин (пероксидаза). Активність каталази оцінювали візуально за бурхливістю перебігу реакції та виділення кількості бульбашок кисню в першу хвилину: (+++) – значне виділення бульбашок; (++) – помірне; (+) – поодинокі бульбашки; (–) – відсутнє виділення бульбашок. Пероксидазну активність визначали за утворенням коричневого пігменту в колоніях мікобактерій завдяки перетворенню пірогалолу під дією ферменту пероксидази в пурпурогалин в присутності перекису водню. Облік реакції проводили в плюсах: (+++) – темно-коричневий колір колоній; (++) – коричневий; (+) – блідо-коричневий колір; (–) – колір не змінюється (Ткаченко, 2017).

Дегідрогеназну активність, яка основана на виявленні окисно-відновного ферменту дегідрогенази і продуктів метаболізму, визначали в пробірках

Епіндорфа (Н. Bloch, 1950). Для цього $4,0 \text{ см}^3$ завису мікробних клітин у фосфатному буфері рН 7,4-7,6 перемішували з 1 см^3 1% розчину глюкози і $0,1 \text{ см}^3$ 0,02% розчину метиленового синього. На отриманий вміст у пробірці нашаровували стерильне вазелінове масло. Пробірки ставили в термостат за температури $38,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ з подальшим контролем часу знебарвлення барвника. Облік реакції оцінювали через 15–30 хв. та 24 год. Контролем слугували пробірки із зависом збудника і метиленовим синім без глюкози (рис. 2.4.) (Ткаченко, 2017).

Редукцію нітратів, проводили за методами М. Tsurumiga (1961) в модифікації Т.Б. Ільїної зі співавт. (1982). Для цього на торсіонних вагах відмірювали 10,0 мг вологої біологічної маси із культури мікобактерій і вносили в бактеріологічну пробірку, що вміщувала $1,0 \text{ см}^3$ 0,067 М-фосфатного буфера (рН 7,1) з 0,1% розчином нітрату натру. Після суспендування культури інкубували за температури $37,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 20–22 год. Утворення нітрату перевіряли додаванням у пробірку двох крапель 2% розчину пара-диметиламінобензальдегіду на 1%-му розчині соляної кислоти. За позитивної реакції виникає жовте забарвлення, за негативної – колір розчину не змінюється (рис. 2.5.) (Ткаченко, 2017).

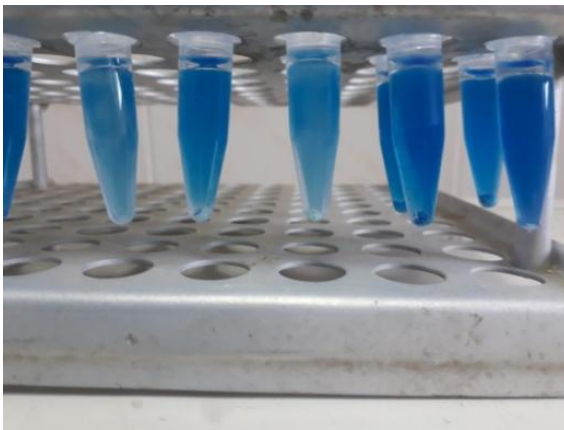


Рис. 2.4. Проведення дегідрогеназної проби

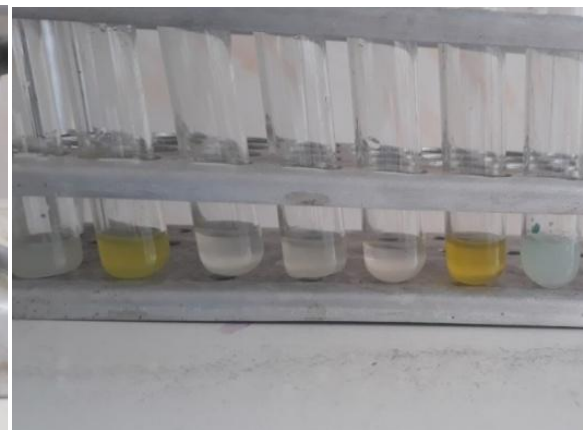


Рис. 2.5. Проведення нітратредуктазної проби

Реакцію гідролізу ТВІН-80 визначали за модифікованою методикою Вайна. Під час дослідження використовували 1/15 М фосфатний буфер (рН 7)

– 100,0 см³, ТВІН-80 – 0,5 см³, основний нейтральний червоний, 0,1 % – 2,0 см³. Перед початком досліду усі три реагенти змішували, розливали по 4,0 см³ у пробірки й автоклаували за 120 °С 15 хвилин. Протягом доби перевіряли на стерильність у термостаті. Для визначення здатності бактерій гідролізу вати ТВІН-80 три бактеріологічні петлі кожної з досліджуваних культур емульгували в пробірках із приготованим субстратом (ТВІН-80 із нейтральним червоним). Пробірки поміщали в термостат. Реакцію перевіряли через 4 години, на 5 та 10 добу. Тест вважався позитивним, якщо рожево-червоне забарвлення з'явилося до 10 доби, негативним, якщо забарвлення не з'явилося. Контролем слугувала пробірка із середовищем без реактивів (Ткаченко, 2017).

Культури мікроорганізмів досліджували на здатність рости на звичайних живильних середовищах (м'ясо-пептонний бульйон і м'ясо-пептонний агар) та ячному середовищі з додаванням натру саліциловокислого. Для цього до середовища Мордовського перед його згортанням додавали натру саліцилат з розрахунку 100 000,0 мкг на 1,0 см³ середовища. Контролем слугували пробірки з посівами на живильне середовище Мордовського (Ильина, 1980; (Ткаченко, 2017; Ткаченко et al. 2010; Журило, 2010).

Біохімічні тести усіх варіантів культур проводили в п'ятиразових повторях.

2.3.5. Статистичні методи

Статистична обробка даних проводилась з використанням редактору Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA, 2010). Для вимірів довжини клітин на фото електронної мікроскопії користувались програмою Digimizer 4.3.0.

У розділі 2 використано матеріали з відповідним посиланням на такі наукові джерела зі списку літератури: [3, 13, 30, 76, 78, 90, 193, 194, 200, 206, 209, 212, 216, 217].

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Морфологія, тинкторіальні та культуральні властивості мікобактерій дослідних культур

3.1.1. Морфологія, тинкторіальні та культуральні властивості мікобактерій багаторічно витриманих культур

На початку наших досліджень встановити вплив температури $3,0 \pm 0,5$ °C та часу зберігання на швидкість росту та зовнішній вигляд культур, кислотостійкість мікобактерій та їх морфологічні форми. Для цього досліді використали культури, які зберігались у музеї кафедри протягом 9-12 років. Були відібрані 15 культур, які зберігались на середовищі з різним значенням рН: 6,5 – пасажі 54, 115, 135, 148, 171, 172, 173, 190, 193; 6,7 – пасажі 126, 180; 7,1 – пасажі 141, 142, 143, 174 (рис. 3.1).

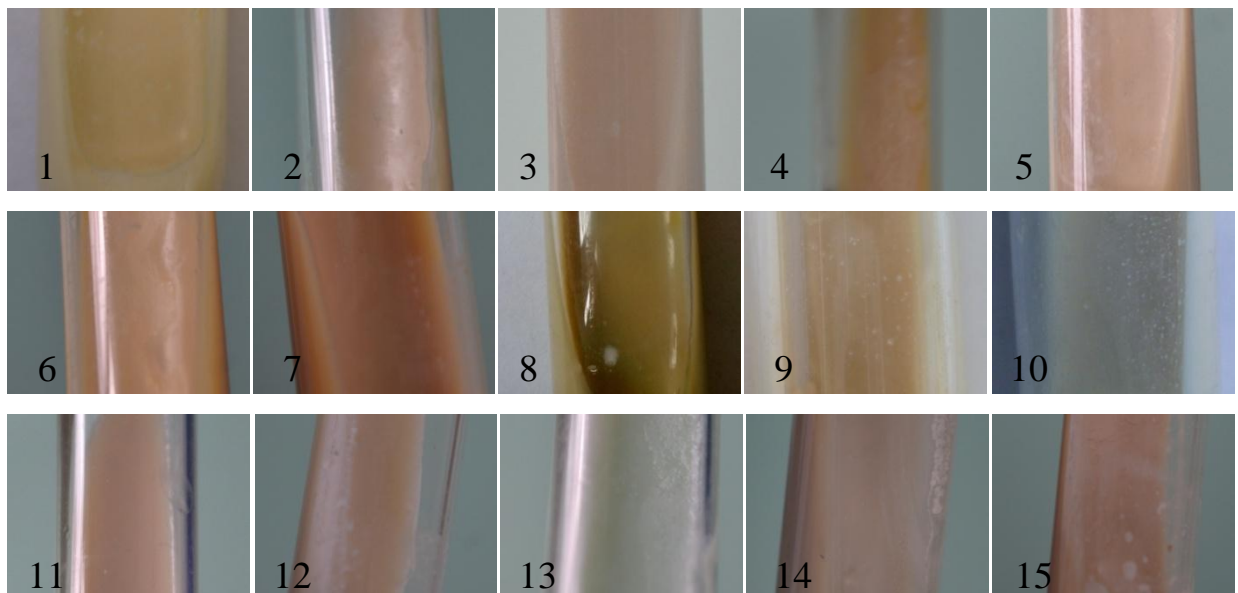


Рис. 3.1. Культуральні властивості вихідних культур: рН 6,5 пасажі: 1 – 54; 2 – 115; 3 – 135; 4 – 148; 5 – 171; 6 – 172; 7 – 173; 8 – 190; 9 – 193; рН 6,7 пасажі: 10 – 126; 11 – 180; рН 7,1 пасажі: 12 – 141; 13 – 142; 14 – 143; 15 – 174

При огляді пробірок з культурами зростання сторонньої мікрофлори не виявлено. Інтенсивність росту вихідних культур була переважно слабка. Більшість культур характеризувалась ростом у вигляді нальоту по лінії посіву, хоча в деяких виявляли ріст окремих колоній. Поверхня в 10-ти культур була шорсткою (R), а у 5-ти – гладенькою (S). Культури мали білий колір або колір слонової кістки (рис. 3.1., табл. 3.1, табл. 3.2, дод. Г).

Таблиця 3.1

Культуральні властивості культур, які багаторічно зберігались на середовищі з рН 6,7

Показник	№ пасажу		
	126	180	Контроль (патогенний штам <i>M. bovis</i>)
Тривалість зберігання (років)	12	9	0,5
Інтенсивність росту	Помірний	Слабкий	Слабкий
Характер росту	Росинчастий	Окремі колонії	Окремі колонії
Кількість колоній	Чисельні	Поодинокі	Поодинокі
Величина колоні	Дрібні	Дрібні	Дрібні
Форма колоні	Неправильна	Правильна	Неправильна
Поверхня колоні	R	S	R
Консистенція	Крихка	Слизова	Крихка
Пігмент (колір)	Слонової кістки	Непігментовані	Слонової кістки
Прозорість	Матові	Прозорі	Матові
Емульгованість у фізрозчині	Слабка	Задовільна	Відсутня

Інтенсивність росту в культур, які зберігались на середовищі з рН 6,5 9 і 12 років (пасажі 126 і 180) була слабка та помірна; характер росту –

росинчастий і у вигляді окремих колоній; кількість – чисельні та поодинокі, за величиною дрібні, правильної та неправильної форми, з гладенькою (S) та шорсткою (R) поверхнею, крихкої та слизової консистенції, мали колір слон рої кістки та непігментовані, матові та прозорі; емульгованість у фізрозчині – слабка та задовільна. Контрольний патогенний штам характеризувався ростом слабкої інтенсивності у вигляді окремих поодиноких дрібних колоній з шорсткою поверхнею (R), крихкі за консистенцією, кольору слонової кістки, непрозорі (матові), не емульгувались у фізіологічному розчині.

Таблиця 3.2

Культуральні властивості культур, які багаторічно зберігались на середовищі з рН 7,1

Показник	№ пасажу			
	141	142	143	174
Тривалість зберігання (років)	9	9	9	10
Інтенсивність росту	Пишний	Пишний	Слабкий	Пишний
Характер росту	Наліт	Наліт	Окремі колонії	Наліт
Кількість колоній	Чисельні	Чисельні	Поодинокі	Чисельні
Величина колоній	Дрібні	Дрібні	Дрібні	Дрібні
Форма колоній	Неправильна	Неправильна	Неправильна	Неправильна
Поверхня колоній	R	R	S	R
Консистенція	В'язка	В'язка	Слизова	Слизова
Пігмент (колір)	Білі	Білі	Білі	Слонової кістки
Прозорість	Напівпрозорі	Напівпрозорі	Напівпрозорі	Напівпрозорі
Емульгованість у фізрозчині	Задовільна	Задовільна	Задовільна	Задовільна

Якщо порівняти інтенсивність росту культур на живильних середовищах з різним значенням рН (табл. 3.1, 3.2, дод. Г) – в культур, які зберігались на середовищі з рН близьким до нейтрального (рН 7,1), була найвища інтенсивність росту. В культур, які зберігались на середовищі з кислим рН (рН 6,5) реєстрували в однаковій мірі пишній та слабкий ріст культур. В культур, які зберігались на середовищі з рН 6,7 інтенсивність росту була найнижчою. Ріст в культур що вирости на рН 6,5 і 7,1 був переважно у вигляді нальоту по лінії посіву, а за рН 6,7 – спостерігали окремі колонії росин часті колонії. Величина колоній, сформованих на середовищах з рН 6,7 і 7,1 була дрібною, а на середовищі з більш кислим значенням рН – 6,5 інколи реєструвались колонії середньої величини. Форма колоній за рН 7,1 була неправильною, тоді як за кислих рН (рН 6,7 і 6,5) – форма в більшості випадків була правильною. Консистенція колоній за рН 7,1 була в'язка та слизова, а за кисліших значень рН (6,7 і 6,5) окрім в'язкої та слизової, реєструвалась крихка консистенція. За значення рН 6,5 більшість культур мала колір слонової кістки, за рН 7,1 колір колоній переважно був білим, за рН 6,7 окрім кольору слонової кістки реєстрували непігментовані колонії. Прозорість в колоній вирощених на середовищах із різним значенням рН була неоднаковою. В культур вирощених за найкислішого рН – 6,5 колонії в більшості були матовими, в культур за рН 6,7 в однаковій мірі реєстрували як матові, так і напівпрозорі колонії, а за рН 7,1 – колонії всіх культур були напівпрозорими. Емульгованість у фізіологічному розчині майже у всіх культур була задовільна.

Після детального вивчення культураліних властивостей провели мікроскопію, щоб дослідити морфологію та тинкторіальні властивості (кислотостійкість) багаторічно збережених культур. Отримані дані порівняли з фото світової мікроскопії цих культур, зробленими раніше (матеріали архіву дослідів кафедри, 2008 рік) (дод. Д).

Особливості морфології та тинкторіальних властивостей культур, які зберігали на живильному середовищі з рН 6,7 представлені в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Тинкторіальні властивості та морфологія мікобактерій культур, які багаторічно зберігались на середовищі з рН 6,7

Показник	№ пасажу	
	126	180
Тинкторіальні властивості	Кислотостійкі та некислотостійкі	Некислотостійкі
Морфологія	Палички, зерна	Палички, зерна
Довжина	Короткі	Короткі
Товщина	Тонкі	Товсті
Форма	Прямі	Прямі
Кінці	Заокруглені	Заокруглені
Зернистість	Виражена	Виражена
Розташування	Скупченнями	Скупченнями

Порівнюючи тинкторіальні властивості багаторічно збережених культур на середовищі з різним значенням рН (дод Е, табл. 3.3, табл. 3.4) можна відмітити, що за рН близького до нейтрального (рН 7,1) мікобактерії переважно були не кислотостійкими, тоді як за кислих рН (6,7 і 6,5) реєструвались одночасно кислото- та некислотостійкі варіанти. Морфологічно за рН 6,7 культури були представлені паличкоподібними клітинами та зернами, за рН 7,1 окрім вище згаданих реєструвались також ниткоподібні форми, а за рН 6,5 окрім перерахованих форм виявляли поодинокі овальні та округлі L-форми. В культурі 115 пасажу паличкоподібні форми були взагалі відсутні. Довжина паличкоподібних форм за рН 6,7 була короткою (≤ 1 мкм), за рН 7,1 палички були переважно довгі ($\geq 2,5$ мкм), за рН 6,5 в культурах реєструвались як довгі, так і короткі палички в однаковій мірі. Товщина паличок в культурах мікобактерій коливалась від тонкої ($\leq 0,3$ мкм) до товстої ($\geq 0,5$ мкм), залежності цих коливань від рН середовищ виявлено не було. За формою паличкоподібні варіанти в усіх культурах були

прямі та мали заокруглені кінці, розташовувались скупченнями та поодинокі.

Таблиця 3.4

Тинкторіальні властивості та морфологія мікобактерій культур, які багаторічно зберігались на середовищі з рН7,1

Показник	№ пасажу			
	141	142	143	174
Тинкто- ріальні властивості	Некислото- стійкі	Некислото- стійкі	Некислото- стійкі	Кислото- та некислотостійкі
Морфологія	Палички, зерна, ниткоподібні	Палички, зерна	Палички, зерна, ниткоподібні	Палички, зерна
Довжина	Довгі	Довгі	Довгі	Короткі
Товщина	Товсті	Товсті	Тонкі	Тонкі
Форма	Прямі	Прямі	Прямі	Прямі
Кінці	Заокруглені	Заокруглені	Заокруглені	Заокруглені
Зернистість	Виражена	Виражена	Виражена	Виражена
Розташу- вання	Скупченнями, поодинокі	Скупченнями, поодинокі	Скупченнями, поодинокі	Скупченнями

У 2008 році культури були представлені в основному кислотостійкими паличками, ниткоподібними формами, овалами, зернами. Поряд з цим у деяких культурах фіксували поодинокі некислотостійкі морфологічні форми збудника, зокрема, палички, зерна та овали. Дослідженнями на початку досліду встановлено й велике різноманіття морфологічних форм *M. bovis* (палички, ниткоподібні форми, зерна, овали). У багатьох культурах виявили значну кількість зерен, в основному некислотостійких, і поодинокі L-форми. Змінилися й тинкторіальні властивості – з'явилося багато некислотостійких

елементів в окремих культурах. Мікобактерії деяких культур взагалі втратили кислотостійкість.

3.1.2. Морфологія, тинкторіальні та культуральні властивості мікобактерій отриманих субкультур

Щоб оцінити життєздатність клітин мікобактерій після 9-12 років зберігання дослідні культури було пересіяно на свіже живильне середовище. Із 15 пересіяних культур ріст спостерігали в 10-ти, з яких 6 культур дали ріст за обох температурних режимів культивування, одна культура тільки за $37,0 \pm 0,5$ °C та три культури – за $3,0 \pm 0,5$ °C. Серед культур, які зберігали на середовищі з рН 6,5, за пересіву ріст відмічали в 77,8 % (з 9 вихідних культур субкультури утворили 7), а з рН 6,7 та 7,1 – у 50,0 % (субкультури за рН 6,7 утворились в однієї культури з двох, за рН 7,1 – в двох з чотирьох вихідних). Більшість субкультур сильно відрізнялись від вихідних характером росту, поверхнею та кольором культури. Ріст субкультур утворених за температури культивування $37,0 \pm 0,5$ °C представлений на рис. 3.2.

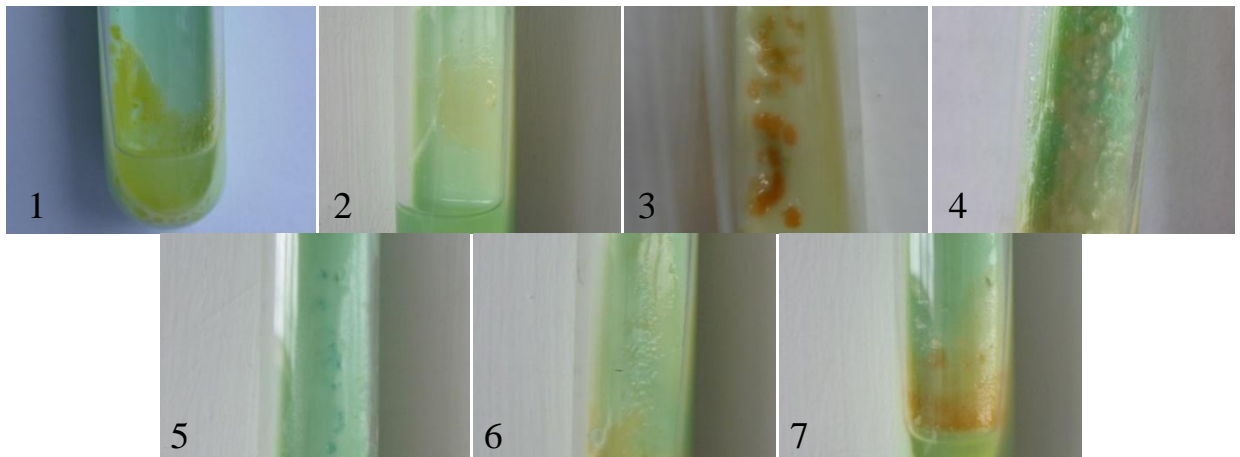


Рис. 3.2. Культуральні властивості субкультур за температури $37,0 \pm 0,5$ °C, ріст на щільному яєчному живильному середовищі Мордовського, пасажі: 1 – 54; 2 – 115; 3 – 126; 4 – 143; 5 – 148; 6 – 171; 7 – 180

За температури культивування $37,0 \pm 0,5$ °C ріст відмічали на четверту добу (чотири культури), п'яту (дві культури) та 20 (одна культура).

Інтенсивність росту в усіх культурах за $37,0\pm 0,5$ °C була пишна та помірна У чотирьох культур відзначали ріст у вигляді маслянистого нальоту жовтого та помаранчевого кольорів, три культури формували синьо-зелені, помаранчеві та кольору слонової кістки колонії, які розташовувалися скупченнями. Поверхня на майже в усіх культур, окрім однієї (пасаж 148) була S-форми. Через 1,5 місяця в 143 пасажу поверхня змінилася з S-форми на R-форму, а за три місяці з'явився синьо-зелений пігмент (рис. 3.2.).

За $3,0\pm 0,5$ °C швидкість росту була дещо повільнішою: на 6 добу (4 культури), на 47 (три культури) та по одній культурі на 55 та 85 доби. Інтенсивність росту також була помітно слабшою, ніж за $37,0\pm 0,5$ °C: у 6 з 9 культур спостерігався дуже слабкий ріст у вигляді окремих колоній-росинок неправильної форми з шорсткою поверхнею кольору слонової кістки та тільки в трьох культур відмічали пишний ріст у вигляді слизуватого тягучого нальоту синьо-зеленого та жовтого кольорів з гладенькою поверхнею (рис. 3.3.).

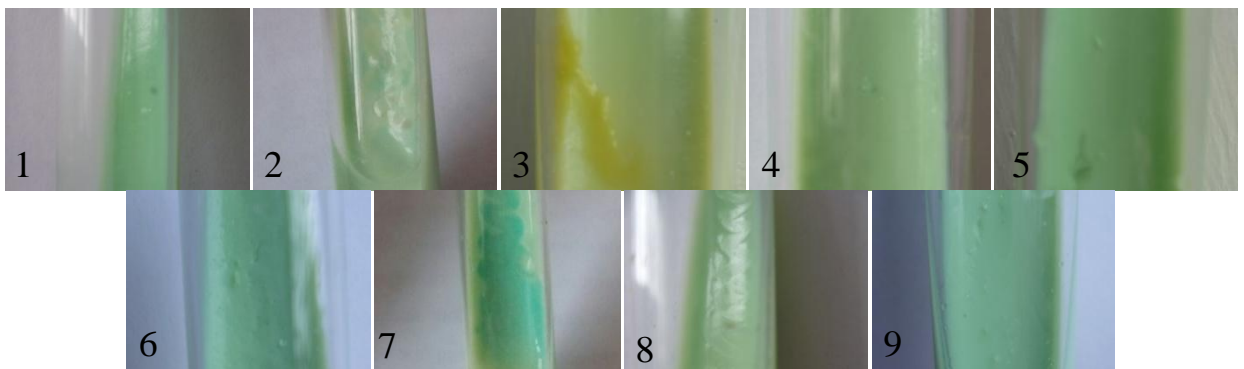


Рис. 3.3. Культуральні властивості субкультур за температури $3,0\pm 0,5$ °C, пасажі: 1 – 54; 2 – 115; 3 – 135; 4 – 142; 5 – 143; 6 – 148; 7 – 171; 8 – 172; 9 – 180

Проаналізувавши отримані дані, виявили відсутність залежності швидкості росту від кількості пасажів вихідних культур та рН середовища, на якому їх зберігали. За подальшого пересіву субкультур на нові пробірки з живильним середовищем, для накопичення біомаси для проведення подальших досліджень (біологічна проба на морських свинках, дослідження

ферментативної активності та здатності проходити через бактеріальні фільтри) пишній ріст спостерігався не у всіх виділених субкультур. Субкультури пасажів 126, 142, 148, 172, 54 ($3,0\pm 0,5$ °C), 143 ($3,0\pm 0,5$ °C), 180 ($3,0\pm 0,5$ °C) нам довелось виключити з подальших дослідів через неможливість накопичення біомаси з причини дуже слабкої інтенсивності росту або взагалі його відсутності.

Провівши мікроскопію мазків з молодих культур у першу, четверту, 6 і 30 добу росту та порівнявши результати між собою було встановлено, що всі субкультури, які культивувалися за $37,0\pm 0,5$ °C повністю втратили кислотостійкість. Проте в субкультурі 54 пасажу через 30 днів від початку росту почали з'являтися сині товсті ниткоподібні форми з червоною зернистістю, те ж саме спостерігали і в субкультурі 171 пасажу на 6 добу, але вже при наступній мікроскопії на 30 добу росту така зернистість зникла (дод. Ж). За температури культивування $3,0\pm 0,5$ °C всі культури повністю втратили кислотостійкість. Проте у субкультурах 54 та 142 пасажів відмічали кислотостійкі зерна, а 172 – велику кількість кислотостійких паличок, ідентичних тим, які були у вихідній культурі. Зазначимо, що це саме ті субкультури, які за температури $3,0\pm 0,5$ °C утворювали колонії у досить віддалені строки – на 47-му добу (дод. З).

Морфологія субкультур була досить різноманітною. За мікроскопії виявляли: короткі та довгі, прямі та зігнуті, тонкі та товсті палички із заокругленими кінцями, кокоподібні та ниткоподібні форми, зерна, L-форми. За $37,0\pm 0,5$ °C в більшості культур виявляли багато L-форм, з часом в багатьох спостерігали зменшення їх кількості до повного зникнення в деяких субкультурах. Шляхом культивування за $3,0\pm 0,5$ °C L-форми виявляли в меншій кількості субкультур, з часом вони зникали швидше, ніж за температури культивування $37,0\pm 0,5$ °C. Ниткоподібні форми відмічали в більшості культур (у 4 з 7) за $37,0\pm 0,5$ °C, за $3,0\pm 0,5$ °C таких форм у мазках не спостерігали взагалі. Натомість за $3,0\pm 0,5$ °C часто виявляли некислотостійкі зерна.

Отже, якщо отримані нами в досліді дані зіставити з результатами досліджень морфології та тинкторіальних властивостей попередніх років, то можна простежити тенденцію до появи в культурах некіслотостійких елементів і L-форм. Мікобактерії усіх досліджуваних культур змінили морфологію та тинкторіальні властивості.

Мікобактерії, що зберігались на живильному середовищі протягом 9-12 років, проявляють життєздатність і за пересіву на свіже живильне середовище здатні утворювати субкультури. Така здатність вища в культур, які зберігались на середовищі з рН 6,5, на 27,8 % (серед культур, які зберігались на середовищі з рН 6,7 і 7,1 нові субкультури за пересіву утворились у 50,0 % випадків, а серед культур, які зберігались на середовищі з рН 6,5 – у 77,8 %).

Виходячи з отриманих результатів, можна засвідчити, що:

- культуральні властивості швидкорослого штаму *M. bovis*, який тривало зберігали в умовах низьких плюсових температур ($3,0 \pm 0,5$ °C), змінювалися. Здатність мікобактерій субкультур даного штаму зростати за температури $3,0 \pm 0,5$ °C раніше не спостерігали. Отримані субкультури відрізнялися від вихідних. Серед змін відзначали: утворення жовтого, помаранчевого та синьо-зеленого пігментів, зміну характеру поверхні переважно на гладеньку (S-форма);

- із часом зберігання культур фіксується тенденція до втрати мікобактеріями кислотостійкості;

- морфологія *M. bovis* згодом змінювалася. Вихідні культури були представлені різноманітними морфологічними формами: паличками, зернами, ниткоподібними та L-формами. За зберігання у вихідних культурах підвищилася кількість L-форм та зерен. У першій генерації субкультури, культивовані за $37,0 \pm 0,5$ °C, відрізнялись наявністю ниткоподібних форм, тоді як за $3,0 \pm 0,5$ °C, навпаки, у культурах ниткоподібних форм не виявляли, натомість вони частіше були представлені зернами та овалами; L-форми

частіше виявляли в субкультурах, культивованих за $37,0 \pm 0,5$ °C, їх кількість із часом знижувалась.

Такі результати можуть свідчити про те, що за роки зберігання мікобактерії швидкорослого штаму певним чином адаптувались до умов низьких плюсових температур. Присутня значна варіація в отриманих результатах може бути обумовлена тим, що мікобактерії, культур які досліджували, маючи різну кількість пасажів через середовище з відмінним значенням рН, володіють різним ступенем біологічної активності.

3.1.3. Електронна мікроскопія мікобактерій дослідних культур

Одним з етапів дослідження було вивчення морфології мікобактерій дослідних культур за допомогою методу скануючої електронної мікроскопії. З цією метою було досліджено зразки пасажу 115 (багаторічно витримана культура та молода субкультура), контрольного патогенного материнського штаму *M. bovis*.

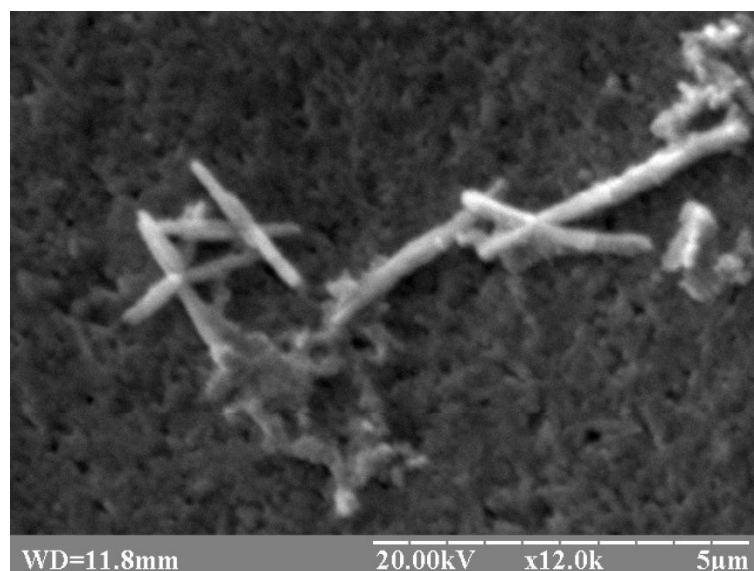


Рис. 3.4. Контрольний вірулентний штам *M. bovis* (РЕМ)

Бактерії контрольного штаму мали форму прямих тонких паличок із заокругленими кінцями, які розташовувались скупченнями. Довжина

паличок, в середньому, складала $1,44 \pm 0,35$ мкм, а ширина $0,25 \pm 0,05$ мкм (рис. 3.4).

Бактеріальні клітини багаторічно збереженої культури були представлені різними морфологічними варіантами, що підтверджується результатами світлової мікроскопії, представленими в попередньому підрозділі. Паличкоподібні морфологічні варіанти мали вигляд опуклої, майже овальної палички із заокругленими кінцями та дуже нерівною поверхнею. Розміри паличкоподібних форм: довжина – $2,08 \pm 0,65$ мкм, ширина – $0,95 \pm 0,28$ мкм. Овальні та сферичні морфоформи також мали дуже деформовану поверхню та були зібрані в конгломерати з клітин різного розміру (рис. 3.5.).

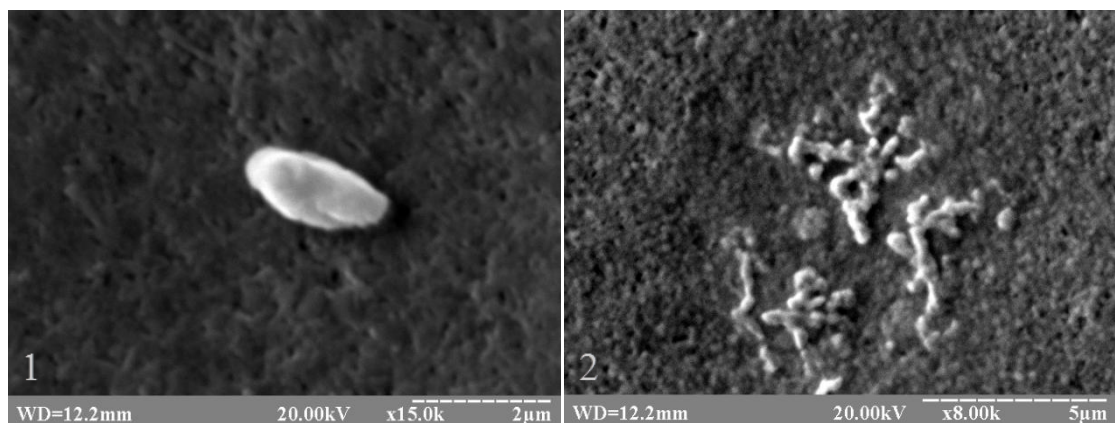


Рис 3.5. Багаторічно витримана культура, пасаж 115 (РЕМ):

1 – паличкоподібна клітина; 2 – скупчення сферичних і овалоподібних клітин

Бактерії молодшої субкультури представлені також різними морфологічними формами: паличкоподібними, овалами, зернами. Паличкоподібні варіанти молодих мікобактерій були, порівняно з багаторічно витриманими, коротшими та вже не такими опуклими. Їх розміри: довжина – $1,46 \pm 0,04$ мкм, ширина – $0,58 \pm 0,07$ мкм. Рельєфність поверхні як паличкоподібних, так і сферичних морфологічних форм помітно зменшилась (рис. 3.6).

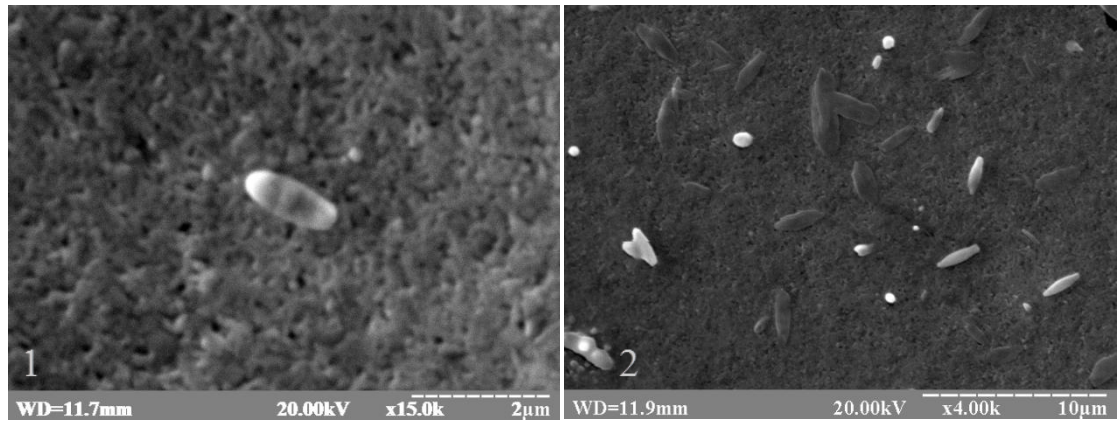


Рис. 3.6. Молода 2-тижнева субкультура, пасаж 115 (РЕМ):

1 – паличкоподібна клітина; 2 – сферичні, паличкоподібні та овальні клітини

Отже, за результатами електронної мікроскопії бачимо, що морфологія мікобактерій 115 пасажу має відмінності від контрольного патогенного штаму *M. bovis*. Серед морфологічних форм 115 пасажу зустрічаються паличкоподібні, овальні, сферичні варіанти та зерна (елементарні тільця), в той час, як бактерії контрольного штаму мають форму паличок. Якщо порівняти між собою розміри паличкоподібних форм бактерій культур представлених в даному підрозділі – можна відзначити, що найбільшими розмірами (і довжини, і ширини) володіють мікобактерії багаторічно збереженої культури. Паличкоподібні варіанти мікобактерій молодій субкультури 115 пасажу за довжиною дуже наближені до контрольного штаму, але ширина їх значно вища ніж в останнього.

Результати досліджень наведені в цьому підрозділі опубліковані у працях: [169, 211]

3.2. Визначення ступеня вірулентності мікобактерій дослідних культур

Біологічна проба на морських свинках проводилась трьома пасажами. Першій групі дослідних тварин (перший пасаж) вводили завис мікобактерій субкультур пасажів 54, 115 (отримана за $3,0 \pm 0,5$ °C), 115 (отримана за

37,0±0,5 °C), 171 (отримана за 3,0±0,5 °C), 171 (отримана за 37,0±0,5 °C), 143, 180, 135, а також, в якості контролю, завис музейного вірулентного штаму *M. bovis*.

Зараження морських свинок мікобактеріями 8 субкультур, які досліджувались, не супроводжувалось сенсibiliзацією макроорганізму щодо ППД-туберкуліну для ссавців, утворенням виразок в місці введення завису мікобактерій та зниженням маси тіла. По закінченню біопроби (90 діб), після евтаназії та розтину, в жодній дослідній тварини не виявлено патологоанатомічних змін характерних для туберкульозу.

Морські свинки, заражені контрольним патогенним штамом *M. bovis*, реагували на алерген на 30 та 60 добу досліду. Відмічено зниження маси тіла. У місці введення завису мікобактерій у всіх тварин контрольної групи утворювались виразки (рис. 3.7.) на 27–31 добу.



Рис. 3.7. Виразка в ділянці введення завису мікобактерій патогенного штаму

Загибель чотирьох свинок відмічена на 67-75 добу, інших було евтанізовано. В обох свинок відмічено патолого-анатомічні зміни, характерні для туберкульозу: збільшення селезінки та пахвинних лімфатичних вузлів, ураження легень (рис. 3.8., 3.9.).



Рис. 3.8.Туберкульозні осередки в легенях за експериментального ТБ



Рис. 3. 9.Гіпертрофія селезінки за експериментального ТБ

Бактеріологічним дослідженням біологічного матеріалу від кожної окремо дослідної морської свинки ізольовано вісім культур мікобактерій: на четверту добу три культури за $3,0 \pm 0,5$ °C (пасажі 115, 135, 171) та п'ять культур за $37,0 \pm 0,5$ °C (пасажі 54, 115, 143, 171, 180). Морфологічно мікобактерії виділених культур під імерсійною системою характеризувались некислотостійкими паличками та зернами.

По закінченню першої біопроби, отриманою суспензією з органів морських свинок, заражали наступну групу лабораторних тварин (другий пасаж). У дослідних тварин не відмічалось алергічних реакцій на ППД-туберкулін для ссавців, утворення виразок в ділянці введення та характерних для туберкульозу змін. Проте бактеріологічними дослідженнями біологічного матеріалу ізольовано чотири культури за $37,0 \pm 0,5$ °C: на 6 добу (пасажі 54, 180) і на 10 добу (пасажі 171, 143). Під імерсією мазків з культур виявляли некислотостійкі палички та зерна.

Серед свинок, заражених суспензією контрольного вірулентного штаму *M. bovis*, яку отримали після попереднього пасажу через лабораторних тварин, відмічалось зниження маси тіла. Чотири свинки загинули на 60-68

добу, інших евтанізовано на 90 добу досліду. Під час розтину відмічались наступні зміни в органах: збільшення селезінки, печінки, пахвинних лімфатичних вузлів, ураження легень. У двох морських свинок, які загинули, відмічались характерні для перлинниці ураження серозних покривів черевної порожнини та ураження кишечника (рис. 3.10., 3.11.).

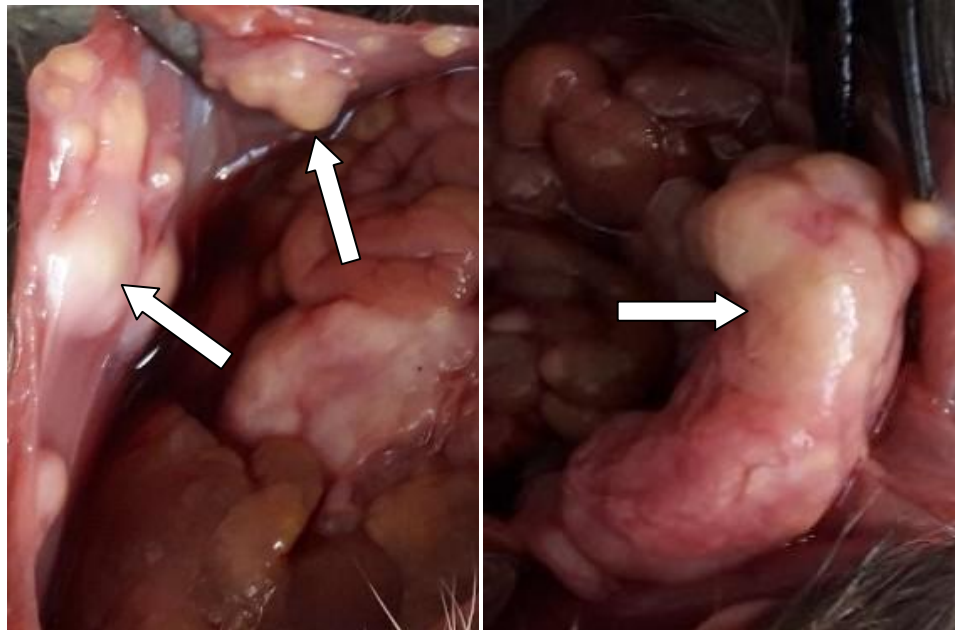


Рис. 3.10.Туберкульозні гранульоми серозної оболонки черевної порожнини (перлинниця) за експериментального ТБ

Рис. 3.11.Накопичення казеозної маси в кишечнику за експериментального ТБ

Суспензією з органів, яку отримали після другого пасажу, заражали наступну групу морських свинок (третій пасаж): у тварин не відмічали алергічних реакцій на ППД-туберкулін для ссавців, утворення виразок в ділянці введення матеріалу, зниження маси тіла та характерних для туберкульозу змін. Бактеріологічними дослідженнями біологічного матеріалу дослідних тварин не було ізольовано жодної культури.

У контрольній групі тварин, заражених суспензією вірулентного штаму *M. bovis*, отриманою після дворазового пасажування через морських свинок, ближче до закінчення періоду досліду відмічали зниження маси тіла. Після

закінчення досліду (90 діб) усіх тварин було евтанізовано. Серед патзмін відмічали: збільшення пахвинних лімфатичних вузлів, селезінки та печінки; велику кількість туберкульозних вузликів у легенях, селезінці, печінці; абсцеси в печінці.

Для перевірки отриманих результатів провели повторне зараження морських свинок зависом мікобактерій дослідних культур в десятикратній дозі. Під час біопроби зниження маси тіла в дослідних тварин не спостерігалась. Сенсibiliзацію організму даної дослідної групи тварин перевіряли за допомогою введення ППД-туберкуліну для ссавців і для птиці в збільшеній дозі (250 МО в 0,1 см³ ізотонічного розчину). У тварин реакції на жоден з алергенів не виявили. По закінченню біопроби (90 діб) патологічних змін в органах не спостерігалось. Бактеріологічним дослідженням матеріалу з органів відмічено ріст культур мікобактерій на четверту добу. Культуральні та тинкторіальні властивості культур мікобактерій були ідентичні тим, що отримали після першої біопроби, що й стало підтвердженням раніше отриманих результатів.

Отже, проведення біологічних проб дало зрозуміти, що довготривале зберігання культур мікобактерій сприяло зниженню вірулентності дослідних культур, яка не відновлювалась навіть через декілька прямих пасажів через організм лабораторних тварин. Зараження морських свинок не супроводжувалось розвитком патолого-анатомічних змін в органах характерних туберкульозу, а також сенсibiliзацією організму. Проте, по закінченню першої та другої біопроб нам вдавалось виділити культури мікобактерій з органів морських свинок. Що свідчить, напевно, про тривалу персистенцію бактерій в організмі лабораторних тварин.

Результати досліджень наведені в цьому підрозділі опубліковані у працях: [168, 225].

3.3. Особливості фільтривних форм мікобактерій

3.3.1. Здатність мікобактерій дослідних культур проходити через бактеріальні фільтри

Щоб визначити, чи генеруються в популяції мікобактерій фільтривні форми, ми провели фільтрування зависів мікобактерій культур, отриманих нами та описаних у попередніх підрозділах, через фільтри з діаметром пор 0,1 мкм (фільтрат Ф-0,1) і 0,05 мкм (фільтрат Ф-0,05). Отримані фільтрати висівали на живильне середовище та проводили культивування за $3,0\pm 0,5$ та $37\pm 0,5$ °С.

На першому етапі дослідили наявність фільтривних форм бактерій в культурах *M. bovis*, які багаторічно зберігались в музеї кафедри (9-12 років) (табл. 3.5).

Нами встановлено, що після фільтрування через фільтр з розміром пор 0,05 мкм за температури культивування $3,0\pm 0,5$ °С отримали нові культури з 50,0 % фільтратів, в той час, як за $37,0\pm 0,5$ °С – тільки з 16,6 % культур.

Таблиця 3.5

Ріст культур з фільтратів багаторічно витриманих культур *M. bovis*

Пасаж	$37,0\pm 0,5$ °С		$3,0\pm 0,5$ °С	
	Ф-0,05	Ф-0,1	Ф-0,05	Ф-0,1
54	–	–	–	–
115	+	+	+	–
135	–	–	–	–
143	–	+	–	+
171	–	–	+	+
180	–	–	+	–

Примітка: «+» – відмічено ріст культури; «–» – ріст культури відсутній.

Після фільтрації через фільтр з розміром пор 0,1 мкм за температури культивування $3,0\pm 0,5$ °C отримали нові культури з 33,3 % фільтратів, за $37,0\pm 0,5$ °C – теж із 33,3 % культур.

Провели дослідження наявності фільтривних форм у культурах дисоціантів – 117-а, б, в, 118 (240 генерації) (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Ріст культур з фільтратів дисоціативних форм

Пасаж	37±0,5 °C		3,0±0,5 °C	
	Ф-0,05	Ф-0,1	Ф-0,05	Ф-0,1
117-а	–	+	–	+
117-б	–	+	+	+
117-в	–	+	–	+
118	–	–	–	–

Примітка: «+» – відмічено ріст культури; «–» – ріст культури відсутній.

Фільтрати з культури 118 варіанту не дали ріст культур в жодному випадку (табл. 3.6). Загалом, після фільтрації дисоціативних форм через фільтр з розміром пор 0,05 мкм, за температури культивування $3,0\pm 0,5$ °C отримали нові культури з 25,0 % фільтратів, в той час, як за $37,0\pm 0,5$ °C не отримали жодної культури.

Після фільтрування через фільтр з розміром пор 0,1 мкм за температури культивування $3,0\pm 0,5$ та $37,0\pm 0,5$ °C отримали нові культури з 75,0 % культур.

На другому етапі дослідження вивчили наявність фільтривних форм бактерій в молодих культурах першої генерації (табл. 3.7), які отримали після пересіву вихідних багаторічно витриманих культур *M. bovis*, які використано на першому етапі дослідження на свіже живильне середовище та культивованих за $3,0\pm 0,5$ та $37,0\pm 0,5$ °C. Слід відмітити, що мікобактерії пасажів 115 та 171 виявились здатними утворювати колонії за обох

температур культивування, пасажу 135 – лише за $3,0\pm 0,5$ °C і пасажів 54, 143, 180 – лише за $37,0\pm 0,5$ °C.

Таблиця 3.7

Ріст культур з фільтратів молодих культур *M. bovis*

Пасаж	$37\pm 0,5$ °C		$3,0\pm 0,5$ °C	
	Ф-0,05	Ф-0,1	Ф-0,05	Ф-0,1
54	–	–	+	+
115 ($37,0\pm 0,5$ °C)	–	–	+	+
115 ($3,0\pm 0,5$ °C)	–	–	–	–
135	–	–	–	–
143	–	–	–	–
171 ($37,0\pm 0,5$ °C)	–	+	+	–
171 ($3,0\pm 0,5$ °C)	–	–	–	–
180	–	–	+	+

Примітка: «+» – відмічено ріст культури; «–» – ріст культури відсутній.

З фільтратів Ф-0,05 за температури культивування $37,0\pm 0,5$ °C не отримали жодної культури, а за $3,0\pm 0,5$ °C – отримали культури з 50,0 % фільтратів. З фільтратів Ф-0,1 за температури культивування $37,0\pm 0,5$ °C ріст спостерігався в 10,0 % культур, тоді як за $3,0\pm 0,5$ °C – у 37,5%.

На третьому етапі дослідження було проведено виявлення фільтривних форм у культурах *M. bovis* виділених на живильному середовищі після висіву суспензії з патматеріалу, яку отримано після одноразового пасажування через організм морських свинок (табл. 3.8).

Після одноразового пасажування молодих культур мікобактерій через організм морських свинок була відмічена максимальна кількість виділених культур з фільтратів за температури культивування $3,0\pm 0,5$ °C: 100% для фільтратів, отриманих після проходження суспензій через фільтр з порами розміром 0,05 мкм і 87,5% для фільтратів, пропущених через фільтр з порами

0,1 мкм. Тоді, як за температури культивування $37,0\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ з фільтратів 0,05 мкм і 0,1 мкм отримано лише по 12,5 % культур.

Таблиця 3.8

Ріст культур з фільтратів культур, отриманих після одноразового пасажування *M. bovis* через організм лабораторних тварин

Пасаж	$37\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$		$3,0\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$	
	Ф-0,05	Ф-0,1	Ф-0,05	Ф-0,1
54	–	–	+	+
115 ($37,0\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$)	+	–	+	+
115 ($3,0\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$)	–	–	+	+
135	–	+	+	–
143	–	–	+	+
171 ($37,0\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$)	–	–	+	+
171 ($3,0\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$)	–	–	+	+
180	–	–	+	+

Примітка: «+» – відмічено ріст культури; «–» – ріст культури відсутній.

На четвертому етапі дослідження виявляли фільтривні форми в культурах *M. bovis*, виділених на живильному середовищі після висіву суспензії з патматеріалу, яку отримали після другого прямого пасажу через організм морських свинок (табл. 3.9).

З патматеріалу, одержаного від лабораторних тварин після другої біопроби на живильному середовищі вдалось виділити тільки чотири культури. З фільтратів, які отримали з цих культур (Ф-0,05, Ф-0,1) за температури культивування $37,0\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ не було виділено жодної культури. За температури культивування $3,0\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ з фільтратів Ф-0,05, Ф-0,1 отримано однаковий відсоток культур (75,0%) з кожного фільтрату відповідно.

Таблиця 3.9

Ріст культур з фільтратів культур отриманих після дворазового пасажування *M. bovis* через організм лабораторних тварин

Пасаж	37,0±0,5 °С		3,0±0,5 С	
	Ф-0,05	Ф-0,1	Ф-0,05	Ф-0,1
п 54	–	–	+	+
п 143	–	–	+	+
п 171 (37,0±0,5 °С)	–	–	–	–
п 180	–	–	+	+

Примітка: «+» – відмічено ріст культури; «–» – ріст культури відсутній.

Отже, завдяки дослідом з фільтрації, ми з'ясували, що в культурах мікобактерій можуть міститись репродуктивні елементи, здатні проходити через бактеріальні фільтри з розміром пор 0,05 та 0,1 мкм, які при потраплянні на живильне середовище утворюють культури. Загалом, серед культур дисоціативних форм такі елементи (фільтривні форми) виділялись в 75,0% – коли завис був пропущений через фільтр з розміром пор 0,1 мкм та у 25,0% при проходженні завису через фільтр з меншим розміром пор (0,05 мкм). Серед багаторічно витриманих та молодих культур їх виділяли в 50,0% по проходженню через фільтри обох розмірів. Серед культур, отриманих після першого пасажу через організм лабораторних тварин, спостерігався максимально високий відсоток виділення фільтривних форм у обох фільтратах (Ф-0,05 і Ф-0,1) – 100 %. У культурах, отриманих після другого пасажу через організм лабораторних тварин, відсоток виділення культур з фільтратів дещо знизився – 75,0 % (для фільтратів Ф-0,05 і Ф-0,1).

Проаналізувавши отримані результати, ми також відмітили, що температура культивування 3,0±0,5 °С позитивно впливає на частоту виділення культур мікобактерій з фільтратів, отриманих після проходження через фільтри з порами обох розмірів (0,1 і 0,05 мкм). Залежності частоти

виділення культур від кількості пасажів через живильне середовище не виявлено.

3.3.2. Морфологія, тинкторіальні та культуральні властивості фільтривних форм мікобактерій

В культур, які отримали з фільтратів, дослідили культуральні, тинкторіальні властивості та морфологію. На прикладі культури 115 пасажу (багаторічно витриманої культури) розглянули відмінності культуральних особливостей культур, отриманих з фільтратів та контрольної культури, отриманої із звису, який не підлягав фільтрації (рис. 3.12.).

Культури, описані в цьому підрозділі, росли за низької плюсової температури культивування ($3,0 \pm 0,5$ °C). Ріст культури контрольного зразка було відмічено на 73 добу. Вона була представлена зеленуватими плоскими ослизкими колоніями неправильної форми. Така сама швидкість росту спостерігалась і в культури, яку отримали з фільтрату Ф-0,1. Ріст культури з фільтрату Ф-0,05 був відмічений дещо раніше – на 66 добу культивування.

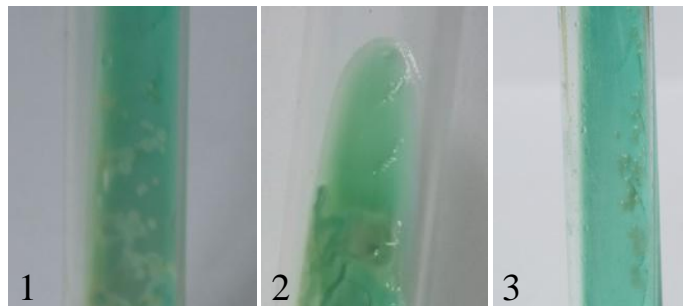


Рис. 3.12. Ріст культур на щільному яєчному живильному середовищі:
1 – контроль; 2 – фільтрат Ф-0,1; 3 – фільтрат Ф-0,05

Культуральні властивості культур, які отримали з фільтратів, мали деякі відмінності від тієї, яка отримана із звису, що не підлягав фільтрації. У культури, з фільтрату Ф-0,1, інтенсивність росла слабше, ріст спостерігався у вигляді окремих поодиноких колоній великих розмірів. Колонії культури, отриманої з фільтрату Ф-0,05, відрізнялись від контрольної своєю формою та жовтуватим пігментом (табл. 3.10)

Таблиця 3.10

Культуральні властивості культур, які отримали з фільтратів

Показник	Культури		
	Контроль	Ф-0,1	Ф-0,05
Інтенсивність росту	Помірна	Слабка	Помірна
Характер росту	Скупчення колоній	Окремі колонії	Скупчення колоній
Кількість	Чисельні	Поодинокі	Чисельні
Величина	Дрібні	Великі	Дрібні
Форма	Неправильна	Неправильна	Правильна
Поверхня	Гладенька	Гладенька	Гладенька
Консистенція	Слизова	Слизова	Слизова
Пігментоутворення (колір)	Зеленуватий	Зеленуватий	Жовтуватий
Прозорість	Напівпрозорі	Напівпрозорі	Напівпрозорі
Емульгованість	Задовільна	Задовільна	Задовільна

Наступним етапом дослідили тинкторіальні властивості та морфологію провівши світлову мікроскопію мазків з культур, пофарбованих за методом Ціль-Нільсена (рис. 3.13).

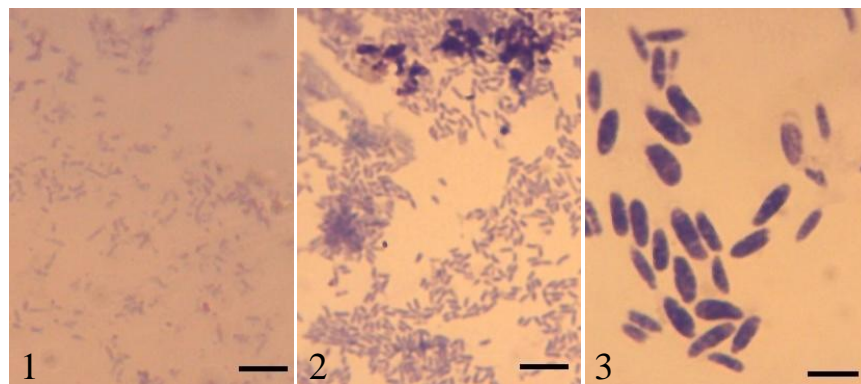


Рис. 3.13. Світлова мікроскопія мікобактерій культур 115 пасажу (фарбування за Ціль-Нільсеном, $\times 1600$): 2.2 – контроль; 2.3 – культура з фільтрату Ф-0,1; 2.4 – культура з фільтрату Ф-0,05. Бар=10 мкм

За мікроскопії контрольної культури та отриманої з фільтрату Ф-0,1, відзначили, що обидві культури морфологічно подібні між собою та представлені некислотостійкими паличками із заокругленими кінцями. Але в культурі з фільтрату розмір паличок дещо більший і вони товстіші, окрім того, в цій культурі виявляли поодинокі некислотостійкі зерна (елементарні тільця) (табл. 3.11). Культура з фільтрату Ф-0,05 повністю представлена гігантськими витягнутими овалоподібними L-формами, всередині яких велика кількість зерен (3.13 – 3).

Таблиця 3.11

Характеристика морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей мікобактерій дослідних культур (пасаж 115)

Показник	Культури		
	Контроль	Ф-0,1	Ф-0,05
Тинкторіальні властивості	Некислотостійкі	Некислотостійкі	Некислотостійкі
Морфологічні ознаки	Короткі палички	Короткі палички	Продовгуваті L-форми
Товщина	Тонкі	Товсті	Товсті
Форма палички	Прямі	Прямі	Прямі
Кінці	Заокруглені	Заокруглені	Заокруглені
Зернистість	Відсутня	Відсутня	Виражена
Розташування	Поодинокі, скупчення	Поодинокі, скупчення	Поодинокі, скупчення
Елементарні тільця	Відсутні	Некислотостійкі	Некислотостійкі
Овали (L-форми)	Відсутні	Відсутні	Некислотостійкі

Розглянули культуральні особливості дисоціативних форм (117-а, 117-б, 117-в) культур, отриманих з фільтратів і порівняли їх з контрольними культурами, отриманими із завису, який не підлягав фільтрації (культивована за $3,0 \pm 0,5$ °C) (рис. 3.14).

Досліджуючи культуральні властивості дисоціативних форм, можна помітити, що культури, отримані з фільтратів та контрольні, мають відмінності. Культури з контролю формували непрозорі жовто-помаранчеві S-колонії дрібних та середніх розмірів. У зразках, отриманих з фільтратів, інтенсивність росту культур на живильному середовищі була нижчою. У культурі 117-а з фільтрату Ф-0,1 відмічено скупчення S-колоній, які значно підвищуються над поверхнею середовища, більших за розмірами, ніж контрольні. У культурі 117-б з фільтрату – поодинокі великі S-колонії з підвищенням в центрі. У культурі 117-в бачимо найбільш виражені відмінності між контрольною та отриманою з фільтрату культурою – колонії останньої мали вигляд плоских плям зеленуватого кольору неправильної форми з гладенькою поверхнею.

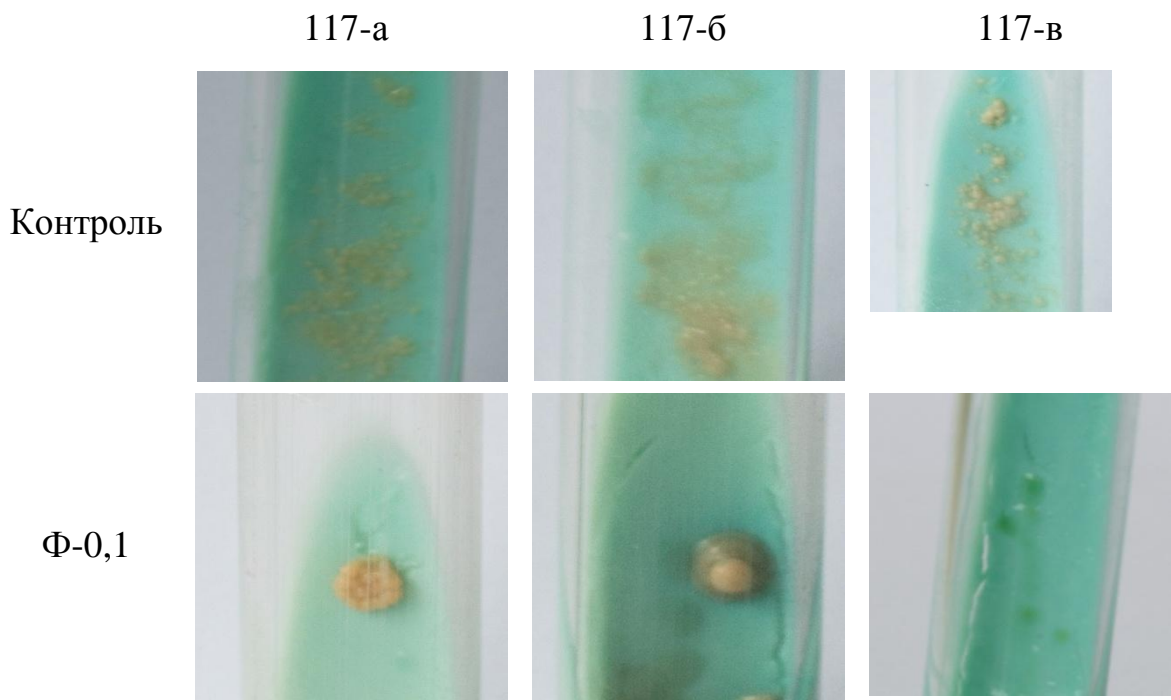


Рис. 3.14. Ріст культур дисоціантів на щільному яєчному живильному середовищі Мордовського

Щоб оцінити морфологію та тинкторіальні властивості мікобактерій дисоціативних форм, провели мікроскопію мазків пофарбованих методом Ціль-Нільсена (рис. 3.15).

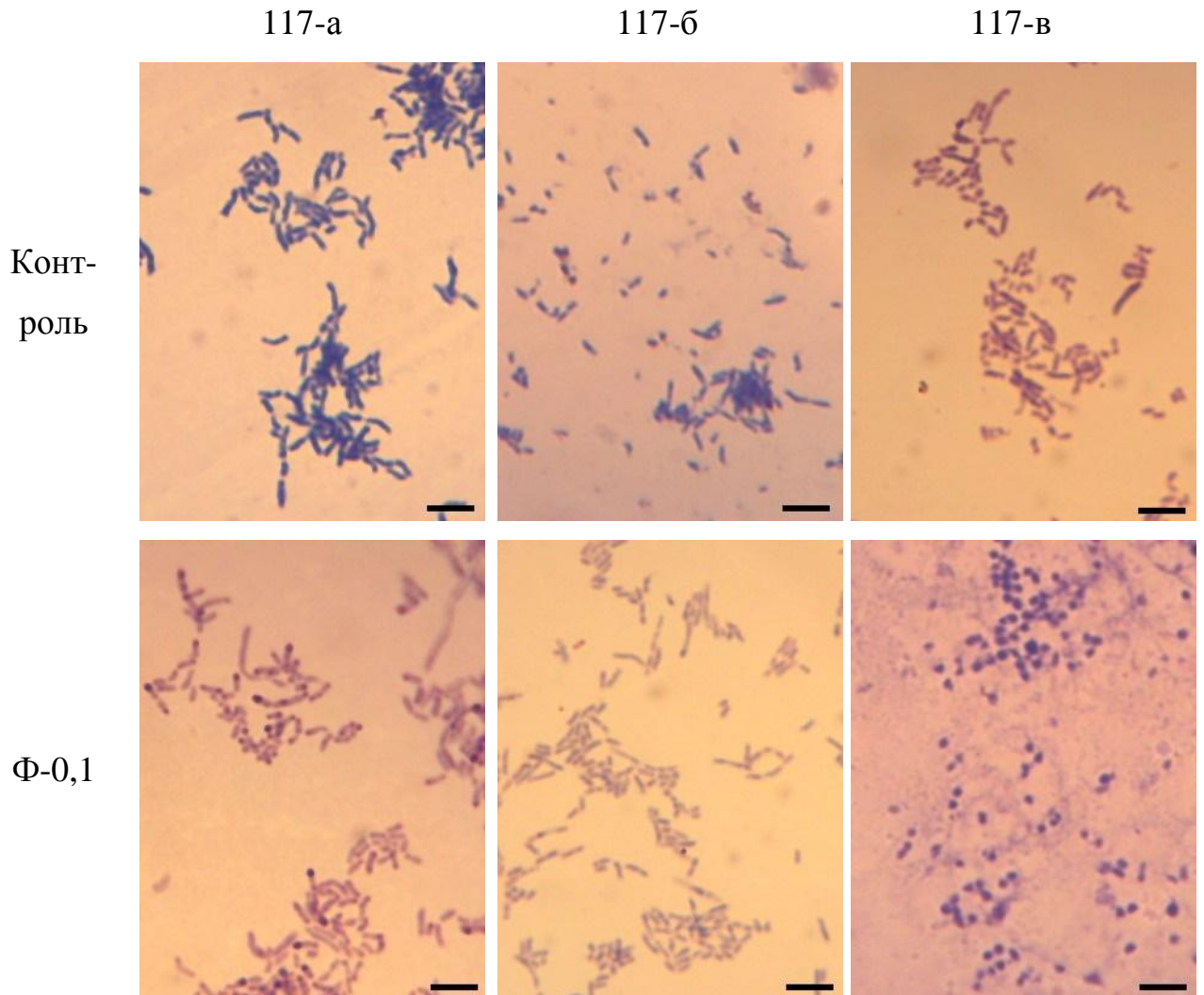


Рис. 3.15. Світлова мікроскопія мікобактерій дисоціативних форм (фарбування за Циль-Нільсеном, $\times 1600$): Бар=10 мкм

Світловою мікроскопією встановлено, що в контрольних зразках мікобактерії дисоціативних варіантів 117-а, 117-б, 117-в були представлені некислотостійкими короткими та довгими паличками, поодинокими зернами. Мікобактерії культур, отриманих з фільтратів, в 117-а та 117-б варіантах, мали морфологічну схожість з контролем, в той час, як у 117-в варіанті морфологія різко змінилась – культура повністю представлена

некислотостійкими зернами. На рис. 3.14. культуральні властивості контролю та культури з фільтрату 117-в також відрізнялись.

Отже, в результаті досліджень встановлено, що проходження через бактеріальний фільтр призводить до деяких змін культуральних властивостей. У зразках, отриманих з фільтратів, інтенсивність росту культур на живильному середовищі переважно була меншою, відрізнялись форма, розмір колоній та, в деяких випадках, їх пігмент. За світлової мікроскопії з'ясовано, що мікобактерії культур, які отримали з фільтратів і з не фільтрованого завису, не володіли кислотостійкістю та, в основному, були представлені паличкоподібними формами. У культурах, отриманих з фільтратів Ф-0,1, окрім паличкоподібних форм виявляли зерна. Культура, отримана з фільтрату Ф-0,05 (115 пасаж), була морфологічно представлена L-формами.

3.3.3. Електронна мікроскопія фільтривних форм

Наступним етапом дослідження стало проведення електронної мікроскопії зразків культур, представлених у попередньому підрозділі. Електронною мікроскопією встановлено, що мікобактерії характеризувались досить різноманітними морфологічними формами (паличками, овалоподібними, сферичними), але їх співвідношення в різних культурах варіювало.

Контрольна культура 115 пасажу була представлена товстими, дещо опуклими паличками із заокругленими кінцями, розміром 2–3 мкм і зернами різної величини (рис. 3.16 – 1). Культура, отримана з фільтрату Ф-0,1, морфологічно була представлена більш опуклими товстими паличками, подібними до овалів розміром 2–3 мкм (рис. 3.17 – 2). Культура з фільтрату Ф-0,05 представлена дещо вигнутими товстими паличкоподібними бактеріями більших розмірів (4,5–5 мкм) із заокругленими кінцями та напівпрозорою облямівкою з нерівними краями, що характерно для L-форм (рис. 3.16 – 3).

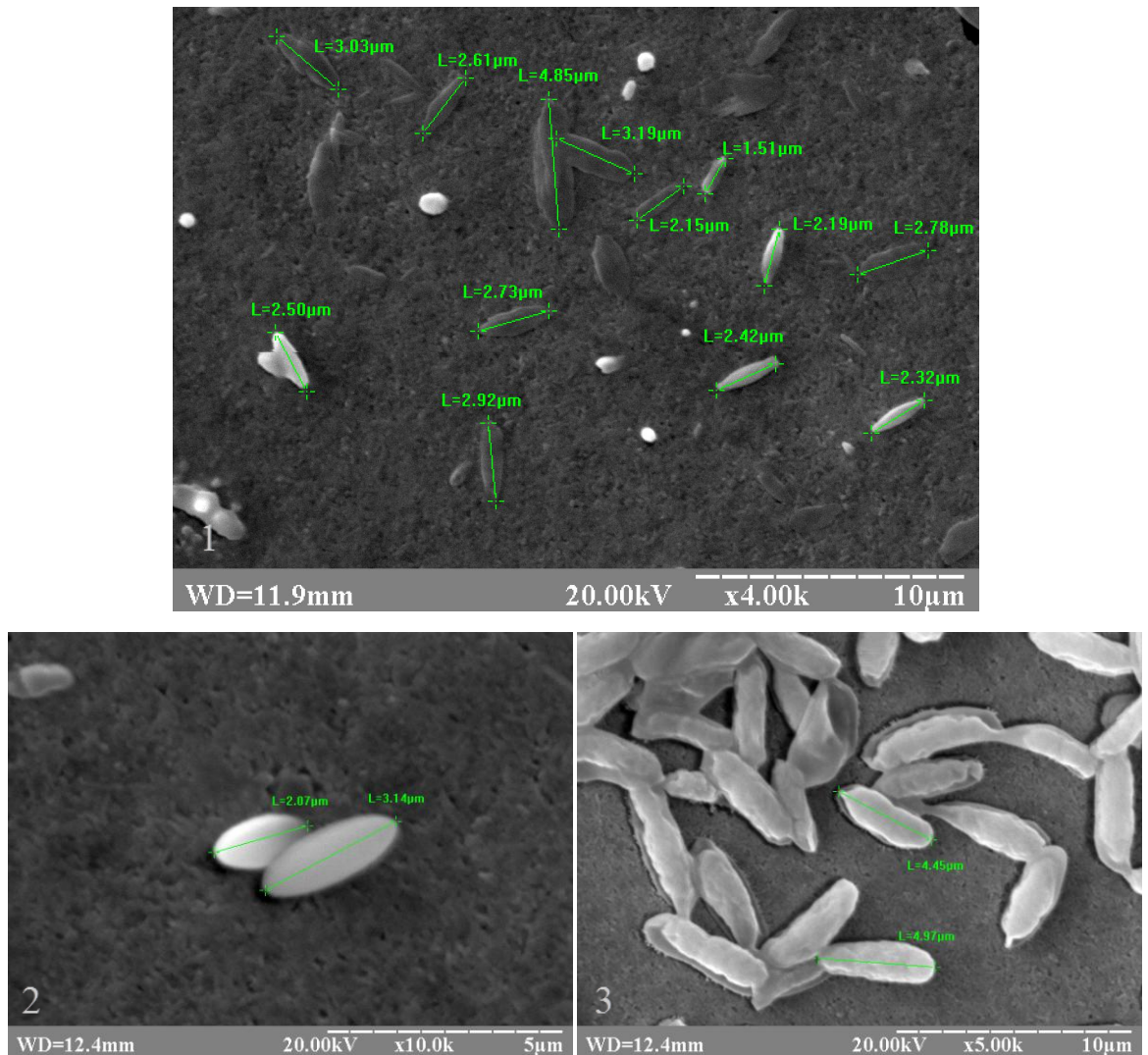


Рис. 3.16. РЕМ мікобактерій дослідних культур: 1 – контроль; 2 – культура з фільтрату Ф-0,1; 3 – культура з фільтрату Ф-0,05

Порівняли морфологію мікобактерій в культурах дисоціативних варіантів, отриманих з не фільтрованого завису та після проходження через фільтр з розміром пор 0,1 мкм (рис. 3.17). Культури 117-а та 117-б як контрольні, так і отримані з фільтратів, мали схожу морфологію та були представлені переважно короткими та довгими прямими та дещо зігнутими паличками. У зразках 117-б з фільтрату також виявляли довгі ниткоподібні форми. Морфологія культур 117-в мала відмінності. Контрольна культура була представлена короткими опуклими паличками із заокругленими кінцями, овалоподібними варіантами, зернами різної величини. У зразках

культури, отриманої з фільтрату виявлені сферичні та овальні форми, натомість паличкоподібні форми відсутні.

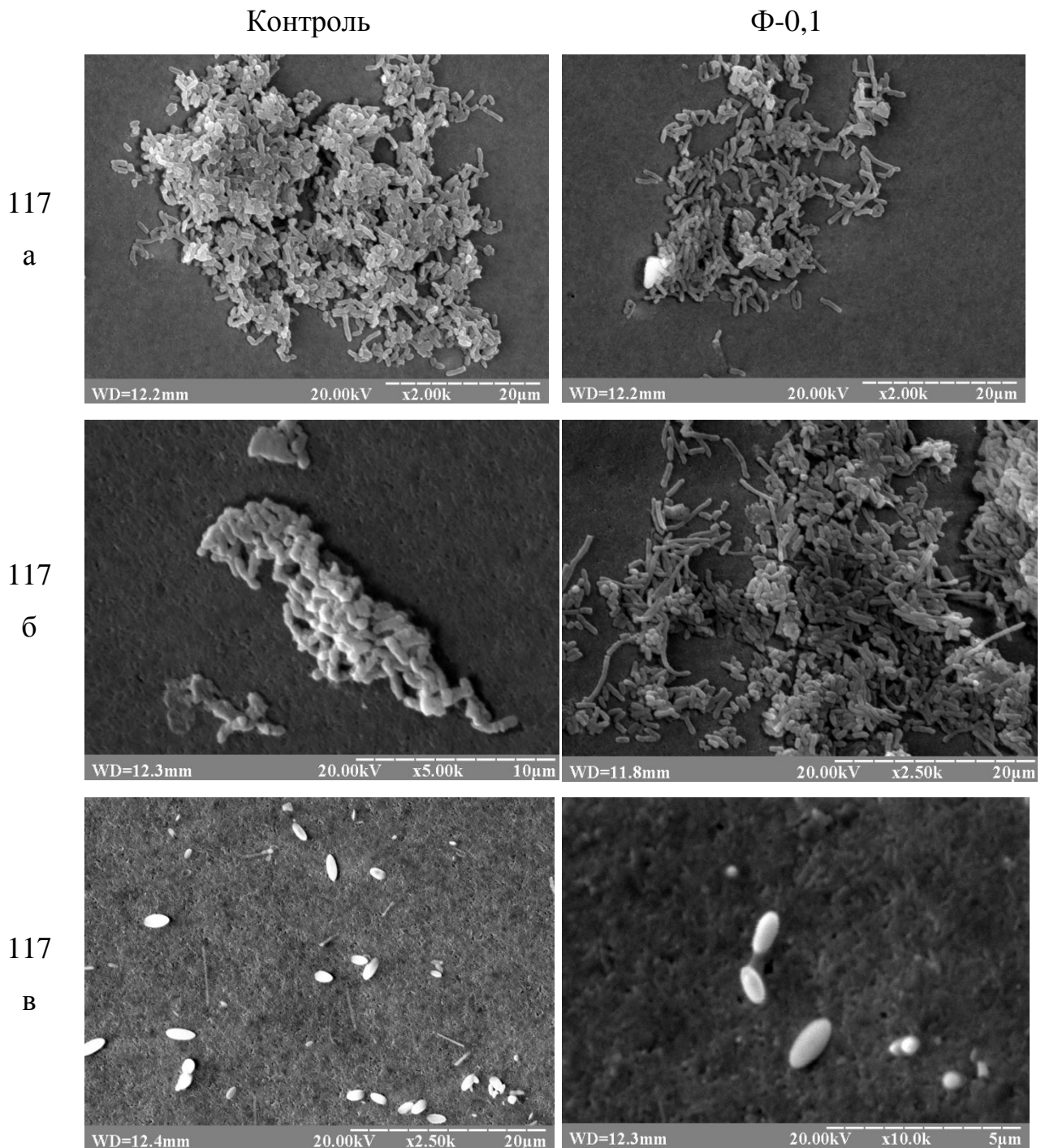


Рис. 3.17. Растрова електронна мікроскопія мікобактерій культур дисоціативних форм

Результати порівняння довжини різних морфологічних форм мікобактерій в культурах, які були отримані з фільтратів та завису, що не піддавався фільтрації (контроль) представлено в табл. 3.12, 3.13. Мікобактерії

культур, утворених з фільтратів, мають більшу довжину клітин. При цьому, чим менший розмір пор бактеріальних фільтрів, через які були пропущені зависи дослідних культур, тим більше розмір клітин отриманих з цих фільтратів.

Таблиця 3.12

Середні значення довжини клітин *M. bovis* 115 пасажу (мкм),
($M \pm m$; $n = 10$)

Культури 115 пасажу	Палички	Сферичні	Овальні
Контроль	1,62 ± 0,69	0,62 ± 0,30	1,9 ± 0,84
Фільтрат Ф-0,1	2,33 ± 0,51	0,74 ± 0,28	2,26 ± 0,67
Фільтрат Ф-0,05	5,15 ± 0,65***	2,28 ± 1,06**	3,85 ± 0,70*

Примітка: *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 відносно розмірів клітин мікобактерій в контролі.

Якщо проаналізувати розміри клітин мікобактерій, виявили тенденцію до збільшення довжини клітин дослідних культур після проходження через фільтри. Так, в 115 пасажі в культурі, отриманій в результаті фільтрації через фільтр з розміром пор 0,1 мкм, мікобактерії мали більшу довжину клітин, порівняно з контролем, в середньому на 0,71 мкм у паличкоподібних, на 0,12 мкм у сферичних і на 0,36 мкм овалоподібних форм (табл. 3.12). Що у відсотках склало збільшення на 43,82 %, 19, 35 % і 18,94% відповідно. В культурі, отриманій із завису, пропущеного через фільтр з розміром пор 0,05 мкм мікобактерії мали ще більшу довжину клітин порівняно з контролем, в середньому на 3,53 мкм у паличкоподібних (P < 0,001), на 1,66 мкм у сферичних (P < 0,01) і на 1,95 мкм у овалоподібних (P < 0,05) форм. Що у відсотках склало збільшення на 217,90 %, 267,74 % і 102,63% відповідно.

Серед дисоціативних форм 117-а та 117-б також виявляли тенденцію до збільшення довжини клітин мікобактерій в культур, отриманих з фільтратів, порівняно з вихідними (табл. 3.13). Так в культурі 117-а, отриманій після культивування фільтрату Ф-0,1, мікобактерії були довшими, порівняно з

контролем, в середньому на 0,34 мкм у паличкоподібних, на 0,17 мкм у сферичних форм і на 0,04 мкм в овалоподібних форм. Що у відсотках склало збільшення на 17,61 %, 29,31 % і 4,12% відповідно.

У культурі 117-б, отриманій після культивування фільтрату Ф-0,1, мікобактерії мали більшу довжину клітин, порівняно з контролем, в середньому на 0,52 мкм у паличкоподібних ($P < 0,05$), на 0,03 мкм у сферичних і на 0,25 мкм в овалоподібних ($P < 0,01$) форм. Що у відсотках склало збільшення на 33,98 %, 9,67 % і 34,72% відповідно.

Таблиця 3.13

Середні значення довжини клітин *M. bovis* дисоціативних форм (мкм),
($M \pm m$; $n = 10$)

Культури		Палички	Сферичні	Овальні
117-а	Контроль	1,93±0,49	0,58±0,09	0,97±0,14
	Фільтрат Ф-0,1	2,27±0,47	0,75±0,23	1,01±0,22
117-б	Контроль	1,53±0,23	0,61±0,19	0,72±0,17
	Фільтрат Ф-0,1	2,05±0,64*	0,64±0,08	0,97±0,15**
117-в	Контроль	1,50±0,28	0,68±0,56	2,14±0,63
	Фільтрат Ф-0,1	–	0,41±0,12	1,65±0,35*

Примітка: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ відносно розмірів клітин мікобактерій в контролі.

У культурі 117-в, навпаки, загальної тенденції до збільшення розмірів клітин у культурах з фільтратів не виявлено. Так, у культурі, отриманій після культивування фільтрату Ф-0,1, довжина клітин, порівняно з контролем, була меншою в середньому на 0,27 мкм у сферичних і на 0,49 мкм в овалоподібних ($P < 0,05$) форм. Що у відсотках склало зменшення на 39,7 % і 22,89 % відповідно.

Під час дослідження мікобактерій за допомогою методу електронної мікроскопії вдалось виявити особливості процесу розмноження

бактеріальних клітин. При цьому, в нашому дослідженні ми звернули увагу на способи розмноження мікобактерій різних морфологічних форм.

На рис. 3.18 відмічено V-подібне розташування клітин паличкоподібних форм після бінарного ділення (так званий «клацаючий» (анг. snapping) поділ клітин). Після поділу клітин наново синтезований матеріал клітинної стінки з'являється у вигляді кінцевого виступу, а кінці, проксимальні до сторони поділу, можуть продовжувати рости, утворюючи горбик на кінці клітини (рис. 3.18. – 2).

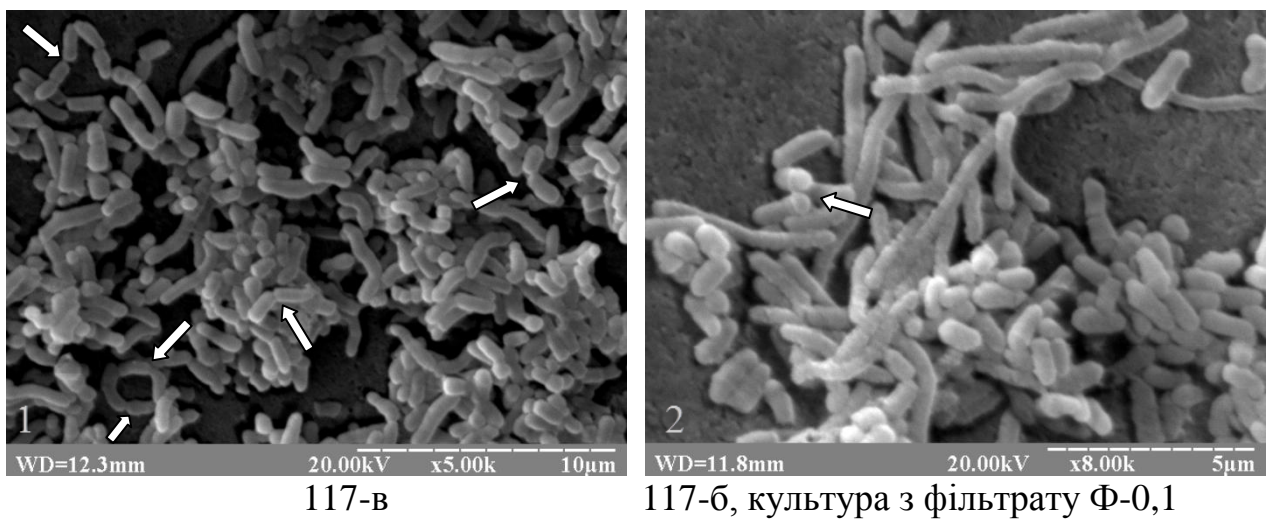
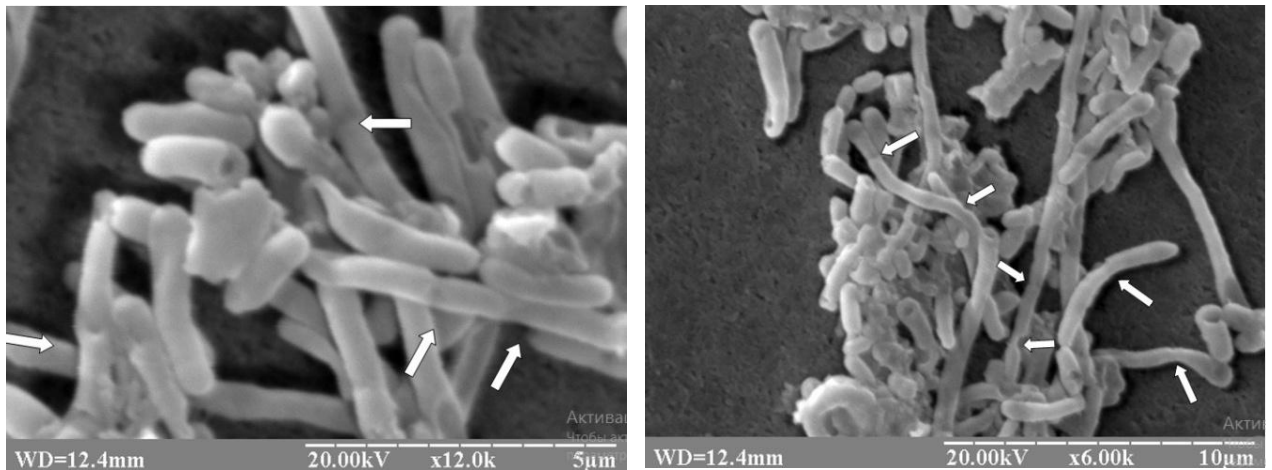


Рис. 3.18. Розмноження паличкоподібних форм мікобактерій (РЕМ). Стрілки вказують на V-подібне розходження бактерій в процесі ділення

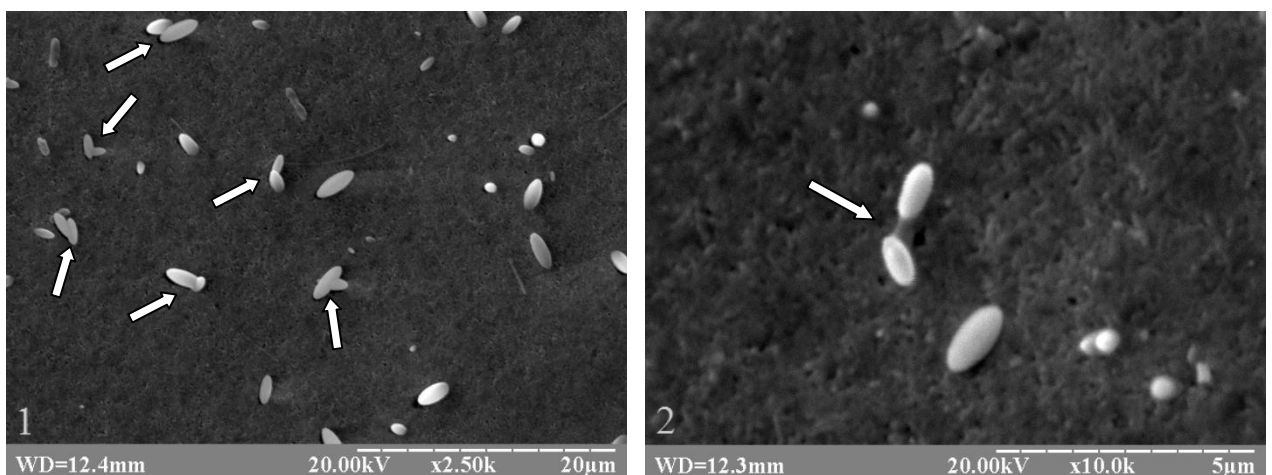
В довгих ниткоподібних формах, за розмноження утворювались так звані «перешийки», які поступово тоншали по мірі розходження дочірніх клітин (рис 3.19.). За цього способу розмноження дочірні клітини розташовуються одна за одною у вигляді ланцюжка. З однієї ниткоподібної форми може утворюватись більше двох паличкоподібних.



117-б, культура з фільтрату Ф-0,1

Рис. 3.19. Розмноження ниткоподібних форм мікобактерій (РЕМ). Стрілки вказують на потоншення бактерій в місцях розділення на дочірні клітини

Результати електронної мікроскопії показали, що для овалоподібних форм, як і для паличкоподібних, притаманний бінарний «клацаючий» поділ. На рис. 3.20. – 1 відмічено парне розташування дочірніх клітин овалоподібної форми після ділення, а на рис. 3.20. – 2 розходження двох ще не повністю роз'єднаних клітин.



Пасаж 115, культура з фільтрату Ф-0,1

117-в, культура з фільтрату Ф-0,1

Рис. 3.20. Розмноження овалоподібних форм мікобактерій. Стрілки вказують на парне розташування бактерій після ділення

Спосіб розмноження L-форм з дефектною клітинною стінкою взагалі виявився не схожим на описані вище. CWD-форми розмножувались способом, який нагадував брунькування. На рис. 3.21. відмічено, маленькі утворення у вигляді шипу, подібні до бруньок, на одному з кінців витягнутих L-форм. На рис. 3.22. спостерігаємо клітини, які мають на одному з кінців також брунькоподібні утворення, різні за величиною, від маленьких до тих, чий розміри наближені до материнської клітини.

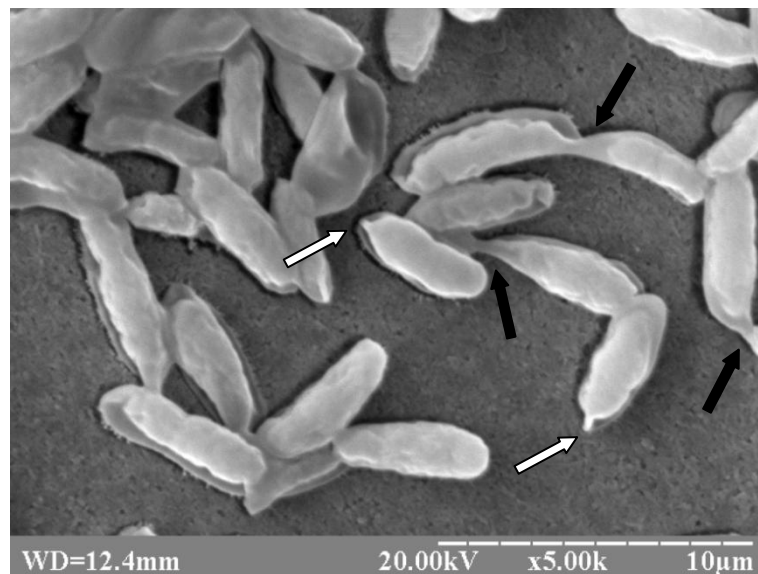


Рис. 3.21. Розмноження L-форм, пасаж 115, культура з фільтрату Ф-0,05 (РЕМ). Білі стрілки вказують на утворення виступів схожих на бруньки; чорні – на розділення клітини на дочірні

За розмноження L-форм не спостерігалось потоншень бактеріальних клітин і утворення «перешийків» в місцях майбутнього розділення клітин, як це було описано вище. Електронною мікроскопією, встановлено, що на кінцях бактерій з дефектною клітинною стінкою виникають утворення, які поступово збільшуються в розмірах, залишаючись з'єднаними з материнською клітиною та, лише досягнувши масштабів останньої, відокремлюються, утворюючи самостійну бактеріальну CWD-клітину.

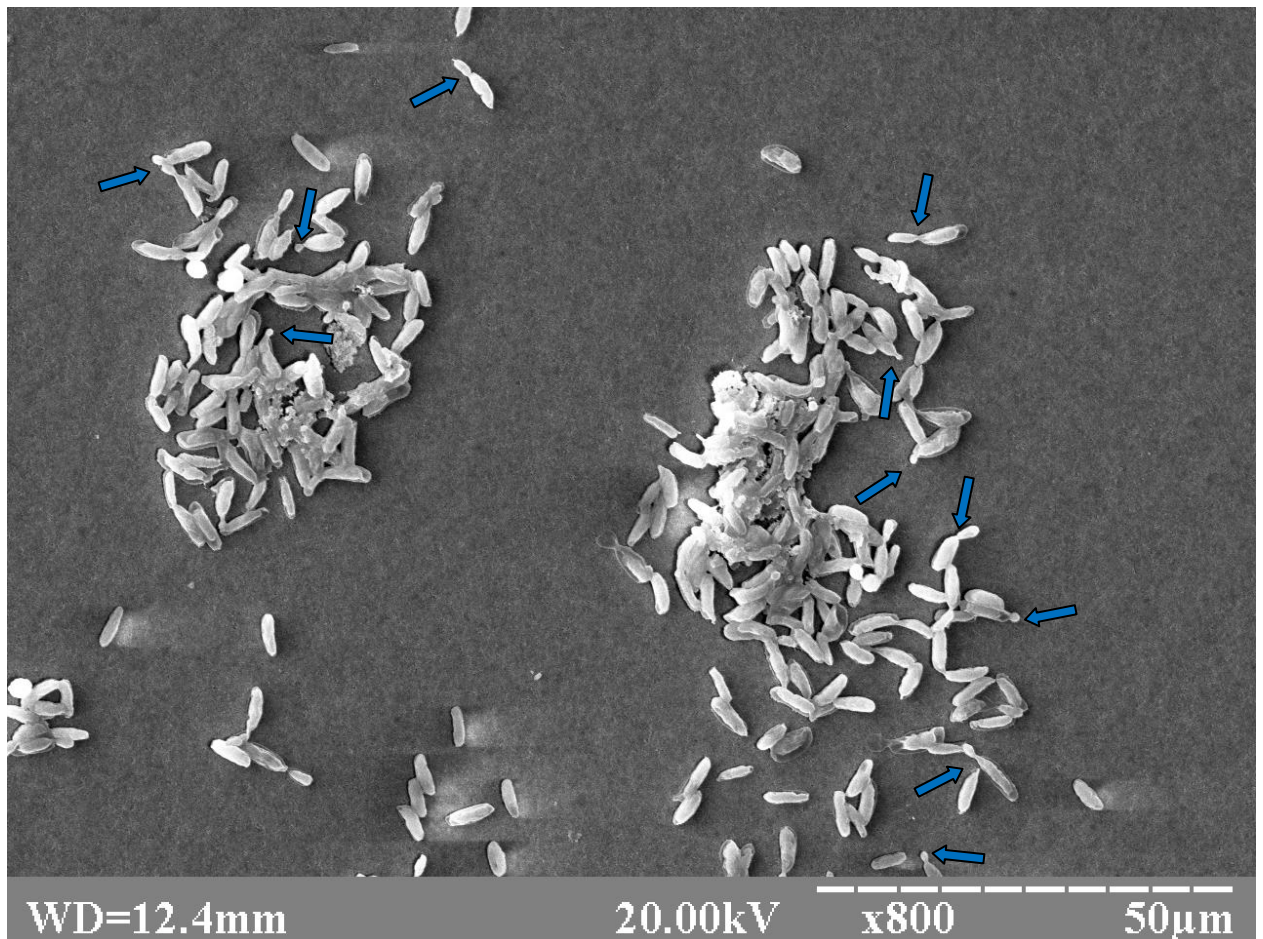


Рис. 3.22.Розмноження L-форм (пасаж 115, культура з фільтрату Ф-0,05). Стрілки вказують на брунькоподібні вирости різних розмірів

Отже, з результатів, викладених вище, можна зазначити, що мікобактерії здатні розмножуватись декількома способами. У свою чергу, спосіб розмноження, в певній мірі, залежить від морфологічної форми, в якій перебувають клітини мікобактерій на момент розмноження. Так, нами з'ясовано, що для паличкоподібних та овалоподібних форм характерний бінарний поділ клітини на дві дочірні. При такому поділі дочірні клітини розходились під кутом у вигляді латинської літери V. Пізніше такі клітини розташовувались одна біля одної паралельно. У наукових статтях такий тип поділу називають «snapping», що в перекладі з англійської означає «клацаючий». Ниткоподібні морфологічні форми ділились асиметрично. Від однієї довгої ниткоподібної форми відділялись одразу декілька (одна та більше) паличкоподібних. Механізм ділення дещо нагадував «клацаючий»

варіант паличкоподібних форм, але у цьому випадку не виникало характерних V-подібних пар бактерій, тут клітини розташовувались ланцюжком. Спосіб розмноження L-форм найбільше нагадував брунькування. На одному з кінців клітини виникав брунькоподібний виріст, який поступово збільшувався та утворював нову CWD-клітину.

Результати досліджень наведені в цьому підрозділі опубліковані у працях: [225]

3.4. Ферментативна активність мікобактерій дослідних культур

3.4.1. Коливання активності ферментів мікобактерій залежно від кількості пасажів та температури культивування

У виділених нами культурах, описаних в підрозділах 3.1., 3.2., 3.3. дослідили активність ферментів: каталази, пероксидази, дегідрогенази, нітратредуктази, здатність до гідролізу ТВІН-80.

На першому етапі дослідження біохімічної активності з'ясували коливання активності ферментів мікобактерій залежно від кількості пасажів та температури культивування (табл. 3.14). Необхідно зазначити, що не всі культури, задіяні в досліді, були здатні рости за низької температури культивування ($3,0 \pm 0,5$ °C), пасажі 54, 143, 180 росли лише за $37,0 \pm 0,5$ °C. Деякі культури (пасаж 135 та дисоціанти – 117-а, б, в, 118), проявляли ростові властивості лише за низької плюсової температури ($3,0 \pm 0,5$ °C).

З огляду на дані, наведені в таблиці 3.14, можна стверджувати, що відмічена тенденція до зміни біохімічної активності досліджуваних мікроорганізмів.

Таблиця 3.14

Ферментативна активність *M. bovis* молодих субкультур

№ пасажу	Температура культивування, °С	Ката-лаза	Перок-сидаза	Дегідро-геназа		Редукція нітратів	Гідроліз ТВІН-80		
				15-30 хв.	24 год.		4 год	5 діб	10 діб
54	37,0±0,5	++	–	–	–	+	–	–	–
115	37,0±0,5	–	–	–	±	+	–	±	+
	3,0±0,5	+	–	–	+	+	–	+	+
135	3,0±0,5	+++	–	–	±	+	–	±	±
143	37,0±0,5	+++	–	–	+	–	–	–	–
171	37,0±0,5	–	–	–	+	–	–	–	–
	3,0±0,5	+	–	–	±	+	–	±	+
180	37,0±0,5	+	–	–	+	+	–	±	±

Примітки: «+» – позитивна реакція; «–» – негативна реакція; «±» – сумнівна реакція; активність каталази (інтенсивність утворення бульбашок): «+++» – значне, «++» – помірне, «+» – поодинокі; «–» – відсутнє.

Що стосується каталазної активності – відмічається її підвищення залежно від зниження температури культивування (пасажі 115 та 171). Дегідрогеназна активність в перші 15–30 хв. не була виявлена в жодній культурі, але вже через 24 год. відмічалась майже у всіх культур, окрім 54 пасажу та 117-а. Редукція нітратів виявилась позитивною в усіх культур окрім, пасажів 143 та 171 за температури культивування 37,0±0,5 °С. Гідроліз ТВІН-80 у перші 4 години був відсутній в усіх культурах. Культури пасажів 115 та 171, які були вирощені за низької плюсової температури культивування, володіли вищою здатністю до гідролізу ТВІН-80 на п'яту добу.

Дослідження ферментативної активності культур дисоціативних форм (117-а, б, в, 118) в динаміці чисельних пасажів через живильне середовище висвітлені в таблиці 3.15.

Таблиця 3.15

Ферментативна активність дисоціативних форм 15 та 240 генерації

№ пасажу	Генерація	Ката-лаза	Перок-сидаза	Дегідро-геназа		Редукція нітратів	Гідроліз ТВІН-80		
				15-30 хв	24 год		4 год	5 діб	10 діб
117-а	240	++	–	–	–	+	–	–	–
	15	+++	+++	+	–	–	Не досліджували		
117-б	240	–	–	–	+	+	–	–	+
	15	++	+++	+	–	–	Не досліджували		
117-в	240	+	–	–	±	+	–	+	+
	15	++	+++	+	–	–	Не досліджували		
118	240	+	–	–	±	+	–	–	+
	15	++	+++	+	–	–	Не досліджували		

Примітки: «+» – позитивна реакція; «–» – негативна реакція; «±» – сумнівна реакція; активність каталази (інтенсивність утворення бульбашок): «+++» – значне, «++» – помірне, «+» – поодинокі; «–» – відсутнє.

Стосовно дисоціативних форм, культури 117-а, б, в та 118 у 15 генерації володіли добре вираженою активністю ферментів каталази, пероксидази та дегідрогенази (знебарвлення розчину метиленової синьки за 15–30 хв) та не володіли ніратредуючими властивостями. Тоді як в 240 генерації в них знизилась активність ферменту каталази, а в 117-в варіанті активність даного ферменту взагалі була відсутня. Пероксидазна активність не була виявлена в жодній з досліджуваних культур 240 генерації. Дегідрогеназна активність також була помітно слабшою, розчин метиленової синьки знебарвлювався

через 24 год. у варіанта 117-б повністю та неповністю – в 117-в та 118, у 117-а знебарвлення не відбувалось взагалі. Редукція нітратів у всіх культур дисоціативних форм 240 генерації виявилась позитивною. Проаналізувавши зміни активності ферментів дисоціативних форм *M. bovis* визначили, що порівняно з 15 генерацією, в 240 генерації, дисоціанти загалом значно знизили свою біохімічну активність (дегідрогеназну і каталазну; пероксидазна зникла повністю), але набули нової здатності, що раніше не відмічалась, редукувати нітрати (табл. 3.15).

3.4.2. Вплив пасажування через організм лабораторних тварин на ферментативну активність мікобактерій.

Провівши зараження лабораторних тварин дослідними культурами (пасажі 54 – 180) по закінченню біопроби (90 діб) приготовлену суспензію з органів морських свинок висіяли на щільне живильне середовище, а у отриманих культур дослідили біохімічну активність (табл. 3.16).

Шляхом порівняння даних таблиць 3.14 (вихідні культури) та 3.16 (культури отримані з органів лабораторних тварин після одноразового пасажування через організм морських свинок), встановлено певні закономірності в змінах біохімічної активності культур, посівів, які досліджували, а саме: підвищення активності ферменту дегідрогенази – пасажі 54, 135 і 171 (за $3,0 \pm 0,5$ °C); втрату здатності редукувати нітрати, особливо в культур одержаних за низьких температур (за $3,0 \pm 0,5$ °C) – пасажі 115, 135 171, та за $37,0 \pm 0,5$ °C пасаж 180; підвищення каталазної активності – пасажі 115 і 171 за обох температур культивування (за $3,0 \pm 0,5$ та $37,0 \pm 0,5$ °C); ферментативна здатність до гідролізу ТВІН-80 в переважній більшості культур знижувалась – пасажі 115 (за $3,0 \pm 0,5$ та $37 \pm 0,5$ °C), 171 ($3,0 \pm 0,5$ °C), 135, 180, і лише в однієї культури – пасаж 54 незначно підвищувалась. Також слід зазначити, що біохімічна активність однієї культури – пасажу 143 після пасажування через організм морських свинок залишилась незмінною.

Таблиця 3.16

Ферментативна активність *M. bovis* після одноразового пасажування через організм лабораторних тварин

№ пасажу	Температура культивування, °С	Ката-лаза	Перок-сидаза	Дегідро-геназа		Редукція нітратів	Гідроліз ТВІН-80		
				15-30 хв.	24 год.		4 год.	5 діб	10 діб
54	37,0±0,5	++	–	–	±	+	–	–	±
115	37,0±0,5	++	–	–	±	+	–	–	–
	3,0±0,5	++	–	–	+	–	–	±	+
135	3,0±0,5	+++	–	–	±	+	–	±	±
143	37,0±0,5	+++	–	–	+	–	–	–	–
171	37,0±0,5	+++	–	–	+	+	–	–	–
	3,0±0,5	++	–	–	+	–	–	–	±
180	37,0±0,5	+	–	–	+	–	–	–	±

Примітки: «+» – позитивна реакція; «–» – негативна реакція; «±» – сумнівна реакція; активність каталази (інтенсивність утворення бульбашок): «+++» – значне, «++» – помірне, «+» – поодинокі; «–» – відсутнє.

Після другого пасажування культур *M. bovis* через організм лабораторних тварин, на живильному середовищі вдалось виділити лише 4 культури за температури культивування 37,0±0,5 °С. Дані ферментативної активності цих культур представлені в таблиці 3.17.

Дегідрогеназна активність через 15–30 хвилин в усіх дослідних культур була відсутня та виявлялась лише через 24 години. Пероксидазною активністю жодна з досліджуваних культур не володіла. Здатність до гідролізу ТВІН-80 в усіх культурах була відсутня через чотири години та п'ять діб і реєструвалась лише на 10 добу. Результати, представлені в таблиці 3.16, спостерігались у 100% повторів реакцій. Порівнюючи отримані

результати (табл. 3.17) з даними аналізу біохімічної активності мікобактерій культур після одноразового пасажування через організм морських свинок (табл. 3.16) зрозуміло, що: каталазна активність в *M. bovis* 143 пасажу дещо знизилась, а в 180 – підвищилась; дегідрогеназна активність знизилась (пасажі 143, 180); підвищились здатність до редукції нітратів у 180 пасажу та до гідролізу ТВІН-80 у 54 та 180 пасажів.

Таблиця 3.17

Ферментативна активність *M. bovis* після дворазового пасажування через організм лабораторних тварин

№ пасажу	Каталаза	Дегідрогеназа (24 год.)	Редукція нітратів	Гідроліз ТВІН- 80 (10 діб)
54	++	±	+	+
143	+	–	–	–
171 (37,0±0,5 °C)	+++	+	+	–
180	+++	±	+	+

Примітки: «+» – позитивна реакція; «–» – негативна реакція; «±» – сумнівна реакція; активність каталази (інтенсивність утворення бульбашок): «+++» – значне, «++» – помірне, «+» – поодинокі; «–» – відсутнє.

Підсумовуючі отримані результати, можна зазначити, що дегідрогеназна активність була найвищою в культур, які отримали після першого пасажу через морських свинок. Здатність до гідролізу ТВІН-80 була вищою в молодих (2-тижневих) культур, а після пасажування через організм лабораторних тварин дещо знизилась. Нітратредуктазна активність знизилась після першого пасажу через лабораторних тварин, але за другого пасажу знову підвищилась. Каталазна активність була високою в культур, які були виділені з органів морських свинок після першої та другої біопроб.

3.4.3. Ферментативна активність фільтривних форм

Дослідили біохімічну активність культур, отриманих після культивування фільтратів (розділ 3.3): багаторічно витриманих і молодих (2-тижневих) культур *M. bovis*, дисоціативних форм (117-а, б, в), культур отриманих після пасажування *M. bovis* через організм лабораторних тварин.

У всіх культур, отриманих з фільтривних форм, пероксидазна активність була відсутня; дегідрогеназна активність реєструвалась через 24 години, (через 15–30 хвилин не виявляли в жодній культурі); здатність до гідролізу ТВІН-80 реєструвалась починаючи з 5 доби (через 4 години у всіх випадках була відсутня). Активність ферментів культур, які отримали з фільтратів багаторічно збережених (9-12 років) культур представлена в табл. 3.18.

Таблиця 3.18

Ферментативна активність *M. bovis* культур з фільтратів, багаторічно витриманих культур

№ пасажу	Фільтрат	Температура культивування (°C)	Каталаза	Дегідрогеназа (24 години)	Редукція нітратів	Гідроліз ТВІН-80	
						5 діб	10 діб
115	Ф-0,05	37,0±0,5	+	–	–	+	+
		3,0±0,5	+++	–	–	+	+
	Ф-0,1	37,0±0,5	+	–	+	–	–
		3,0±0,5	+++	–	–	–	–
143	Ф-0,1	37,0±0,5	+	±	–	–	–
171	Ф-0,05	3,0±0,5	+++	–	–	–	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	+++	–	–	–	–
180	Ф-0,05	3,0±0,5	+	±	–	–	–

Примітки: «+» – позитивна реакція; «–» – негативна реакція; «±» – сумнівна реакція; активність каталази (інтенсивність утворення бульбашок): «+++» – значне, «++» – помірне, «+» – поодинокі; «–» – відсутнє.

Проаналізувавши дані табл. 3.18 бачимо, що каталазою активністю володіли всі 100% з дослідних культур, вона була вищою в культурах, які культивувались за нижчої температури ($3,0 \pm 0,5$ °C). Дегідрогеназна активність була слабо вираженою та відмічалась у 25,0% культур. Нітратредуктазна активність була дуже слабкою та реєструвалась лише в культурі 115 пасажу (Ф-0,1, температура культивування $37,0 \pm 0,5$ °C), що склало 12,5% від усіх культур. Гідроліз ТВІН-80 на 5 та 10 добу реєструвався в 25,0% культур.

У всіх культурах отриманих, з фільтратів дисоціативних форм мікобактерій (117-а, б, в) (табл. 3.19), відмічали активність каталази, вона була більш активною в культур отриманих за $3,0 \pm 0,5$ °C.

Таблиця 3.19

Ферментативна активність культур з фільтратів *M. bovis* дисоціативних форм

№ пасажу	Фільтрат	Температура культивування (°C)	Каталаза	Дегідрогеназа (24 години)	Редукція нітратів	Гідроліз ТВІН-80	
						5 діб	10 діб
117а	Ф-0,1	$37,0 \pm 0,5$	++	-	-	-	-
		$3,0 \pm 0,5$	+++	±	-	+	+
117б	Ф-0,1	$37,0 \pm 0,5$	+	+	-	-	-
		$3,0 \pm 0,5$	+	-	-	+	+
	Ф-0,05	$3,0 \pm 0,5$	+++	±	-	+	+
117в	Ф-0,1	$37,0 \pm 0,5$	++	-	-	-	-
		$3,0 \pm 0,5$	+++	-	-	-	-

Примітки: «+» – позитивна реакція; «-» – негативна реакція; «±» – сумнівна реакція; активність каталази (інтенсивність утворення бульбашок): «+++» – значне, «++» – помірне, «+» – поодинокі; «-» – відсутнє.

Активність дегідрогенази реєструвалась в культурах фільтратів 117-а та 117-б, що склало 42,85%. Редукції нітратів не відмічалась в жодній з культур. Здатність до гідролізу ТВІН-80 відмічалась починаючи з 5 доби в 42,85% культур. Порівняно з табл. 3.14, в дисоціативних форм після фільтрації реєструється зниження ферментативної активності.

Фільтративні форми культур першої генерації (табл. 3.20) володіли низькою біохімічною активністю, особливо порівняно з фільтративними формами вихідних культур.

Таблиця 3.20

Ферментативна активність *M. bovis* культур з фільтратів молодих культур

№ пасажу	Фільтрат	Температура культивування (°C)	Каталаза	Дегідрогеназа (24 год)	Редукція нітратів	Гідроліз ТВІН-80	
						5 діб	10 діб
54	Ф-0,05	3,0±0,5	+++	–	–	–	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	+++	–	–	–	–
115	Ф-0,05	3,0±0,5	+++	–	–	–	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	++	–	–	–	–
171	Ф-0,1	37,0±0,5	++	±	+	–	–
	Ф-0,05	3,0±0,5	+++	±	–	–	–
180	Ф-0,05	3,0±0,5	+++	–	–	–	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	+++	–	–	–	–

Примітки: «+» – позитивна реакція; «–» – негативна реакція; «±» – сумнівна реакція; активність каталази (інтенсивність утворення бульбашок): «+++» – значне, «++» – помірне, «+» – поодинокі; «–» – відсутнє.

Каталазною активністю володіли всі 100% з дослідних культур (табл. 3.20). Дегідрогеназною активністю володіли 25% культур. Нітратредуктазна активність була низькою – у 12,55% культур (культура 171 пасажу, Ф-0,1, отримана за 37,0±0,5 °C). Гідроліз ТВІН-80 був відсутній у 100% культур.

Якщо порівняти ці дані з даними до фільтрації (табл. 3.14), бачимо, що ферментативна активність мікобактерій після фільтрації різко знизилась.

Дослідження ферментативної активності *M. bovis* з фільтратів культур, отриманих після одноразового пасажування через організм лабораторних тварин описано в додатку И, а після дворазового – в табл. 3.21.

Таблиця 3.21

Ферментативна активність *M. bovis* культур з фільтратів культур, отриманих після дворазового пасажування через організм лабораторних тварин

№ пасажу	Фільтрат	Температура культивування (°C)	Каталаза	Дегідрогеназа (24 години)	Редукція нітратів	Гідроліз ТВІН-80	
						5 діб	10 діб
54	Ф-0,05	3,0±0,5	+++	+	-	-	-
	Ф-0,1	3,0±0,5	+++	±	-	-	-
143	Ф-0,05	3,0±0,5	+++	-	-	-	-
	Ф-0,1	3,0±0,5	++	-	-	-	-
180	Ф-0,05	3,0±0,5	++	-	-	-	+
	Ф-0,1	3,0±0,5	++	-	-	-	-

Примітки: «+» – позитивна реакція; «-» – негативна реакція; «±» – сумнівна реакція; активність каталази (інтенсивність утворення бульбашок): «+++» – значне, «++» – помірне, «+» – поодинокі; «-» – відсутнє.

Після першого пасажу через організм морських свинок (дод. И) каталазною активністю володіли всі 100% з дослідних культур. Дегідрогеназна активність була слабо виражена та реєструвалась у 29,41% культур. Нітратредуктазна активність – у 23,52% культур. Гідроліз ТВІН-80 був відмічений лише в культурі пасажу 115 (37,0±0,5 °C) на 10 добу (5,88% культур). Якщо порівняти ці дані з даними табл. 3.16, можна прослідкувати стійку тенденцію до зниження активності дегідрогенази та здатності до

гідролізу ТВІН-80. Нітратредуктазна активність, в деяких культурах, отриманих після фільтрації зникла, а в деяких, навпаки, з'являлась.

Після другого пасажу через організм лабораторних тварин (табл. 3.21) каталазною активністю володіли всі 100% з дослідних культур. Дегідрогеназною активністю володіли культури 54 пасажу, отримані з фільтратів Ф-0,05 і Ф-0,1 (50% культур). Нітратредуктазна активність реєструвалась в одній культурі 180 пасажу Ф-0,05 (30% культур). Гідроліз ТВІН-80 був відмічений лише на 10 добу – у 30% культур (табл. 3.21). Шляхом порівняння отриманих даних з даними до фільтрації (табл. 3.17), встановлено зниження ферментативної активності всіх культур.

Підсумовуючи результати, ми не побачили чіткої залежності між змінами біохімічної активності бактерій досліджуваних культур *M. bovis* і кількістю пасажів. Однак, ферментативна активність залежала від температури культивування: в культур, вирощених за температури $3,0 \pm 0,5$ °С, була вища каталазна активність та здатність до гідролізу ТВІН-80, культури, отримані з фільтратів, володіли нижчою дегідрогеназною, нітритредуктазною активністю та здатністю до гідролізу ТВІН-80, каталазна активність у них залишилась високою.

3.4.4. Здатність мікобактерій дослідних культур розмножуватись і накопичуватись на простих живильних середовищах та за наявності натру саліциловокислого

Дослідні культури пересіяли на МПБ і МПА та щільне ячне живильне середовище Мордовського з саліцилатом натру та оцінили здатність утворювати ріст культур. Культури дисоціативних варіантів (117-а, б, в, 118) виявились здатними рости на щільному (МПА) та рідкому (МПБ) звичайних живильних середовищах, окрім 117-а, який утворював колонії тільки на МПА і не ріс на МПБ. Усі культури 117 варіанту (а, б, в) формували колонії на середовищі Мордовського з додаванням натру саліциловокислого, а культура 118 варіанту на середовищі з натромсаліцилатом не росла (табл. 3.22).

Таблиця 3.22

Ріст дисоціативних форм 240 генерації на звичайних живильних середовищах і середовищі з додаванням натру саліциловокислого

№ пасажу	Температура культивування, °С	МПА	МПБ	Середовище з додаванням натру саліциловокислого
117-а	3,0±0,5	+	–	+
117-б	3,0±0,5	+	+	+
117-в	3,0±0,5	+	+	+
118	3,0±0,5	+	+	–

Примітки: «+» – відмічено ріст культури; «–» – ріст культури відсутній.

Всі досліджувані культури мали здатність рости на МПА та майже всі (за винятком пасажу 54) МПБ. На середовищі з натром саліцилатом росли більшість культур, окрім пасажів 54, 135, 171 (за 3,0±0,5 °С) (табл. 3.23).

Таблиця 3.23

Ріст субкультур *M. bovis* на звичайних живильних середовищах і середовищі з додаванням натру саліциловокислого

№ пасажу	Температура культивування, °С	МПА	МПБ	Середовище з додаванням натру саліциловокислого
54	37,0±0,5	+	–	–
115	37,0±0,5	+	+	+
	3,0±0,5	+	+	+
135	3,0±0,5	+	+	–
143	37,0±0,5	+	+	+
171	37,0±0,5	+	+	+
	3,0±0,5	+	+	–
180	37,0±0,5	+	+	+

Примітки: «+» – відмічено ріст культури; «–» – ріст культури відсутній.

За аналізу табл. 3.24 можна відмітити, що більшість культур отриманих з фільтратів багаторічно збережених культур були здатні рости та простих живильних середовищах. На МПБ виділяли 66,7% культур, на МПА – 77,8%. На середовищі Мордовського з додаванням натру саліциловокислого виділили 66,7% культур. Слід зазначити, що всі культури отримані з фільтратів Ф-0,05, виявились здатними рости на щільному та рідкому простих живильних середовищах.

Таблиця 3.24

Ріст культур *M. bovis* з фільтратів багаторічно витриманих культур на звичайних живильних середовищах і середовищі з додаванням натру саліциловокислого

№ пасажу	Фільтрат	Температура культивування (°C)	МПБ	МПА	Середовище з додаванням натру саліциловокислого
115	Ф-0,05	37,0±0,5	+	+	+
		3,0±0,5	+	+	–
	Ф-0,1	37,0±0,5	+	–	+
		3,0±0,5	–	+	–
143	Ф-0,1	37,0±0,5	+	+	+
		3,0±0,5	–	+	+
171	Ф-0,05	3,0±0,5	+	+	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	–	–	+
180	Ф-0,05	3,0±0,5	+	+	+

Примітки: «+» – відмічено ріст культури; «–» – ріст культури відсутній.

Серед культур, отриманих з фільтривних форм дисоціантів, здатність рости на простих живильних середовищах знизилась (табл. 3.25) порівняно з не фільтрованими культурами (табл. 3.21). Так, на МПБ ріст реєстрували в 42,85% культур, на МПА – 71,42%. На середовищі з додаванням натру саліцилату виділили 57,14 % культур.

Таблиця 3.25

Ріст культур *M. bovis* з фільтратів дисоціативних форм на звичайних живильних середовищах і середовищі з додаванням натру саліциловокислого

Культура	Фільтрат	Температура культивування (°C)	МПБ	МПА	Середовище з додаванням натру саліциловокислого
117а	Ф-0,1	37,0±0,5	–	+	+
	Ф-0,1	3,0±0,5	–	+	–
117б	Ф-0,1	37,0±0,5	+	+	–
		3,0±0,5	–	+	+
	Ф-0,05	3,0±0,5	+	+	+
117в	Ф-0,1	37,0±0,5	+	–	+
	Ф-0,1	3,0±0,5	–	–	–

Примітки: «+» – відмічено ріст культури; «–» – ріст культури відсутній.

Культури, отримані з фільтратів молодих субкультур, погано виділялись на простих живильних середовищах та середовищі з натром саліциловокислим (табл. 3.26). На МПБ виділили лише одну культуру (171 пасаж Ф-0,1 культивована за 37,0±0,5 °C), що у відсотках склало 14,28%. На МПА виділили три культури, що склало 42,85%. На середовищі з додаванням натру саліциловокислого виділили одну культуру (171 пасаж Ф-0,1 культивована за 37,0±0,5 °C), що склало 14,28%.

Таблиця 3.26

Ріст культур *M. bovis* з фільтратів молодих культур на звичайних живильних середовищах і середовищі з додаванням натру саліциловокислого

№ пасажу	Фільтрат	Температура культивування (°C)	МПБ	МПА	Середовище з додаванням натру саліциловокислого
54	Ф-0,05	3,0±0,5	–	–	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	–	+	–
115	Ф-0,05	3,0±0,5	–	–	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	–	+	–
171	Ф-0,1	37,0±0,5	+	+	+
	Ф-0,05	3,0±0,5	–	–	–
180	Ф-0,05	3,0±0,5	–	–	–

Примітки: «+» – відмічено ріст культури; «–» – ріст культури відсутній.

Особливості росту культур *M. bovis* з фільтратів культур, отриманих після одноразового пасажування організм морських свинок на хімічно простих середовищах та середовищі з додаванням натру саліцилату описані в додатку К. На МПБ та МПА ріст спостерігався в 35,29% культур. На середовищі Мордовського з додаванням натру саліциловокислого вдалось виділити лише одну культуру (пасаж 115, Ф-0,05, температура культивування 37,0±0,5 °C), що у відсотках склало 5,88%.

Серед культур фільтратів, отриманих після дворазового пасажування через організм лабораторних тваринна, на МПБ мали здатність рости лише 16,66% (одна культура – пасаж 54, Ф-0,05, культивована за 3,0±0,5 °C). На МПА виділяли культури в 66,66%. На середовище з додаванням натру саліциловокислого не виділили жодної культури (табл. 3.27).

Таблиця 3.27

Ріст культур *M. bovis* з фільтратів культур, отриманих після дворазового пасажування через організм лабораторних тварин на звичайних живильних середовищах і середовищі з додаванням натру саліциловокислого

№ пасажу	Фільтрат	Температура культивування (°C)	МПБ	МПА	Середовище з додаванням натру саліциловокислого
54	Ф-0,05	3,0±0,5	+	–	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	–	–	–
143	Ф-0,05	3,0±0,5	–	+	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	–	+	–
180	Ф-0,05	3,0±0,5	–	+	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	–	+	–

Примітки: «+» – відмічено ріст культури; «–» – ріст культури відсутній.

Загалом, порівняно з нефільтрованими культурами, культури, одержані після фільтрування, рідше вдавалось виділити на МПА, МПБ та середовищі з додаванням натру саліциловокислого. У культурах, отриманих з фільтратів молодих культур та після першого пасажу через морських свинок, ріст на середовищі з додаванням натру саліцилати спостерігався лише в однієї культури в кожному випадку – пасаж 171 Ф-0,1 та пасаж 115 Ф-0,05 (культивовані за 37,0±0,5 °C). Після другого пасажу через організм лабораторних тварин росту на середовищі з натром саліциловокислим не спостерігалось взагалі.

Підсумовуючи викладені в підрозділі результати, ми прийшли до висновку, що кількість пересівів через щільне поживне середовище прямим чином не впливає на ферментативну активність *M. bovis*; низька температура культивування сприяє підвищенню активності каталази та здатності до гідролізу ТВІН-80; після пасажування *in vivo* знижується активність

нітратредуктази та здатність до гідролізу ТВІН-80 і підвищують активність каталази та дегідрогенази; після фільтрації ферментативна активність (дегідроганазна, нітратредуктазна активність і здатність до гідролізу ТВІН-80) культур мікобактерій знижується; культури, отримані після фільтрації, погано виділяються на хімічно простих живильних середовищах (МПБ, МПА) та на середовищі Мордовського з додаванням натру саліциловокислого в 1% концентрації.

Результати досліджень наведені в цьому підрозділі опубліковані у працях: [169, 234]

На основі результатів, отриманих в розділі власних досліджень, розроблено методику ідентифікації фільтривних форм в культурах мікобактерій. Суть методики полягає у виділенні культур із суспензії мікобактерій, пропущеної через бактеріальний фільтр, на живильному середовищі. Результати, висвітлені в підрозділі 3.4.4, свідчать про те, що фільтривні форми погано культивуються на звичайних живильних середовищах (МПБ, МПА) та на середовищі з додаванням натру саліцилату. За результатами досліджень, наведеними в підрозділі 3.3.1 встановлено, що на середовище Мордовського є більш придатним для культивування фільтривних форм. Температура культивування висіяних на живильне середовище фільтратів має суттєве значення у виділенні культур. Експериментально доведено, що за температури $3,0 \pm 0,5$ °C утворення культур на щільному живильному середовищі спостерігалось в більшій кількості пробірок, засіяних фільтратами. Згідно наведених результатів, ми рекомендуємо визначати наявність фільтривних форм в культурах мікобактерій культуральним методом, проводячи посіви зависів бактерій, пропущених через бактеріальні фільтри, на щільне ячне живильне середовище Мордовського (рН 6,7) і культивувати їх за температурного режиму за $3,0 \pm 0,5$ °C.

РОЗДІЛ 4

УЗАГАЛЬНЕННЯ, АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Ми дослідили багаторічно збережені (9-12 років) культури *M. bovis*, щоб зрозуміти, які зміни в метаболізмі та морфології лежали в основі настільки довготривалого підтримання життєздатності бактеріальних клітин.

Дослідження показали, що в культурах мікобактерій, які багаторічно зберігалась в умовах низьких плюсових температур, ще залишились живі бактеріальні клітини, які за пересіву на свіже живильне середовище здатні розмножитись і утворити нові субкультури. Ми з'ясували, чи залежить їх життєздатність від кількості пасажів через живильне середовище та рН середовища, на якому вони зберігались.

Встановили, що лише 66,7% з багаторічно збережених культур за пересіву виявились здатними утворювати нові субкультури. Кількість пасажів через живильне середовище не мала прямого впливу на частоту виділення субкультур. Найвищою здатністю утворювати нові субкультури володіли бактерії, які зберігались на середовищі з рН 6,5. Новою властивістю отриманих субкультур стала здатність деяких з них утворювати колонії за низької плюсової температури ($3,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$), чого раніше не спостерігалось. Ми вважаємо, що така набута зміна комфортної температури культивування пов'язана з довготривалим зберіганням за такої самої температури, завдяки чому відбулась адаптація мікобактерій до нових змінених умов існування. Незважаючи на довготривале зберігання культур без пересівів і перебування бактерій у пригніченому стані через вплив стресових чинників, поява росту субкультур була досить швидкою, в більшості випадків на 4–6 добу, а інтенсивність росту переважно була пишною (особливо за $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Культуральні властивості отриманих субкультур відрізнялись від вихідних

(материнських) культур. Відмінністю стало набуття субкультурами пігментів (жовто-помаранчевого та синьо-зеленого).

На нашу думку, описані вище зміни зумовлені впливом на мікроорганізми, які досліджували, декількох стресових факторів:

- довготривале зберігання культур бактерій без пересівів на свіже живильне середовище, що стало причиною голодування мікроорганізмів через виснаження поживних речовин в середовищі;

- довготривале перебування за умов некомфортної для термофілів (якими вважають мікобактерій) температури ($3,0 \pm 0,5$ °C);

- зниження вмісту кисню в пробірках через виснаження його запасів бактеріями впродовж багатьох років зберігання, адже мікобактерії відносять до аерофілів або мікроаерофілів (Ткаченко et al. 2010).

На нашу думку, сукупність впливу даних факторів стала причиною серйозного стресу, який суттєвим чином вплинув на життєдіяльність клітин *M. bovis*. Такі висновки перекликаються з роботами інших дослідників (Csillag, 1964; Michailova et al., 2005; Markova et al., 2008; Ghosh et al., 2009; Shleeva et al., 2011, Markova et al., 2012; Slavchev et al., 2012), які стверджують, що під впливом несприятливих факторів у бактеріальних клітин спостерігається L-конверсія. Так, у своїх дослідженнях Slavchev et al. (2012) розглядали здатність *Mycobacterium bovis* формувати незвичайні морфологічні форми з дефіцитом клітинної стінки (або L-форми) при голодуванні, кріогенному стресі та фільтрації. Отримані форми породили велике різноманіття колоній, що містили більше одного типу зростаючих елементів. Явище, яке спостерігалось автори пов'язали з адаптивною стратегією виживання та розмноження в несприятливому середовищі.

Дані, наведені вище, підтверджують наші результати мікроскопії. Виготовлені з культур мазки фарбували за методом Ціль-Нільсена, що дало змогу оцінити стан структури клітинної стінки дослідних мікроорганізмів, а саме, наявність чи відсутність воскоподібних речовин.

Дослідження багаторічно збережених культур показало, що вищезазначені стресові фактори сприяли втраті кислотостійкості бактерій та зміні морфології, яка була досить різноманітною: палички, ниткоподібні форми, зерна, овальні та округлі L-форми. Саме підвищення частоти виявлення L-форм та зерен (елементарних тілець) стало основною відмінною ознакою в морфології культур до та після їх зберігання.

У субкультурах, як і в материнських культурах, з яких вони були отримані, також виявляли багато морфологічних форм: палички різної довжини із заокругленими кінцями, ниткоподібні форми, зерна (елементарні тільця) та L-форми. За тинкторіальними властивостями майже всі субкультури не володіли кислотостійкістю.

За допомогою растрової електронної мікроскопії вдалось більш ретельно дослідити й порівняти морфологію та характер поверхні бактеріальних клітин багаторічно витриманих культур та молодих субкультур, а також контрольного вірулентного штаму *M. bovis*.

Головною відмінністю бактерій багаторічно витриманих культур була незвично нерівна рельєфна поверхня, тоді як поверхня мікобактерій молодішої субкультури та контрольного материнського штаму не мала таких яскраво виражених нерівностей. У літературних джерелах повідомляється, що мікобактерії мають гладку клітинну поверхню при відсутності суворих умов існування, тоді як за стресу її характер змінюється. Так в анаеробних культурах (30–50 днів) вона ущільнюється, а в мікобактерій стійких до лікарських речовин, значно збільшується шорсткість поверхні (Atlas, 2017).

Описані вище зміни морфології, культуральних і тинкторіальних властивостей можуть свідчити про те, що бактерії дослідних культур набули подібності до атипових мікобактерій. Ми вважаємо, що ці зміни – результат адаптації до несприятливих умов існування.

Багато авторів стверджують, що мікобактерії здатні змінювати свою форму в умовах стресу (Edson, 1951; Mattman, 1970; Ramakrishnan et al., 1972; Takahashi, 1979; Atlas, 2017). Вони стають коротшими в старіших культурах і

набувають роздутого, яйцеподібного вигляду під час голодування або нестачі кисню (Vera & Rettger, 1940; Young et al., 2005; Farnia et al., 2010; Shleeve et al., 2011; Akbar & Farni, 2012; Atlas, 2017).

Так, в своїх дослідях Vera & Rettger (1940) вивчали чотири штами *M. tuberculosis (hominis)*, «Кох», 607, 75 і H37. Коли вони перекрили подачу повітря, дуже скоро з'явилися різні морфологічні варіанти. Бактерії дещо набрякли, цитоплазма ставала менш чіткою та гладенькою. Такі структури ставали все більш рефракційними та більш різко відмежованими, поки, нарешті, не набули певної поверхневої подібності зі спорами (Akbar & Farni, 2012).

Дещо схожі умови анаеробіозу на ті, що мали місце в нашому досліді, описуються в моделі Уейна. Культури бактерій піддавалися поступовому самогенеруючому виснаженню кисню шляхом інкубації в герметичних пробірках з мішалкою. Після повільного переходу аеробного зростання *M. tuberculosis* в анаеробні умови, культура виявилася здатною адаптуватись і вижити за анаеробіозу, переходячи в стан нереплікуючої персистенції (Akbar & Farni, 2012).

Також багато авторів повідомляє про те, що після перенесення в живильне середовище сферичні бактерії здатні регенерувати в паличкоподібні клітини (Udou et al., 1982; Akbar & Farni, 2012), що підтверджується і в нашому дослідженні.

У дослідях Anuchin et al. (2009) мікобактерії культивували на середовищі з обмеженим вмістом азоту та зберігали без перемішування за кімнатної температури протягом п'яти місяців. З часом клітини ставали ракетоподібними та майже округлими (яйцеподібними). Такі форми відрізнялись своєю стійкістю до дії високої температури 60-80 °C і впливу гігроміцину та доксицикліну. Після зберігання протягом 5 місяців яйцеподібні форми реанімували в модифікованому середовищі Саутона. Цей процес супроводжувався перетворенням яйцеподібних клітин в типові паличкоподібні.

Stewart-Tull (1965) піддавав культури *M. tuberculosis*, *M. kansasii* і *M. phlei* голодуванню. У результаті мікобактерії втратили кислотостійкість. У цьому хромофобному стані вони вижили не менше 2 років, і після цього, при перенесенні на живильне середовище, утворили культури кислотостійких швидкорослих бактерій (Akbar & Farni, 2012).

Проте, культури які ми досліджували, зберігались набагато довше, ніж описано в літературних джерелах – 9–12 років. Завдяки морфологічній трансформації в L-форми бактерії не втратили здатності до регенерації та реверсії в паличкоподібні форми. Але, на нашу думку, такий значний термін зберігання міг спричинити глибокі зміни в метаболізмі бактеріальних клітин. Тому, за пересіву старої культури на свіже живильне середовище, утворились колонії швидкорослих некислотостійких поліморфних бактерій. Тобто кислотостійкість не була відновлена. На такий результат, безумовно, вплинув ще й багаторазовий пересів через щільне живильне середовище, тоді як в досліді були використані культури, які багаторазово пасажувались *in vitro*.

Це все наштовхує на питання про вірулентність мікобактерій дослідних культур. У літературі існують повідомлення, що втрата кислотостійкості пов'язана з втратою вірулентності (Dubos & Middlebrook, 1948; Cardona et al., 2006; Andreu & Gibert, 2008), адже втрата червоного забарвлення за фарбування методом Ціль-Нільсена вказує на зміни синтезу ліпідів клітинної стінки бактерій (Converse et al., 2010). Щоб відповісти на це питання ми провели пасажування мікобактерій дослідних культур через організм морських свинок, адже саме модель морської свинки є високочутливою для цього виду мікроорганізмів та вважається золотим стандартом за тестування вакцин проти туберкульозу (Clark et al., 2014; Bucsan et al., 2019).

У результаті нами було з'ясовано, що довготривале зберігання культур мікобактерій в умовах низьких плюсових температур ($3,0 \pm 0,5$ °C) сприяє зниженню вірулентності, яка не відновлюється після послідовних пасажів через організм лабораторних тварин. В експерименті *in vivo* мікобактерії дослідних культур не призводили до загибелі морських свинок, проте

викликали стан інфекції та стимулювали, можливо, прихований інфекційний процес у тварин, про що свідчить тривала персистенція в тканинах дослідних морських свинок інокульованих мікобактерій, які ізолювались бактеріологічно. Такі результати можуть бути обґрунтовані тим, що досліджувані культури попередньо зазнали чисельних послідовних пересівів через живильне середовище, що послабило їх вірулентність, багаторічне зберігання *in vitro* цих культур ще більше сприяло її зниженню.

Культуральна дисоціація мікобактеріальних культур при багатолітніх пасажах на елективних поживних середовищах за оптимальною температурою створює м'які умови вегетації мікробіонтів й індукує генетичну програму сапрофітизації (Сосницький & Сосницька, 2017). Відомо, що послідовне пасажування *in vitro* патогенних бактерій та вірусів є класичним методом отримання аттенуєваних штамів, які можна використовувати як для отримання вакцин, так і як безпечні лабораторні штами для вивчення основних характеристик збудника (Smith, 1988). Прикладом можуть слугувати штами вакцини BCG та H37Ra (Calmette, 1923; Steenken & Gardner, 1946; Converse et al., 2010). Процес генерування таких штамів-мутантів часто включає безліч циклів росту *in vitro*, що може зменшити вірулентність неспецифічним чином – шляхом вибору варіантів бактерій, які найкраще пристосовані до умови *in vitro*. Крім того, материнські штами-господарі, що використовуються для таких маніпуляцій, можуть самі проходити тривале культивування *in vitro*.

Дослідження мінливості вірулентності збудника туберкульозу були опубліковані ще в 1950-х роках (Bloch, 1950; Pierce et al., 1953; Segal & Bloch, 1956). Слід зазначити, що в своєму огляді Steenken (1950) повідомив, що пасажування через тварин ніколи не призводило до реверсії авірулентного штаму. Однак були випадки, коли ослаблені штами бактерій, які, ймовірно, містили вірулентну субпопуляцію, могли проявляти вірулентність після пасажування через тварин. Тестування на морських свинках у 1950-х рр.

показало, що штами, що підтримуються *in vitro*, були менш вірулентними для морських свинок (Grosset & Ji, 1998; Converse et al., 2010).

Таким чином, вірулентність може бути втрачена коли бактерії знаходяться в середовищі, де гени, які відповідають за неї, не дають переваги, а енерговитратна їх експресія є суттєвим селективним недоліком. Однак, втрата генів вірулентності не обов'язково є синонімом загасання вірулентності в цілому. Через адаптацію до конкретного хазяїна або до нової ніші всередині хазяїна можуть відбуватись мутації у відомих генах вірулентності, які важливі в попередній ніші, але в новій обстановці не несуть очевидної користі. Це підтверджується «швидкою» деградацією геному, яка спостерігається під час адаптації до нових ніш у бактерій різних родів: *Coxiella* (Seshadri et al. 2003), *Mycobacterium* (Vissa & Brennan 2001), *Salmonella* (Parkhill et al., 2001; McClelland et al., 2004; Klemm et al., 2016), *Shigella* (Jin et al., 2002) і *Yersinia spp.* (Parkhill et al., 2001). Так, наприклад, штами сальмонел адаптовані до позакишкових ділянок, як правило, проходять довші фази росту в просвіті кишечника (Diard & Hardt, 2017).

Описані випадки зміни вірулентності бактерій демонструють, що еволюція патогенів є надзвичайно динамічною, а геномним елементам, що кодують фактори вірулентності, властива рухливість (Diard & Hardt, 2017).

У літературі існують повідомлення про те, що в умовах стресу мікобактерії зменшують свої розміри. Так, за впливу антибіотиків паличкоподібні мікобактерії зменшували свої розміри від $0,9 \times 0,2$ до $0,5 \times 0,2$ мкм (Atlas, 2017). У той час, як бактерії, які не зазнавали стресу мають дещо більші розміри, наприклад, розмір *M. tuberculosis* штаму H37, що культивується в Колумбійському університеті, варіювався від $4,3 \times 0,4$ мкм до $1,0 \times 0,2$ мкм (Akbar & Farni, 2012). Цю особливість ми взяли до уваги в нашому досліді по фільтрації.

Дослідженням фільтривних форм займалось багато вчених. У 1910 році Fontes описав застосування до туберкульозної палички добре відомого методу відділення вірусу від субстрату шляхом фільтрації матеріалу через

бактеріальний фільтр. Він ввів морській свинці відфільтрований казеозний матеріал і заразив суспензією з органів цієї тварини іншу морську свинку. Коли після п'яти місяців спостереження тварину було забито, розтин показав інфільтрацію круглих клітин, гранул і поодиноких кислотостійких паличок у лімфатичних вузлах і легенях. Через багато років експерименти по фільтрації Фонтеса були повторені та підтверджені Вандремером у 1923 році (Akbar & Farni, 2012). Пізніше Khomenko et al., (1984) та його колеги виявили фільтривні або міні-форми мікобактерій туберкульозу, які залишались в тканинах морських свинок після завершення протитуберкульозного лікування. Фільтрування через фільтри 0,2-0,7 мкм, виявило присутність електронно-щільних форм округлої форми та середнього діаметра 0,25 мкм. Пряме введення цих форм морським свинкам після декількох пасажів викликало розвиток туберкульозу. Автори припустили, що ці фільтривні форми можуть являти собою стійкі організми, які здатні перетворюватись у активно зростаючі клітини за відповідних умов (Khomenko & Golyshevskaya, 1984; Anuchin et al., 2009).

Багато робіт сучасних іноземних науковців також присвячено фільтривним тілам. Лінда Меттман присвятила багато робіт вивченню L-форм, в яких також підіймається питання фільтривності (Mattman, et al., 1960; Mattman, 1970, 2000, 2001). Ціла серія робіт Маркової та її колег – Славчева та Михайлової, присвячена вивченню L-форм, серед них є і дослідження феномену фільтривності *M. tuberculosis* і *M. bovis* BCG. (Markova et al., 1997, 2008, 2012, 2015; Slavchev et al., 2013, 2016; Markova, 2009, 2012; Michailova et al., 1993, 2000, 2005, 2007; Nadya & Georgi, 2014).

У нашому дослідженні ми вирішили з'ясувати, чи може завис мікобактерій, пропущений через фільтри з ще меншим розміром пор, ніж повідомляється в літературних джерелах – 0,1 і 0,05 мкм, містити репродуктивні елементи, здатні дати початок росту нової культури.

Провівши серію дослідів з фільтрації дисоціативних форм, багаторічно збережених культур, молодих субкультур, а також культур, отриманих після

пасажування через організм лабораторних тварин, ми з'ясували, що фільтрати цих культур, висіяні на живильне середовище, здатні розмножуватись, утворюючи нові культури. Це вказує на існування в дослідних культурах найдрібніших фільтривних форм. Проте, дані, які отримані нами, свідчать про те, що такі форми генеруються не у всіх мікобактеріальних культурах в однаковій мірі. Так, серед багаторічно витриманих та молодих субкультур, отриманих з них, така здатність спостерігається лише в половини.

В культурах дисоціативних варіантів фільтривні форми виділяли в 75,0% культур (117-а, 117-б, 117-в). Найвища здатність до генерації фільтривних форм реєструвалась після першого пасажу мікобактерій через організм морських свинок (100% культур). На нашу думку, це може бути зумовлено стресовим станом мікобактерій через різку зміну умов існування з *in vitro* (де вони перебували протягом тривалого періоду часу та значним чином пристосувались до даних умов) на *in vivo*. Але після другого пасажу через організм лабораторних тварин генерація фільтривних форм в культурах дещо знизилась і їх виділяли тільки у 75,0 %.

У літературі можна зустріти повідомлення, що фільтривні форми погано культивуються *in vitro* (Khomenko, 1987; Parrish et al., 1988; Shamim, 2012) та потребують спеціальних синтетичних живильних середовищ. В нашому досліді ми вирішили дещо змінити підхід до культивування цих форм та звернули увагу саме на умови культивування, а конкретніше – температурний режим. Тому культивування всіх фільтратів відбувалось за двох температур – $3,0 \pm 0,5$ та $37,0 \pm 0,5$ °C.

У результаті такого підходу нами було виявлено, що температура $3,0 \pm 0,5$ °C більше підходить для культивування фільтривних форм мікобактерій (не залежно від того, якою була комфортна температура культивування культури, з якої був отриманий фільтрат), а особливо тих, які виділені після проходження через фільтри з найменшим розміром пор – 0,05

мкм. (фільтрати Ф-0,1 в деяких окремих випадках давали ріст за $37,0 \pm 0,5$ °С, в той час, як за $3,0 \pm 0,5$ °С його не спостерігалось).

У культур, отриманих з фільтратів, інтенсивність росту була дещо нижча, ніж у контролі (культури отримані з не фільтрованого завису). Морфологічно вони відрізнялись наявністю елементарних тілець (зерен). Культура отримана з фільтрату з найменшим розміром пор (0,05 мкм) повністю змінила свою морфологію та була представлена L-формами. Це свідчить про те, що деякі клітини мікобактерій за фільтрації здатні проходити через бактеріальний фільтр з дуже дрібним діаметром пор (0,05 мкм) і, в подальшому, дати початок новій генерації бактерій, але не класичної паличкоподібної форми, а з дефектною клітинною стінкою – CWD (L-форми). Такий результат утворення L-форм також можна пояснити впливом стресу на бактерії, адже фільтрація є таким фактором, а втрату клітинної стінки можна розглянути як механізм адаптації бактерій до несприятливих умов.

Порівнявши розміри клітин мікобактерій в контрольних та культурах, отриманих з фільтратів, виявили тенденцію до збільшення довжини клітин після проходження через фільтри. При цьому, чим меншим був діаметр пор фільтру, тим більшою виявлялася довжина клітин культури, отриманої з фільтрату (окрім 117-в).

Бактерії досліджуваних нами зразків мали виражений поліморфізм. Сьогодні, завдяки досягненням в області мікроскопії, наприклад, ПЕМ, СЕМ та АСМ, майже всі дослідники погодились з тим, що мікобактерії не завжди мають форму класичної палички (Akbar & Farni, 2012). Вчені, які займались дослідженням змін морфології бактерій, стверджують, що в бактеріальних паличках форма залежить від активності двох біохімічних реакцій (сайтів), які відбуваються на термінальних стадіях синтезу пептидоглікану при розмноженні бактерій. Одна ділянка відповідає за подовження бічної стінки, а інша – за утворення перегородки (Alaadini & Day, 1999). Ці дві ділянки конкурують одна з одною таким чином, що бокова стінка не розширюється

під час утворення перегородки та навпаки (Satta et al., 1994). Таким чином, фактична форма бактерій визначається балансом між двома конкуруючими реакціями. Правильний баланс призводить до утворення нормальних паличок. Аномальна поширеність ділянки для подовження бічної стінки призводить до утворення довгих паличок або ниток, тоді як поширеність ділянки для утворення перегородки призводить до утворення коків (Akbar & Farni, 2012).

Дослідження за допомогою методу електронної мікроскопії дало нам змогу розглянути способи розмноження мікобактерій дослідних культур. Так, ми виявили три різних способи розмноження мікобактеріальних клітин в наших зразках: бінарний поділ, асиметричне ділення та брунькування.

Бінарним поділом розмножувались паличкоподібні та овалоподібні форми. Такий спосіб розмноження в літературі згадується як характерний саме для паличкоподібних бактерій. Виникнення овалоподібних, яйцевидних морфологічних форм пов'язується, ймовірніше всього, з деформацією паличок внаслідок дії стресу (дефіцит азоту, тривале зберігання культури, голодування) (Young et al., 2005; Farnia et al., 2010; Shleeva et al., 2011). Такі яйцеподібні форми накопичувались під час культивування *M. smegmatis* в умовах дефіциту поживних речовин в дослідках Anuchin et al. (2009). Автори вважали, що ці клітини є спеціалізованими «недіючими» формами з тривалим часом життя, а їх фенотип є «некультивованим», обумовленим втратою здатності утворювати колонії на стандартних твердих середовищах. З результатів наших досліджень видно, що овалоподібні форми не є результатом деформації інших морфологічних форм, а утворюються з собі подібних.

Симетричний бінарний поділ є відмінною рисою паличкоподібних бактерій, за якого утворюються дві дочірні клітини однакового розміру (Vijaya et al., 2014).

Процес ділення клітин у мікобактерій нагадує такий у більшості грампозитивних бактерій. Доцентрова інвагінація плазматичної мембрани

супроводжується утворенням поперечної перегородки, яка розщеплюється з утворенням полюсів двох нових клітин (Velayati & Farnia, 2012).

У наших дослідженнях після бінарного ділення паличкоподібних та овалоподібних форм спостерігали V-подібне розташування клітин. Інші дослідники повідомляють, що таке розташування клітин серед мікобактерій зустрічаються не так часто (Dahl, 2004; Farnia et al. 2010).

V-подібне розташування бактерій викликається клацаючими (snapping) рухами після поділу (Krulwich & Pate, 1971). Такий поділ був вперше описаний Kurth (1898). По завершенні ділення одна або обидві дочірні клітини раптово повертаються, зближуючись дистальними кінцями та залишаючись при цьому прикріпленими до невеликої ділянки на проксимальних кінцях (Akbar & Farni, 2012). Клацаючий поділ клітин був описаний для інших видів бактерій і не вважається артефактом підготовки зразка. Це явище спостерігалось для мікобактерій, таких як *M. leprae* і *M. vaccae*, а також для *Nocardia asteroides*, *Actinomyces israelii* і *A. crystallopoietes*. Як і *M. tuberculosis*, *A. israelii* і *A. crystallopoietes* є членами класу мікробів *Actinobacteria*, для яких механізм клацання був запропонований в якості можливого таксономічного інструменту. Раніше опубліковане СЕМ-зображення показує, що клітини *M. tuberculosis* штаму H37Ra також можуть зазнавати клацаючого руху після поділу (Dahl, 2004).

Можливий механізм snapping-поділу був описаний раніше. Бактерії, здатні до цього типу поділу, містять двошарові клітинні стінки, що складаються з внутрішнього та зовнішнього шарів. Подвійну структуру клітинної стінки чітко видно під час ділення клітин *M. avium* і *M. tuberculosis*, при цьому внутрішній шар бере участь у формуванні поперечної стінки перегородки, в той час як зовнішній шар клітинної стінки залишається недоторканим як міст між дочірніми клітинами. Відповідно до цього, раніше описаний механізм під час утворення перегородки: плазматична мембрана та внутрішня клітинна стінка ростуть усередину, зовнішній шар клітинної стінки залишається неушкодженим. По завершенні формування поперечної

перегородки, внутрішній шар може продовжувати рости і, таким чином, чинити тиск на зовнішній шар клітинної стінки. Зовнішній шар згодом спочатку розривається на одній стороні клітини, а дві дочірні клітини згинаються на тій стороні, де зовнішній шар ще не пошкоджений, утворюючи «V-подібну форму». У результаті дві утворені дочірні клітини можуть розміщуватись паралельно одна одній, при цьому залишаючись з'єднаними на одному кінці. Розірваний зовнішній шар залишає на поверхні клітини рубець, який вказує на колишнє місце утворення перегородки (Dahl, 2004).

За спостереженнями вчених, під впливом зовнішніх факторів мікобактерії можуть змінювати не тільки свою морфологію, але і тип поділу клітин. Олдрідж та ін. показали, що у клональній популяції мікобактерій може існувати детермінована неоднорідність, яка виникає в результаті незвичного розмноження клітин (Velayati & Farnia, 2012). Фенотипна гетерогенність мікробів має кореляцію з толерантністю до стресових умов, таких як виснаження поживних речовин (Nyka, 1974). Незвичайні цикли поділу клітин були співвіднесені зі стійкістю до ліків *M. tuberculosis* (Farnia et al., 2010). Більше 40% від загальної популяції клітин високорезистентних штамів мали розгалужуючийся, брунькуючийся або асиметричний тип поділу. Крім того, передбачається, що існує кореляція між незвичайним типом поділу клітин у *M. tuberculosis* і його здатністю зберігатися в стані спокою, а короткі клітини можуть бути залучені до стрес-стратегії виживання цього патогену.

Зазвичай, паличкоподібні бактерії ростуть уздовж своєї поздовжньої осі до критичного розміру, після чого вони діляться на дві однакові дочірні клітини шляхом розподілу на дві частини. Тому в багатьох паличкоподібних бактерій поділ клітин ділиться на дві стадії процесу: 1 – подовження материнських клітин; 2 – поділ подовжених материнських клітин на дві рівні клітини. При цьому симетричному способі поділу дочірні клітини мають

однаковий розмір. Однак мікобактерії можуть ділитися асиметрично, що призводить до утворення дочірніх клітин нерівного розміру (Atlas, 2017).

Асиметричним вважається будь-який поділ з відхиленням у положенні перегородки від середини клітини більше, ніж на 10 %, в результаті чого й утворюються коротка та довга клітини. Такий поділ може відбуватись або завдяки розміщенню перегородки в асиметричному положенні з подальшим звуженням і поділом, або через симетричне розміщення перегородки з подальшим диференціальним полярним зростанням (Vijaya et al., 2014).

Найбільш ранні спостереження асиметричного ділення клітин у видів *Mycobacterium* почалися з роботи Brieger & Fell (1945) по життєвому циклу *Mycobacterium avium*. Вони описали зростання *M. avium* на екстракті курячих ембріонів в такий спосіб: протягом перших 24 годин бактерія розтягується, утворюючи нитку, яка в кілька разів перевищує її первісну довжину; це відбувається багаторазово, щоб сформувати зв'язку з 20–30 ниток, які на другий або третій день розпадаються на короткі стрижні, які продовжують повільно розмножуватись за звичайного поділу. McCarthy (1971, 1974, 1976, 1978) також описав, що коли *M. avium* невеликого розміру поміщають в середовище, що містить пальмітинову кислоту, їх клітини будуть подовжуватись, утворюючи довгі нитки. Ці філаменти потім діляться на велику кількість клітин коккобактеріальної форми (Atlas, 2017).

Описаний вище механізм поділу, з утворенням ниткоподібних форм з яких пізніше утворюються палички, дуже схожий з тим, який ми спостерігали в своїх дослідах. Асиметричне ділення мікобактерій спостерігали й інші дослідники: Vijaya et al. (2014) – для *Mycobacterium smegmatis* і *M. xenopi*; Dahl (2004) – для *M. tuberculosis*; Joyce et al. (2012); Santi et al. (2013); Singh et al. (2013) – для *M. bovis* BCG.

Такі дослідження наштовхують вчених на думку, що послідовне та відтворюване збереження низької частки клітин, що зазнають асиметричного поділу, можуть бути ознакою того, що генерація коротких клітин є невід'ємною, регульованою, фізіологічно важливою ознакою в популяції

мікобактерій. Існує висока ймовірність того, що гетерогенна субпопуляція, утворена сильно відхиленням асиметричним поділом бактерій, може відіграти роль в їх виживанні за різних стресових умовах як всередині, так і поза господарем (Vijay et al., 2014).

Деякі дослідники (Gumpert and Taubeneck, 1983; Allan et al., 2009) стверджують, що клітини L-форм здатні ділитися з допомогою процесу, схожого на бінарний поділ, навіть якщо вони не мають клітинної стінки та оточені тільки цитоплазматичною мембраною. За даними, опублікованими Марковою (L-форми *Mycobacterium bovis* BCG), розмноження L-форм супроводжується послідовним розширенням великих материнських клітин та порушенням цілісності їх мембран, що веде за собою вивільнення багатьох дрібних елементарних тіл і гранул.

Проте, в зразках, які ми досліджували, хоча L-форми і представляли собою великі клітини з зернистістю всередині, при детальному їх розгляді за допомогою РЕМ, ми не побачили розривання цих форм з вивільненням зернистого вмісту, як описано вище. Розмноження за допомогою бінарного поділу нами також не спостерігалось. Натомість, зафіксований нами процес розмноження L-форми був дуже схожий на брунькування. На кінцях бактеріальних L-форм реєструвались брунькоподібні утворення, з яких згодом утворювались нові CWD-клітини.

Розмноження брунькуванням вже було описано раніше для мікобактерій в роботах різних авторів (Chauhan et al., 2006; Atlas, 2017). Механізм брунькування схожий на той, який ми спостерігали під час скануючої електронної мікроскопії L-форм, описаний в роботі Цинзерлінга та Агапова (2017). За розмноження мікобактерій брунькуванням, бруньки утворюються частіше на кінці клітини або на бічній поверхні. Спочатку з'являється маленький горбок, який збільшується, округляється, потім відділяється або, залишаючись сполученим з материнською клітиною, розвивається далі. Бруньки, часто витягуючись в довжину, перетворюються в паличкоподібні гілки. Важко в таких випадках встановити, що вважати брунькою, а що –

гілкою, оскільки і брунькування, і розгалуження представляють по суті один і той же процес. Різниця полягає лише в тому, що за цього розгалуженні гілки не відокремлюються і не можуть існувати самостійно. Надалі горбок збільшується в розмірах і відгалужується від материнської клітини у вигляді утворення коккоподібної форми. Весь цикл розмноження та відтворення продовжується приблизно 7–9 діб.

Вже описана багатьма авторами (Дяченко et al., 2009; Яворська & Сибірна, 2009; Лысенко et al., 2011; Ткаченко, 2017) висока мінливість мікобактерій, їх культуральних, тинкторіальних властивостей та морфології ще раз підтверджується в нашому досліді стосовно біохімічної активності цих мікроорганізмів. Отримані результати досліджень переконливо свідчать про неймовірну пластичність ферментативних систем *M. bovis*, що може розглядатись як механізм пристосування до змін середовища існування бактерій.

Вважається, що *M. bovis* (на відміну від *M. tuberculosis*) не мають помітної активності нітратредуктази (Bonicke et al., 1970; Fritz, 2002), деякі дослідники у своїх роботах висловлюють думку, що *M. bovis* BCG (вакцинний штам) використовує нітрати як ключове джерело живлення, підтримуючи бактеріальний метаболізм у легенях, печінці та нирках через відновлення нітрату до нітриту. Автори стверджують, що нітрат може забезпечити енергію для бактеріального метаболізму навіть у анаеробному середовищі (Philippot & Nøjberg, 1999; Fritz, 2002). Крім того, аналіз наявності ферменту нітратредуктази широко використовують в лабораторній практиці в якості альтернативного методу виявлення резистентності нітратредуктазно-позитивних штамів мікобактерій до протитуберкульозних препаратів, таких як ізоніазид, рифампіцин, етамбутол, офлоксацин, стрептоміцин та деякі ін. Штам вважається стійким, якщо він володіє нітратредуктазною активністю (Fonseca et al., 2012; Angeby et al., 2002; Montoro et al., 2005; Martin et al., 2005; Lemus, 2006).

Виходячи з цього вважаємо, що зміни, які відбулись з ферментативними системами дисоціативних форм *M. bovis* відображають процеси перелаштування обмінних реакцій всередині бактеріальної клітини, які відбулись за період багаточисельних пересівів через живильне середовище та направлені на забезпечення живлення мікроорганізмів за рахунок енергії, отриманої шляхом редукції нітратів.

Нами були відмічені зміни ферментативної активності після пасажування через організм морських свинок. У культурах, отриманих з органів, відмічали зниження нітратредуктазної активності (було характерно для культур вирощених за $3,0 \pm 0,5$ °C) та здатності до гідролізу ТВІН-80. Особливо цікаво те, що після пасажування через живий організм *M. bovis* у бактерій підвищилась активність ферментів дегідрогенази та каталази. Це багатофункціональні гемозалежні ферменти (Bertrand et al., 2004), які беруть активну участь у окисно-відновних процесах антиоксидантного захисту мікробної клітини (Kondratjuk & Sybirna, 2008).

У літературних джерелах іноземних авторів повідомлено, що каталаза сприяє здатності *M. tuberculosis* виживати в контамінованих тканинах господаря, що було підтверджено лабораторними експериментами на мишах і морських свинках (Li et al., 1998). У роботі Manca et al. (1998) досліджували каталазну та пероксидазну активність лабораторних, клінічних та рекомбінантних штамів *M. tuberculosis*, їх виміряли як внутрішньоклітинно (в моноцитах людини), так і в живильному середовищі. Результати досліджень вказаних авторів, свідчать про те, що в штамів, в яких була присутня навіть мінімальна активність каталази, виживало значно більше бактерій (85%) за впливу екзогенного H_2O_2 . Автори припускають, що стійкість мікобактерії до окисних метаболітів може бути важливим механізмом виживання в фагоцитах господаря. Згідно деяких тверджень, активність каталази та пероксидази виступає як фактор вірулентності мікобактерій. Наприклад, додавання екзогенної каталази *in vitro* під час інфікування мишачих

макрофагів атиповими мікобактеріями, такими як *M. avium* показало, що виживання мікобактерій посилюється.

Також деякі автори зазначають, що активність синтезу ендогенної каталази та здатність до розщеплення перекису водню також пов'язана за стійкістю до протитуберкульозних препаратів (тубазиду, фтівазиду, ізоніазиду та інших). Мікобактерії туберкульозу, стійкі до даних препаратів, мають різко знижену або відсутню активність цих ферментів (Manca et al., 1998; Kondratjuk & Sybirna, 2008).

Отже, ми вважаємо, що пасажування через організм тварин призвело до активізації механізмів адаптації бактерій та підвищення активності окисно-відновних ферментів *M. bovis* для забезпечення виживання всередині макроорганізму як відповідь на зміни умов існування.

Аналізуючи результати, які ми отримали в досліді з визначення ферментативної активності та врахувавши дані з літературних джерел, можна зробити наступні висновки:

- у дисоціативних форм зі збільшенням кількості пересівів субкультур знижується активність дегідрогенази, каталази, пероксидази та підвищується активність нітратредуктази;

- мікобактерії, одержані за низьких плюсових температур, проявляють вищу каталазну активність та здатність до гідролізу ТВІН-80, порівняно з культурами, які виростили за $37,0 \pm 0,5$ °C;

- *M. bovis* культур, отриманих після пасажування через організм морських свинок, знижують нітратредуктазну активність, здатність до гідролізу ТВІН-80 і підвищують активність дегідрогенази та каталази.

- в культурах, які отримали з фільтратів, активність дегідрогенази, нітратредуктази та здатність до гідролізу ТВІН-80 нижча, ніж в не фільтрованих;

- досліджувані мікобактерії можна віднести до атипових через їх здатність утворювати колонії на простих живильних середовищах. Після проходження через бактеріальні фільтри мікобактерій дослідних культур, їх

рідше виділяли на простих живильних середовищах та дуже рідко на середовищі з додаванням натру саліциловокислого.

Отримані результати є доказом того, що ферментативні системи *M. bovis* надзвичайно гнучкі та перелаштовуються залежно від змін умов існування мікобактерій та факторів, які впливають на мікроорганізми. Разом з тим, необхідно зазначити, що типізація мікобактерій враховуючи лише біохімічну активність (без застосування інших методів, таких як мікроскопія, генетичні методи аналізу та ін.), є неможливою через нестабільність ферментативних систем. З огляду на зниження біохімічної активності в культурах, отриманих з фільтратів, поганій ріст на МПА, МПБ та на середовищі з додаванням натру саліцилату, можна судити про часткову зміну їх ферментативних систем. Як відомо з літературних джерел (Ткаченко, 2017), патогенні штами *M. bovis* володіють низькою біохімічною активністю, не культивуються на МПА, МПБ і в присутності натру саліциловокислого. Якщо врахувати зазначені дані, аналізуючи зміни ферментативної активності мікобактерій після фільтрації, можна відмітити, що мікобактерії культур, які були отримані з фільтратів мають біохімічну активність більш подібну до патогенних *M. bovis*, аніж до вихідних дисоціативних (атипових). Таким чином, можна припустити, що фільтративні форми беруть участь у процесі реверсії атипових штамів мікобактерій у патогенні.

У розділі 4 використано матеріали з відповідним посиланням на такі наукові джерела зі списку літератури: [1-4, 6, 7, 12, 13, 16, 19, 21, 22, 29, 33, 34, 36- 38, 41, 45, 46, 48, 51, 54, 55, 59, 61, 72, 73, 79- 81, 83, 88, 89, 91, 92, 97, 106, 107, 109-111, 113- 118, 120, 124, 128- 132, 134, 139, 140, 143-145, 149, 151-54, 156, 160-164, 173, 174, 176, 177, 179, 184, 199, 215, 224, 237].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено дані щодо можливості існування в популяції мікобактерій ультрадрібних форм, здатних проходити через бактеріальні фільтри з діаметром пор 0,05 і 0,1 мкм, та здатності цих форм за висіву на живильне середовище утворювати культури. З'ясовано, що на якість культивування фільтривних форм впливає температура. Встановлено, що мікобактерії здатні залишатись життєздатними протягом довготривалого періоду зберігання *in vitro* в умовах температури $3,0 \pm 0,5$ °C за нестачі поживних речовин та зниженого рівня кисню.

1 Багаторічно збережені штами *M. bovis* культурально характеризувались колоніями кольору слонової кістки та білого кольору, які розташовувались у вигляді скупчень або нальоту по лінії посіву, рідше поодинокі, за розміром колонії були дрібні та середні, з S і R поверхнею. За тинкторіальними властивостями культури до зберігання містили як кислотостійкі, так і некислотостійкі елементи. Реєструвались різні морфологічні форми: паличко-, коко-, ниткоподібні форми та зерна.

2 Тривале зберігання (9-12 років) культур за $3,0 \pm 0,5$ °C без пересівів призвело до зміни морфології мікобактерій. Виявляли такі морфологічні форми: паличко-, коко- та ниткоподібні, L-форми, зерна (елементарні тільця). Мікобактерії багатьох культур втратили кислотостійкість. За висіву на свіже живильне середовище мікобактерії 66,66% культур виявились життєздатними та утворили субкультури. Мікобактерії, які зберігались на середовищах з рН 6,5, за пересіву на свіже живильне середовище виявились більш життєздатними та утворили на 28,0 % більше субкультур.

3 Культуральні властивості отриманих субкультур відмінні від вихідних – вони стали пігментуючими, деякі проявили здатність рости за низьких плюсових температур ($3,0 \pm 0,5$ °C). Мікобактерії субкультур не володіли кислотостійкістю.

4 Довготривале зберігання культур мікобактерій (9-12 років) сприяло зниженню вірулентності *M. bovis*, яка не відновилась після трьох прямих пасажів через організм морських свинок.

5 Здатність до генерування фільтривних форм відрізнялась в різних групах культур: дисоціативних форм – 75,0% для фільтрів з діаметром пор 0,1 мкм і 25,0% – для 0,05 мкм; багаторічно витриманих (9–12 років) та молодих (2-тижневих) – по 50,0%; отриманих після першого пасажу через організм морських свинок – 100 % та після другого пасажу – 75,0 % – фільтри з діаметром пор обох розмірів (0,05 і 0,1 мкм).

6 Мікобактерії досліджуваних культур мали виражену ферментативну активність (каталазну, дегідрогеназну – через 24 год., нітратредуктазну, здатність гідролізувати ТВІН-80), що свідчить про їх приналежність до атипових форм мікобактерій. Після пасажування через організм морських свинок *M. bovis* знижують нітратредуктазну активність, здатність до гідролізу ТВІН-80 і підвищують активність дегідрогенази та каталази. Ферментативна активність (дегідрогеназна, нітратредуктазна, здатність до гідролізу ТВІН-80) у мікобактерій культур, отриманих з фільтратів, знизилась.

7 Розроблено методику ідентифікації фільтривних форм мікобактерій. Суть методики полягає у виділенні культур із суспензії мікобактерій, пропущеної через бактеріальний фільтр, на щільному яєчному живильному середовищі Мордовського (рН 6,7) за температурного режиму культивування $3,0 \pm 0,5$ °С.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Викладені у роботі дані щодо температурного режиму культивування фільтривних форм пропонуються використовувати під час проведення діагностичних досліджень в лабораторіях ветеринарної медицини та науково-дослідних установах.

2. Відомості про існування фільтривних форм, які генеруються в популяції мікобактерій, слід враховувати під час планування заходів діагностики, боротьби та профілактики туберкульозу в господарствах. Не можна застосовувати фільтрування через бактеріальні фільтри в якості методу стерилізації рідин контамінованих мікобактеріями, адже така стерилізація не буде ефективною.

3. Результати досліджень можуть бути використані для написання відповідних розділів підручників, посібників, у навчальному процесі під час підготовки здобувачів вищої освіти за спеціальністю «Ветеринарна медицина» при викладанні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин».

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Akbar, A., & Farni, P. (2012). Morphological Characterization of *Mycobacterium tuberculosis*. *Understanding Tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacilli*. doi:10.5772/29644
2. Alaedini, A., & Day, R. A. (1999). Identification of Two Penicillin-Binding Multienzyme Complexes in *Haemophilus influenzae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264 (1), 191–195. doi:10.1006/bbrc.1999.1509
3. Allan, E. J., Hoischen, C., & Gumpert, J. (2009). Chapter 1 Bacterial L-Forms. *Advances in Applied Microbiology*, 1–39. doi:10.1016/s0065-2164(09)01201-5
4. Andreu, N., & Gibert, I. (2008). Cell population heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Tuberculosis*, 88(6), 553–559. doi:10.1016/j.tube.2008.03.005
5. Angeby, K. A. K., Klintz, L., & Hoffner, S. E. (2002). Rapid and Inexpensive Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a Nitrate Reductase Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 553–555. doi:10.1128/jcm.40.2.553-555.2002.
6. Anuchin, A. M., Mulyukin, A. L., Suzina, N. E., Duda, V. I., El-Registan, G. I., & Kaprelyants, A. S. (2009). Dormant forms of *Mycobacterium smegmatis* with distinct morphology. *Microbiology*, 155(4), 1071–1079. doi:10.1099/mic.0.023028-0
7. Atlas of *Mycobacterium Tuberculosis*. Elsevier; 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/c2015-0-00386-0>
8. Bentrup, K. H. zu, & Russell, D. G. (2001). Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends in Microbiology*, 9(12), 597–605. doi:10.1016/s0966-842x(01)02238-7

9. Beran, V., Havelkova, M., Kaustova, J., Dvorska, L., & Pavlik, I. (2012). Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Veterinární Medicína*, 51(No. 7), 365–389. doi:10.17221/5557-vetmed
10. Berezovski, B. & Golanov, V. (1981). Mycobacterium tuberculosis L forms in patients with abacillary lung caverns. *Problemy Tuberkuleza*, 6, 22–25, ISSN: 0032-953
11. Berezovskii, B. & Salobai, R. (1988). The role of L variants of Mycobacteria in the development and clinical course of recurrences of pulmonary tuberculosis. *Problemy Tuberkuleza*, 4, 32–35, ISSN:0032-9533
12. Bertrand, T., Eady, N. A. J., Jones, J. N., Bodiguel, J., Jesmin, N., J.M., R., & B., B. (2004). Crystal structure of Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase. doi:10.2210/pdb1sj2/pdb.
13. Bloch, H. (1950). Studies on the virulence of tubercle bacilli. *Journal of Experimental Medicine*, 92(6), 507–526. doi:10.1084/jem.92.6.507
14. Bloom, B. R., & Murray, C. J. L. (1992). Tuberculosis: Commentary on a Reemergent Killer. *Science*, 257(5073), 1055–1064. doi:10.1126/science.257.5073.1055
15. Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, 2(10), 907–916. doi:10.1038/ni1001-907
16. Bonicke, R., Juhasz, S. E., & Diemer, U. (1970). Studies on the nitrate reductase activity of mycobacteria in the presence of fatty acids and related compounds. *American Review of Respiratory Disease*, 102, 507–515
17. Boris, M., Teubner, D., & Shinefield, H. (1969). Bacterial Interference with L-Forms¹. *Journal of Bacteriology*, 100(2), 791–795. doi:10.1128/jb.100.2.791-795.1969
18. Boshoff, H. I. M., & Barry, C. E. (2005). Tuberculosis — metabolism and respiration in the absence of growth. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 70–80. doi:10.1038/nrmicro1065

19. Brieger, E. M., & Fell, H. B. (1945). Warm-stage observations on the initial development of the avian tubercle bacillus cultivated in embryo extract. *Epidemiology & Infection*, 44(3), 158-169.
20. Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., ... Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 3684–3689. doi:10.1073/pnas.052548299
21. Bucsan, A. N., Mehra, S., Khader, S. A., & Kaushal, D. (2019). The current state of animal models and genomic approaches towards identifying and validating molecular determinants of *Mycobacterium tuberculosis* infection and tuberculosis disease. *Pathogens and Disease*, 77(4). doi:10.1093/femspd/ftz037
22. Calmette, A. (1923). L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et chez les animaux. *Journal of the American Medical Association*, 80 (17), 1265. <https://doi.org/10.1001/jama.1923.02640440079032>
23. Canci, A., Minozzi, S., & Borgognini Tarli, S. M. (1996). New Evidence of Tuberculous Spondylitis from Neolithic Liguria (Italy). *International Journal of Osteoarchaeology* 6 (5), 497–501. doi:10.1002/(sici)1099-1212(199612)6:5<497::aid-oa291>3.0.co;2-o
24. Cantwell, A. R. (1982). Variably Acid-fast Bacteria in a Rare Case of Coexistent Malignant Lymphoma and Cutaneous Sarcoid-like Granulomas. *International Journal of Dermatology*, 21(2), 99–106. doi:10.1111/j.1365-4362.1982.tb00512.x
25. Cardona, P. J. (2000). Evolution of Granulomas in Lungs of Mice Infected Aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scandinavian Journal of Immunology*, 52(2), 156. doi:10.1046/j.1365-3083.2000.00763.x
26. Cardona, P.-J. (2004). On the nature of *Mycobacterium tuberculosis*-latent bacilli. *European Respiratory Journal*, 24(6), 1044–1051. doi:10.1183/09031936.04.00072604

27. Cardona, P.-J. (2009). A Dynamic Reinfection Hypothesis of Latent Tuberculosis Infection. *Infection*, 37(2), 80–86. doi:10.1007/s15010-008-8087-y
28. Cardona, P.-J., Gordillo, S., Díaz, J., Tapia, G., Amat, I., Pallarés, A., & Ausina, V. (2003). Widespread Bronchogenic Dissemination Makes DBA/2 Mice More Susceptible than C57BL/6 Mice to Experimental Aerosol Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 71(10), 5845–5854. doi:10.1128/iai.71.10.5845-5854.2003
29. Cardona, P.-J., Soto, C. Y., Martín, C., Giquel, B., Agustí, G., Guirado, E., ... Luquin, M. (2006). Neutral-red reaction is related to virulence and cell wall methyl-branched lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection*, 8(1), 183–190. doi:10.1016/j.micinf.2005.06.011
30. Carr, K. E. (1971). Applications of Scanning Electron Microscopy in Biology. *International Review of Cytology*, 183–255. doi:10.1016/s0074-7696(08)60048-0
31. Centkowski, P., Sawczuk-Chabin, J., Prochorec, M., & Warzocha, K. (2005). Hodgkin's lymphoma and tuberculosis coexistence in cervical lymph nodes. *Leukemia & Lymphoma*, 46 (3), 471–475. doi: 10.1080/10428190400019891
32. Chandrasekhar, S., & Ratnam, S. (1992). Studies on cell-wall deficient non-acid fast variants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Disease*, 73(5), 273–279. doi:10.1016/0962-8479(92)90132-4
33. Chauhan, A., Lofton, H., Maloney, E., Moore, J., Fol, M., Madiraju, M. V. V. S., & Rajagopalan, M. (2006). Interference of *Mycobacterium tuberculosis* cell division by Rv2719c, a cell wall hydrolase. *Molecular Microbiology*, 62(1), 132–147. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05333.x
34. Clark, S., Hall, Y., & Williams, A. (2014). Animal Models of Tuberculosis: Guinea Pigs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(5), a018572–a018572. doi:10.1101/cshperspect.a018572

35. Collins, J. D. (2006). Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. *Veterinary Microbiology*, 112(2-4), 369–381. doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.041
36. Converse, P. J., Eisenach, K. D., Theus, S. A., Nuernberger, E. L., Tyagi, S., Ly, L. H., ... Bishai, W. R. (2010). The Impact of Mouse Passaging of *Mycobacterium tuberculosis* Strains prior to Virulence Testing in the Mouse and Guinea Pig Aerosol Models. *PLoS ONE*, 5(4), e10289. doi:10.1371/journal.pone.0010289
37. Csillag, A. (1964). The Mycococcus Form of Mycobacteria. *Journal of General Microbiology*, 34(2), 341–352. doi:10.1099/00221287-34-2-341
38. Dahl, J. L. (2004). Electron microscopy analysis of *Mycobacterium tuberculosis* cell division. *FEMS Microbiology Letters*, 240(1), 15–20. doi:10.1016/j.femsle.2004.09.004
39. Dawson, K. L., Stevenson, M. A., Sinclair, J. A., & Bosson, M. A. (2014). Recurrent bovine tuberculosis in New Zealand cattle and deer herds, 2006–2010. *Epidemiology and Infection*, 142(10), 2065–2074. doi:10.1017/s0950268814000910
40. DeTurk, W. E., & Bernheim, F. (1958). Effects of ammonia, methylamine, and hydroxylamine on the adaptive assimilation of nitrite and nitrate by a mycobacterium. *Journal of Bacteriology*, 75(6), 691–696. doi:10.1128/jb.75.6.691-696.1958
41. Diard, M., & Hardt, W.-D. (2017). Evolution of bacterial virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(5), 679–697. doi:10.1093/femsre/fux023
42. Domingue, G. J., & Woody, H. B. (1997). Bacterial persistence and expression of disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(2), 320–344. doi:10.1128/cmr.10.2.320
43. Domingue, G.J. (2010). Demystifying pleomorphic forms in persistence and expression of disease: are they bacteria, and is peptidoglycan the solution? *Discov. Med.* 10, 234-246.

44. Dorozhkova, I., Karachunskii, M., Abdullaeva, E., Gamzaeva, N., & Kochetkova, E. (1989). Isolation of mycobacteria L forms as a prognostic criterion of recurrence and aggravation of tuberculosis in patients with extended residual tuberculous lesions of the lungs. *Problemy Tuberkuleza*, 3, 14–18, ISSN:0032-9533
45. Dubos, R. J., & Middlebrook, G. (1948). Cytochemical reaction of virulent tubercle bacilli. *American review of tuberculosis*, 58, 698.
46. Edson, N.L. 1951. The intermediary metabolism of the mycobacteria. *Bacteriol Rev.* 15:147-182
47. El-Zaatari, F., Naser, S., Markesich, D., Kalter, D., Engstand, L., & Graham, D. (1996). Identification of *Mycobacterium avium* complex in sarcoidosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (9), 2240–2245, ISSN: 0095-1137
48. Farnia, P., Masjedi, M. R., Merza, M. A., Tabarsi, P., Zhavnerko, G. K., Ibrahim, T. A., Kuan, H. O., Ghanavei, J., Ranjbar, R., Poleschuyk, N. N., Titov, L. P., Owlia, P., Kazampour, M., Setare, M., Sheikolslami, M., Migliori, G. B., Velayati, A. A. (2010). Growth and cell –division in extensive (XDR) and extremely drug resistany (XXDR) tuberculosis strains: transmission and atomic force observation. *Int. J. Clin. Exp. Med* . 3:320-326
49. Foddai, A., Elliott, C. T., & Grant, I. R. (2010). Rapid Assessment of the Viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Cells after Heat Treatment, Using an Optimized Phage Amplification Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), 1777–1782. doi:10.1128/aem.02625-09
50. Fodor, M., & Rogers, H. J. (1966). Antagonism between Vegetative Cells and L-Forms of *Bacillus licheniformis* Strain 6346. *Nature*, 211(5049), 658–659. doi:10.1038/211658a0
51. Fonseca, L. de S., Vieira, G. B. de O., Sobral, L. F., Ribeiro, E. O., & Marsico, A. G. (2012). Comparative evaluation under routine conditions of the nitrate reduction assay, the proportion assay and the MGIT 960 assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium*

- tuberculosis. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(1), 142–144. doi:10.1590/s0074-02762012000100021.
52. Fontes, A. (1910). Algumas considerações sobre a infecção tuberculosa e o seu respetivo virus. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2(1), 141–146. doi:10.1590/s0074-02761910000100010
53. Formicola, V., Milanesi, Q., & Scarsini, C. (1987). Evidence of spinal tuberculosis at the beginning of the fourth millennium BC from Arene Candide cave (Liguria, Italy). *American Journal of Physical Anthropology*, 72(1), 1–6. doi:10.1002/ajpa.1330720102
54. Fritz, C. (2002). Dependence of *Mycobacterium bovis* BCG on Anaerobic Nitrate Reductase for Persistence Is Tissue Specific. *Infection and Immunity*, 70(1), 286–291. doi:10.1128/iai.70.1.286-291.2002.
55. Ghosh, J., Larsson, P., Singh, B., Pettersson, B. M. F., Islam, N. M., Sarkar, S. N., & Kirsebom, L. A. (2009). Sporulation in mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(26), 10781–10786. doi:10.1073/pnas.0904104106
56. Good, M., & Duignan, A. (2011). An evaluation of the Irish Single Reactor Breakdown Protocol for 2005–2008 inclusive and its potential application as a monitor of tuberculin test performance. *Veterinary Microbiology*, 151(1-2), 85–90. doi:10.1016/j.vetmic.2011.02.029
57. Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Garnier, T., Brosch, R., Parkhill, J., Barrell, B., ... Hewinson, R. G. (2001). Genomics of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*, 81(1-2), 157–163. doi:10.1054/tube.2000.0269
58. Gotsulia, A. S., Zazharskyi, V. V., & Davydenko, P. O. (2018). Synthesis and antituberculosis activity of N¹-(2-(5-((theophylline-7'-yl) methyl)-4-R-4H-1, 2, 4-triazole-3-ylthio) acetyl) isonicotinohydrazides. *Запорожский медицинский журнал*, (20, № 4), 578-583.
59. Grosset, J., & Ji, B. (1998). Experimental Chemotherapy of Mycobacterial Diseases. *Mycobacteria*, 51–97. doi:10.1007/978-1-4615-7511-5_3

60. Guliang, H., & Tefu, L. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* L-forms. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 10(3-4). doi:10.3402/mehd.v10i3-4.7863.
61. Gumpert, J., & Taubeneck, U. (1983). Characteristic Properties and Biological Significance of Stable Protoplast Type L-Forms. *Protoplasts* 1983, 227–241. doi:10.1007/978-3-0348-6776-4_27
62. Hababou-Sala, I. (1928). A propos de la filtrabilité du bacille tuberculeux pour le tissu ganglionnaire. *C rend. Soc. Biol*, 99, 1215–1217.
63. Hardie, R.M., & Watson, J.M. (1992). *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. *Epidemiol Infect* 109: 23–33.
64. Hedgecock, L. W., & Costello, R. L. (1962). Utilization of nitrate by pathogenic and saprophytic mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 84(2), 195–205. doi:10.1128/jb.84.2.195-205.1962
65. Hermon-Taylor, J., & Bull, T. (2002). Crohn's disease caused by *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: a public health tragedy whose resolution is long overdue. *Journal of Medical Microbiology*, 51 (1), 3–6. doi:10.1099/0022-1317-51-1-3
66. Hershkovitz, I., Donoghue, H. D., Minnikin, D. E., Besra, G. S., Lee, O. Y.-C., Gernaey, A. M., ... Spigelman, M. (2008). Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS ONE*, 3(10), e3426. doi:10.1371/journal.pone.0003426
67. Hulten, K. (2000). In situ hybridization method for studies of cell wall deficient *M. paratuberculosis* in tissue samples. *Veterinary Microbiology*, 77(3-4), 513–518. doi:10.1016/s0378-1135(00)00336-9
68. Hulten, K., El-Zimaity, H., Karttunen, T., Almashhrawi, A., Schwartz, M., Graham, D., & El-Zaatari, F. (2001). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Crohn's diseased tissues by in situ hybridization. *American Journal of Gastroenterology*, 96 (5), 1529–1535. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.03751.x

69. Hulten, K., Karttunen, T., El-Zimaity, H. M., Naser, S., Collins, M., Graham, D., & El-Zaatari, F. A. (2000). Identification of cell wall deficient forms of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in paraffin embedded tissues from animals with Johne's disease by in situ hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 42(2), 185–195. doi:10.1016/s0167-7012(00)00185-8
70. Imaeda, T. (1975). Ultrastructure of L-phase variants isolated from a culture of *Mycobacterium phlei*. *Journal of Medical Microbiology*, 8(3), 389–395. doi:10.1099/00222615-8-3-389
71. Jasmer, R. M., Nahid, P., & Hopewell, P. C. (2002). Latent Tuberculosis Infection. *New England Journal of Medicine*, 347(23), 1860–1866. doi:10.1056/nejmcp021045
72. Jin, Q. (2002). Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Research*, 30(20), 4432–4441. doi:10.1093/nar/gkf566
73. Joyce, G., Williams, K. J., Robb, M., Noens, E., Tizzano, B., Shahrezaei, V., & Robertson, B. D. (2012). Cell Division Site Placement and Asymmetric Growth in *Mycobacteria*. *PLoS ONE*, 7(9), e44582. doi:10.1371/journal.pone.0044582
74. Judge, M., & Mattman, L. (1982). Cell wall-deficient mycobacteria in tuberculosis, sarcoidosis and leprosy. In: Cell wall deficient bacteria. Domingue GJ, ed., Addison – Wesley, 257–29, ISBN: 0-201-10162-9
75. Kappelman, J., Alçiçek, M. C., Kazancı, N., Schultz, M., Özkul, M., & Şen, Ş. (2008). First *Homo erectus* from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia. *American Journal of Physical Anthropology*, 135(1), 110–116. doi:10.1002/ajpa.20739
76. Karcz, J. (2009). Scanning electron microscopy in biology. Laboratory of Scanning Electron Microscopy. University of Silesia. Faculty of Biology and Environmental Protection.

77. Karolemeas, K., McKinley, T. J., Clifton-Hadley, R. S., Goodchild, A. V., Mitchell, A., Johnston, W. T., ... Wood, J. L. N. (2011). Recurrence of bovine tuberculosis breakdowns in Great Britain: Risk factors and prediction. *Preventive Veterinary Medicine*, 102(1), 22–29. doi:10.1016/j.prevetmed.2011.06.004
78. Kassish, V. Yu., Ukhovskiy, V. V., Sosnytskyi, O. I., Biben, I. A., Zazharsky, V. V., & Kassich, O. V. (2019). Ecologically safe method to control the epidemic situation on animal tuberculosis in Ukraine. *Світ медицини та біології*. 2(68), 220-225.
79. Khomenko, A. G. & Golyshevskaya, V. I. (1984). Filterable forms of *Mycobacterium tuberculosis*. *Z Erkrank Atm Org* 162, 147–154.
80. Khomenko, A. G. (1987). The variability of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with cavitary pulmonary tuberculosis in the course of chemotherapy. *Tubercle*, 68(4), 243–253. doi:10.1016/0041-3879(87)90064-x
81. Khomenko, A. G., Kochemasova, Z. N., Dykhno, M. M., Zemsanova, Z. N., & Dorozhkova, I. R. (1984). Significance of L-form transformation and reversion of the causative agent in the epidemiology of tuberculosis. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 3, 9–14
82. Khomenko, A., Karachunskii, M., Dorozhkova, I., Chukanov, V., & Balta, I. (1980). L transformation of the mycobacterial population in the process of treating patients with newly detected destructive pulmonary tuberculosis. *Problemy Tuberkuleza*, 2, 18–23, ISSN:0032-9533
83. Klemm, E. J., Gkrania-Klotsas, E., Hadfield, J., Forbester, J. L., Harris, S. R., Hale, C., ... Kingsley, R. A. (2016). Emergence of host-adapted *Salmonella Enteritidis* through rapid evolution in an immunocompromised host. *Nature Microbiology*, 1(3). doi:10.1038/nmicrobiol.2015.23
84. Klieneberger-Nobel, E. (1951). Filterable forms of bacteria. *Bacteriological Reviews*, 15(2), 77–103. doi:10.1128/membr.15.2.77-103.1951

85. Koch, A. L. (2003). Cell Wall-Deficient (CWD) Bacterial Pathogens: Could Amylotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Be Due to One? *Critical Reviews in Microbiology*, 29(3), 215–221. doi:10.1080/713610449
86. Kochemasova, Z., Kudriavtsev, A., Dykhno, M., & Kassirskaia, D. (1970). Isolation of Lforms of mycobacteria from pathological material of tuberculosis patients. *Problemy Tuberkuleza*, 48, (12), 63–65, ISSN: 0032-953
87. Kochemasova, Z.; Dykhno, M.; Kassirskaia, N. & Bakalova, D. (1975). L-forms in the urine of patients with renal tuberculosis. *Problemy Tuberkuleza*, 4, 68–70, ISSN: 0032-953
88. Kondratyuk, N., & Sybirna, R. (2008). Використання і модифікування біохімічних тестів для підтвердження приналежності виділених культур до мікобактерій туберкульозу. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (47), 70-73.
89. Krulwich, T. A., & Pate, J. L. (1971). Ultrastructural Explanation for Snapping Postfission Movements in *Arthrobacter crystallopoietes*. *Journal of Bacteriology*, 105(1), 408–412. doi:10.1128/jb.105.1.408-412.1971
90. Kuo, J. (Ed.). (2007). *Electron microscopy: methods and protocols* (Vol. 369). Springer Science & Business Media.
91. Kurth, H. (1898). Ueber die Diagnose des Diphtheriebacillus unter Berücksichtigung abweichender Culturformen desselben. *Zeitschrift Für Hygiene Und Infektionskrankheiten*, 28(1), 409–438. doi:10.1007/bf02285379
92. Lemus, D. (2006). Nitrate reductase assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: simple and inexpensive method for low-resource laboratories. *Journal of Medical Microbiology*, 55(7), 861–863. doi:10.1099/jmm.0.46540-0.
93. Li, Z., Kelley, C., Collins, F., Rouse, D., & Morris, S. (1998). Expression of *katG* in *Mycobacterium tuberculosis* Is Associated with Its Growth and

- Persistence in Mice and Guinea Pigs. *Journal of Infectious Diseases*, 177(4), 1030–1035. doi:10.1086/515254.
94. Lysenko, A. P., Vlasenko, V. V., Broxmeyer, L., Lemish, A. P., Novik, T. P., Paliy, G. K., Paliy, I. G., & Sorokoumov, V. P. (2013). The tuberculins contain unknown forms capable to restore viability of cell wall deficient *Mycobacteria* and acid-fast cells. *Biomedical and biosocial anthropology*, 21, 116–123
95. Ma, X. L. (1995). Experimental studies on pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* L-form. *Chinese Journal of Microecology*, 01, 110–115.
96. Malm, S., Tiffert, Y., Micklinghoff, J., Schultze, S., Joost, I., Weber, I., & Bange, F.-C. (2009). The roles of the nitrate reductase NarGHJI, the nitrite reductase NirBD and the response regulator GlnR in nitrate assimilation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, 155(4), 1332–1339. doi:10.1099/mic.0.023275-0
97. Manca, C., Paul, S., Barry, C. E., Freedman, V. H., & Kaplan, A. (1998). *Mycobacterium tuberculosis* Catalase and Peroxidase Activities and Resistance to Oxidative Killing in Human Monocytes In Vitro. *Infection and immunity*, Vol. 67, № 1, 74–79.
98. Markova, N. (2009). Hidden face of tuberculosis. *Bioscience Hypotheses*, 2(6), 441–442. doi:10.1016/j.bihy.2009.04.014
99. Markova, N. (2012). Cell Wall Deficiency in *Mycobacteria*: Latency and Persistence. *Understanding Tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacilli*. doi:10.5772/30919
100. Markova, N., Michailova, L., Jourdanova, M., Kussovski, V., Valcheva, V., Mokrousov, I., & Radoucheva, T. (2008). Exhibition of persistent and drug-tolerant L-form habit of *Mycobacterium tuberculosis* during infection in rats. *Open Life Sciences*, 3(4), 407–416. doi:10.2478/s11535-008-0032-7
101. Markova, N., Michailova, L., Kussovski, V., & Jourdanova, M. (2008). Formation of persisting cell wall deficient forms of

- Mycobacterium bovis* BCG during interaction with peritoneal macrophages in guinea pigs. *Electronic Journal of Biology (eJBio)* 4:1-10
102. Markova, N., Michailova, L., Vesselinova, A., Kussovski, V., Radoucheva, T., Nikolova, S., & Paskaleva, I. (1997). Cell Wall-deficient Forms (L-Forms) of *Listeria monocytogenes* in Experimentally Infected Rats. *Zentralblatt Für Bakteriologie*, 286(1), 46–55. doi:10.1016/s0934-8840(97)80074-6
 103. Markova, N., Slavchev, G., & Michailova, L. (2012). Filterable forms and L-forms of *Mycobacterium bovis* BCG. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(6), 759–764. doi:10.4161/hv.19698
 104. Markova, N., Slavchev, G., & Michailova, L. (2012). Unique biological properties of *Mycobacterium tuberculosis* L-form variants: impact for survival under stress. *International microbiology* 15:61-68. DOI: 10.2436/20.1501.01.159
 105. Markova, N., Slavchev, G., & Michailova, L. (2015). Presence of mycobacterial L-forms in human blood: Challenge of BCG vaccination. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(5), 1192–1200. doi:10.1080/21645515.2015.1016682
 106. Martin, A., Palomino, J. C., & Portaels, F. (2005). Rapid Detection of Ofloxacin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by Two Low-Cost Colorimetric Methods: Resazurin and Nitrate Reductase Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1612–1616. doi:10.1128/jcm.43.4.1612-1616.2005.
 107. Mattman, L. H. (1970). Cell wall-deficient forms of mycobacteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 174(2 Unusual Isola), 852–861. doi:10.1111/j.1749-6632.1970.tb45604.x
 108. Mattman, L. H. (2000). Cell Wall Deficient Forms. doi:10.1201/b16928..

109. Mattman, L.; Tunstall, L.; Mathews, W. & Gordon D. (1960). L-variation in mycobacteria. *American Review of Respiratory Diseases*, Vol. 82, No2, (August 1960), 202-211, ISSN: 0003-0805
110. Mattman, L.H. (2001). *Cell wall Deficient Forms. Stealth Pathogens*, 3rd ed., CRC Press Inc, ISBN: 0-8493-8767 Boca Raton, FL, USA
111. McClelland, M., Sanderson, K. E., Clifton, S. W., Latreille, P., Porwollik, S., Sabo, A., ... Wilson, R. K. (2004). Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nature Genetics*, 36(12), 1268–1274. doi:10.1038/ng1470
112. Merkal, R.S., Rhoades, K.R., Gallagher, J.E., & Ritchie, A.E. (1973). Scanning electron microscopy of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 108:381-387
113. Michailova, L., Kussovsky, V., Radoucheva, T., Jordanova, M., & Markova, N. (2007). Persistence of *Staphylococcus aureus* L-form during experimental lung infection in rats. *FEMS Microbiology Letters*, 268(1), 88–97. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00567.x
114. Michailova, L., Markova, N., Radoucheva, T., Stoitsova, S., Kussovski, V., & Jordanova, M. (2000). Atypical behaviour and survival of *Streptococcus pyogenes* L forms during intraperitoneal infection in rats. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 28(1), 55–65. doi:10.1111/j.1574-695x.2000.tb01457.x
115. Michailova, L., Stoitsova, S., Markova, N., Kussovski, V., Jordanova, M., & Dimova, I. (2000). Interaction of alveolar macrophages with *Staphylococcus aureus* and induction of microbial L-forms during infection in rats. *International Journal of Medical Microbiology*, 290(3), 259–267. doi:10.1016/s1438-4221(00)80123-x
116. Michailova, L.; Kussovski, V.; Radoucheva, T.; Jordanova, M.; Berger, W.; Rinder, H. & Markova, N. (2005). Morphological variability and cell wall deficiency in *Mycobacterium tuberculosis* ‘heteroresistant’

- strains. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*, Vol. 9, No8, 907–914, ISSN: 1027-3719
117. Mihailova, L., Markova, N., Radoucheva, T., Veljanov, D., & Radoevska, S. (1993). Cell interactions of *Listeria monocytogenes* L forms and peritoneal exudative cells in rats. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(11), 1014–1021. doi:10.1139/m93-154
118. Montoro, E., Lemus, D., Echemendia, M., Martin, A., Portaels, F., & Palomino, J. C. (2005). Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(4), 500–505. doi:10.1093/jac/dki023.
119. Munoz-Elias, E. J., & McKinney, J. D. (2006). Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cellular Microbiology*, 8(1), 10–22. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00648.x
120. Nadya, M., & Georgi, S. (2014). Genetic and morphologic variations during L-form conversion in *Mycobacterium tuberculosis*. *African Journal of Microbiology Research*, 8(9), 850–855. doi:10.5897/ajmr2013.6321
121. Nerlich, A. G., Haas, C. J., Zink, A., Szeimies, U., & Hagedorn, H. G. (1997). Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *The Lancet*, 350(9088), 1404. doi:10.1016/s0140-6736(05)65185-9
122. Niederweis, M. (2008). Nutrient acquisition by mycobacteria. *Microbiology*, 154(3), 679–692. doi:10.1099/mic.0.2007/012872-0
123. Niemann, S., Richter, E., & Rusch-Gerdes, S., (1999). Differentiation among Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Molecular and Biochemical Features: Evidence for Two Pyrazinamide-Susceptible Subtypes of *M. bovis*. *Journal of clinical microbiology*, 38,(1), 152–157
124. Nyka, W. (1974). Studies on the Effect of Starvation on *Mycobacteria*. *Infection and Immunity*, 9(5), 843–850. doi:10.1128/iai.9.5.843-850.1974

125. O'Reilly, L. M., & Daborn, C. J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. *Tubercle and Lung Disease*, 76, 1–46. doi:10.1016/0962-8479(95)90591-x
126. Onwuamaegbu, M., Belcher, R., & Soare, C. (2005). Cell Wall-Deficient Bacteria as a Cause of Infections: A Review of the Clinical Significance. *Journal of International Medical Research*, 33(1), 1–20. doi:10.1177/147323000503300101
127. Ortner, D. J., & Putschar, W. G. J. (1985). Identification of pathological conditions in human skeletal remains. *Smithsonian Contributions to Anthropology*, (28), 1–488. doi:10.5479/si.00810223.28.1
128. Parkhill, J., Dougan, G., James, K. D., Thomson, N. R., Pickard, D., Wain, J., ... Barrell, B. G. (2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*, 413(6858), 848–852. doi:10.1038/35101607
129. Parkhill, J., Wren, B. W., Thomson, N. R., Titball, R. W., Holden, M. T. G., Prentice, M. B., ... Barrell, B. G. (2001). Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*, 413(6855), 523–527. doi:10.1038/35097083
130. Parrish, N. M., Dick, J. D., & Bishai, W. R. (1998). Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology*, 6(3), 107–112. doi:10.1016/s0966-842x(98)01216-5
131. Philippot, L., & Højberg, O. (1999). Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1446(1-2), 1–23. doi:10.1016/s0167-4781(99)00072-x
132. Pierce, C. H., Dubos, R. J., & Schaefer, W. B. (1953). Multiplication and survival of tubercle bacilli in the organs of mice. *Journal of Experimental Medicine*, 97(2), 189–206. doi:10.1084/jem.97.2.189
133. Prozorovski, S., Kaz, & Kagan, G. (1981). L-forms of bacteria (mechanisms of formation, structure, role in pathology). *Medicine Publishing, Moscow*, ISBN: 50500-347,

134. Ramakrishnan, T., Murthy, P.S., & Gopinathan, K.P. (1972). Intermediary metabolism of mycobacteria. *Bacteriol Rev.* 36:65-108
135. Ratnam, S., & Chandrasekhar, S. (1976). The effect of gravitational forces on the viability of spheroplasts of mycobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 22(9), 1397–1399. doi:10.1139/m76-204
136. Rothschild, B. M., & Martin, L. D. (2011). Frequency of pathology in a large natural sample from Natural Trap Cave with special remarks on erosive disease in the Pleistocene. *Reumatismo*, 55(1). doi:10.4081/reumatismo.2003.58
137. Rothschild, B. M., Martin, L. D., Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G. K., Greenblatt, C., ... Brittain, D. (2001). Mycobacterium tuberculosis Complex DNA from an Extinct Bison Dated 17,000 Years before the Present. *Clinical Infectious Diseases*, 33(3), 305–311. doi:10.1086/321886
138. Salo, W. L., Aufderheide, A. C., Buikstra, J., & Holcomb, T. A. (1994). Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(6), 2091–2094. doi:10.1073/pnas.91.6.2091
139. Santi, I., Dhar, N., Bousbaine, D., Wakamoto, Y., & McKinney, J. D. (2013). Erratum: Single-cell dynamics of the chromosome replication and cell division cycles in mycobacteria. *Nature Communications*, 4(1). doi:10.1038/ncomms3913
140. Satta, G., Fontana, R., & Canepari, P. (1994). The Two-Competing Site (TCS) Model for Cell Shape Regulation in Bacteria: the Envelope as an Integration Point for the Regulatory Circuits of Essential Physiological Events. *Advances in Microbial Physiology Volume 36*, 181–245. doi:10.1016/s0065-2911(08)60180-0
141. Schwartz, D., Shafran, I., Romero, C., Piromalli, C., Biggerstaff, J., Naser, N., Chamberlin, W., & Naser, S. (2000). Use of short-term culture for identification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in tissue

- from Crohn's disease patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 6 (6), 303–307. doi:10.1046/j.1469-0691.2000.00093.x
142. Sechi, L. A., Manuela, M., Francesco, T., Amelia, L., Antonello, S., Giovanni, F., & Stefania, Z. (2001). Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Biopsy Specimens from Patients with Crohn's Disease Identified by In Situ Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (12), 4514–4517. doi:10.1128/jcm.39.12.4514-4517.2001
143. Segal, W., & Bloch, H. (1956). Biochemical differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* grown in vivo and in vitro. *Journal of Bacteriology*, 72(2), 132–141. doi:10.1128/jb.72.2.132-141.1956
144. Seshadri, R., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Nelson, K. E., Nelson, W. C., ... Heidelberg, J. F. (2003). Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), 5455–5460. doi:10.1073/pnas.0931379100
145. Shamim, A. (2012). Biochemical studies of nitrite reductase in *Mycobacterium* sp. Combichem Bioresource Center Organic Chemistry Division National Chemical Laboratory Pune, 288.
146. Shcherbyna, R., Parchenko, V., Safonov, A., Bushueva, I., Zazharskiy, V., Zazharskiy, V., ... & Borovik, I. (2018). Synthesis and research of the impact of new derivatives of 4-R-3 (morpholinomethyl)-4H-1, 2, 4-triazole-5-thiol on cultural attributes of pathogenic *M. bovis*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 9(2), 70-79.
147. Sheridan, M. (2011). Progress in tuberculosis eradication in Ireland. *Veterinary Microbiology*, 151(1-2), 160–169. doi:10.1016/j.vetmic.2011.02.040
148. Shleeva, M. O., Bagramyan, K., Kaprelyants, A. S., Young, M., Kell, D. B., Telkov, M. V., & Mukamolova, G. V. (2002). Formation and resuscitation of “non-culturable” cells of *Rhodococcus rhodochrous* and

- Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. *Microbiology*, 148(5), 1581–1591. doi:10.1099/00221287-148-5-1581
149. Shleeva, M. O., Kudykina, Y. K., Vostroknutova, G. N., Suzina, N. E., Mulyukin, A. L., & Kaprelyants, A. S. (2011). Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* are formed in response to gradual external acidification. *Tuberculosis*, 91(2), 146–154. doi:10.1016/j.tube.2010.12.006
150. Singh, B., Ghosh, J., Islam, N. M., Dasgupta, S., & Kirsebom, L. A. (2010). Growth, cell division and sporulation in mycobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98(2), 165–177. doi:10.1007/s10482-010-9446-0
151. Singh, B., Nitharwal, R. G., Ramesh, M., Pettersson, B. M. F., Kirsebom, L. A., & Dasgupta, S. (2013). Asymmetric growth and division in *Mycobacterium* spp.: compensatory mechanisms for non-medial septa. *Molecular Microbiology*, 88(1), 64–76. doi:10.1111/mmi.12169
152. Slavchev, G., Michailova, L., & Markova, N. (2013). Stress-induced L-forms of *Mycobacterium bovis*: a challenge to survivability. *New Microbiol* 2013; 36-:157-66; PMID:23686122
153. Slavchev, G., Michailova, L., & Markova, N. (2013). Stress-induced L-forms of *Mycobacterium bovis*: a challenge to survivability. *New microbiologica*, 36, 157–166.
154. Slavchev, G., Michailova, L., & Markova, N. (2016). L-form transformation phenomenon in *Mycobacterium tuberculosis* associated with drug tolerance to ethambutol. *International Journal of Mycobacteriology*, 5(4), 454–459. doi:10.1016/j.ijmyco.2016.06.011
155. Smeulders, M.J., Keer, J., Speight, R.A., & Williams, H.D. (1999). Adaptation of *mycobacterium smegmatis* to stationary phase. *J.Bacteriol.*181:270-283.
156. Smith, H. (1988). The development of studies on the determinants of bacterial pathogenicity. *Journal of Comparative Pathology*, 98(3), 253–273. doi:10.1016/0021-9975(88)90036-9

157. Sosnytsky, O. I. (2018). Фенотипові характеристики та антигенні властивості референтного штаму *M. avium* ІЕКВМ-УААН при довготривалому пасажуванні. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 6(2), 66-71.
158. Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Connell, N. D., Kreiswirth, B. N., Whittam, T. S., & Musser, J. M. (1997). Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(18), 9869–9874. doi:10.1073/pnas.94.18.9869
159. Stead, W. W., Eisenach, K. D., Cave, M. D., Beggs, M. L., Templeton, G. L., Thoen, C. O., & Bates, J. H. (1995). When Did *Mycobacterium tuberculosis* Infection First Occur in The New World?: An Important Question with Public Health Implications. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 151(4), 1267–1268. doi:10.1164/ajrccm/151.4.1267
160. Steenken, W. Jr. (1950). Dissociation of the tubercle bacillus; a review. *American review of tuberculosis*, 62, 22–33.
161. Steenken, W. Jr., & Gardner, L.U. (1946). History of H37 strain of tubercle bacillus. *American review of tuberculosis*, 54, 62–66.
162. Stewart-Tull, D. E. S. (1965). Occurrence of Dimorphic Forms of *Mycobacterium phlei*. *Nature*, 208(5010), 603–605. doi:10.1038/208603a0
163. Takahashi, S. (1979). L-phase growth of mycobacteria. Cell walldeficient form of mycobacteria. *Kekkaku*, 54 (2), 63–70, ISSN: 0022-9776
164. Takahashi, S. (1979). L-phase growth of mycobacteria. Consideration on the survival of tubercle bacillus in caseous. *Kekkaku*, 54 (4), 231–235, ISSN: 0022-9776.
165. Taylor-Robinson, D. (1983). *Cell wall-deficient bacteria – basic principles and clinical significance*: Edited by G. J. Domingue. 1982.

- Addison-Wesley Publishers Ltd, London. Pp. xi and 595. 16.45. *Journal of Medical Microbiology*, 16(3), 387–388. doi:10.1099/00222615-16-3-387a
166. Thacore, H., & Willett, H. P. (1966) The formation of spheroplasts of *Mycobacterium tuberculosis* in tissue cultures cells. *American Review of Respiratory Disease*, 93, 786–796.
167. Tkachenko, O. A., Useieva, N. H., Hlebeniuk, V. V., & Kulishenko, O. M. (2007). Biologichna aktyvnist epizootychnykh ta muzeynykh shtamiv *M. Bovis*. *Naukovyi visnyk Lvivskoho natsionalnoho universytetu veterynarnoi medytsyny ta biotekhnolohyi imeni SZ Hzhyskoho*, 9(3), 34.
168. Tkachenko, O., Bilan, M., Hlebeniuk, V., Kozak, N., Nedosekov, V., & Galatiuk, O. (2020). Dissociation of *Mycobacterium bovis*: Morphology, Biological Properties and Lipids. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 8(3). doi:10.17582/journal.aavs/2020/8.3.317.326
169. Tkachenko, O., Kozak, N., Bilan, M., Hlebeniuk, V., Alekseeva, N., Kovaleva, L., ... Galatiuk, O. (2021). The Effect of Long-Term Storage on *Mycobacterium bovis*. *Polish Journal of Microbiology*, 70(3). doi:10.33073/pjm-2021-031
170. Torkko P., Suutari M., Suomalainen S., Paulin L., Larsson L., & Katila M.-L. (1997). Separation among Species of *Mycobacterium terrae* Complex by Lipid Analyses: Comparison with Biochemical Tests and 16S rRNA Sequencing. *Journal of clinical microbiology*, Vol. 36, № 2, 499–505.
171. Traag, B. A., Driks, A., Stragier, P., Bitter, W., Broussard, G., Hatfull, G., & Losick, R. (2009). Do mycobacteria produce endospores? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(2), 878–881. doi:10.1073/pnas.0911299107
172. Tsybulkina, I. (1979). Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* and its L-forms from caverns and sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Problemy Tuberkuleza*, (11), 64–68, ISSN: 0032-953
173. Udou, T., Ogawa, M., & Mizuguchi, Y. (1982). Spheroplast formation of *Mycobacterium smegmatis* and morphological aspects of their reversion

- to the bacillary form. *Journal of Bacteriology*, 151(2), 1035–1039. doi:10.1128/jb.151.2.1035-1039.1982
174. Velayati, A. A., & Farnia, P. (2012). Division-cycle in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Mycobacteriology*, 1(3), 111–117. doi:10.1016/j.ijmyco.2012.08.003
175. Velayati, A. A., Farnia, P., Ibrahim, T. A., Haroun, R. Z., Kuan, H. O., Ghanavi, J., & Masjedi, M. R. (2009). Differences in Cell Wall Thickness between Resistant and Nonresistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis*: Using Transmission Electron Microscopy. *Chemotherapy*, 55(5), 303–307. doi:10.1159/000226425
176. Vera, H. D., & Rettger, L. F. (1940). Morphological variations of the tubercle bacillus and certain recently isolated soil acid fasts with emphasis on filterability. *J.Bacteriol.*39:659-687.
177. Vijay, S., Nagaraja, M., Sebastian, J., & Ajitkumar, P. (2014). Asymmetric cell division in *Mycobacterium tuberculosis* and its unique features. *Archives of Microbiology*, 196(3), 157–168. doi:10.1007/s00203-014-0953-7
178. Virtanen, S. (1960). A study of nitrate reduction by mycobacteria. The use of the nitrate reduction test in the identification of mycobacteria. *Acta Tuberc Scand Suppl*, 48, 1–119.
179. Vissa, V. D., & Brennan, P. J. (2001). *Genome Biology*, 2(8), reviews1023.1. doi:10.1186/gb-2001-2-8-reviews1023
180. Wayne, L. G., & Hayes, L. G. (1996). An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infection and Immunity*, 64(6), 2062–2069. doi:10.1128/iai.64.6.2062-2069.1996
181. Wayne, L. G., & Sramek, H. A. (1992). Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(1), 1–25. doi.org/10.1128%2Fcmr.5.1.1

182. Xalabarder, C. (1958). Electron microscopy of tubercle bacilli. *Excerpta Medica, Sect XV Chest Diseases, Vol. 11, No1 (October 1958), 467–473, ISSN: 0014-4320*
183. Xalabarder, C. (1963). The nature of so-called atypical mycobacteria. *Neumol Cir Torax, Vol.24, (July 1963), 259–274, ISSN: 0028-3746*
184. Young, M., Mukamolova, G.V., & Kaprelyants, A.S. (2005). Mycobacterial dormancy and its relation to persistence. In :parish T, editor. *Mycobacterial molecular biology. Norwich: Horizon Scientific Press: 265-320*
185. Zazharskyi, V. V., Davydenko, P. O., & Bigdan, O. A. (2020). Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of some 1,2,4-triazole derivatives with potential tuberculostatic and tuberculocidal ability in vitro. *Ukrainian Journal of Ecology, 10(6), 145–159. doi:10.15421/2020_274*
186. Zhang, Y. (2004). Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis. *Frontiers in Bioscience, 9(1-3), 1136. doi:10.2741/1291*
187. Zhu, M., Xie, P., & Zhang, Y. (2000). Detecting mycobacteria and their L-forms in peripheral blood from pulmonary tuberculosis patients by cultivation with hemolyzedcentrifugated blood in liquid medium. *The Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 23 (9), 556–558, ISSN: 10010939*
188. Zink, A., Haas, C. J., Reischl, U., Szeimies, U., & Nerlich, A. G. (2001). Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. *Journal of Medical Microbiology, 50(4), 355–366. doi:10.1099/0022-1317-50-4-355*
189. Асташова, Е.А. & Кадочкин, А.М. (1989). Особенности морфогенеза Л-форм микобактерий туберкулеза бычьего вид. *Ветеринария, 7, 31–34.*
190. Бібен, І.А., Сосницький, О.І., Зажарський, В.В., Сосницька, А.О. (2021). Біологічні властивості екологічних культур

- Mycobacterium vaccae*. Науково-технічний бюлетень державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин, 22 (1), 38 – 52
191. Бондарев, И. М., Гулевская, С. А., Немсадзе, М. Н., & Михайлов, И.М. (1976). Морфология начальных этапов L-трансформации микобактерий туберкулеза при сканирующей электронной микроскопии. Проблемы туберкулеза, 12, 55–61.
192. Власенко, В. В. (1998). Туберкулез в фокусе проблем современности. Винница: Наука, 35.
193. Галатюк, О. С., & Радзиховський, М. Л. (2013). Організація профілактичних та оздоровчих заходів при інфекційних хворобах тварин. Житомир: Рута.
194. Глебенюк, В. В. (2007). Особливості культивування *M. bovis* швидкорослого штаму за різних температур. Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини: Зб. наук. праць Харківської державної академії.–Харків, 53-57.
195. Глебенюк, В. В., & Теліженко, К. В. (2015). Видова належність мікобактерій, виділених від тварин Дніпропетровської області. Науково-технічний бюлетень Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету, 3 (1), 61-64.
196. Гольшевская, В. И. (2003). Роль ультрамелких форм микобактерий в патоморфозе туберкулеза. Пробл. туберкулеза, (3), 26-30.
197. Дж, Г., Ньюбери, Д., Эчлин, П., Джой, Д., Фиори, Ч., & Лифшин, Ф. (1984). Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ/Пер. с англ. В 2-х кн (Vol. 1). М.: Мир.
198. Дорожкова, И. Р., Попов, С. А., & Мартынова, Л. П. (2000). Руководство по культуральным методам выявления и идентификации микобактерий туберкулеза: Методические рекомендации. М., 2–50.

199. Дяченко, Г. М., Кравченко, Н. О., Ільїних, В. В., Дмитрук, О. М., & Головач, О. В. (2009). Адаптація та мінливість властивостей мікобактерій різних видів за впливу антибактеріальних препаратів. Сільськогосподарська мікробіологія.
200. Журило, О. А. (2010). Стандарти бактеріологічної діагностики туберкульозу в клінікодіагностичних лабораторіях. Київ: ВСВ Медицина.
201. Завгородній, А. І., Позмогова, С. А., & Гирка, М. А. (2012). Изучение культурально-морфологических и биохимических свойств изолированных от коров *M. paratuberculosis*. Ветеринарна медицина, (96), 110-112.
202. Завгородній, А. І., & Котляр, О. В. (2014). Вивчення культурально-морфологічних, біохімічних і біологічних властивостей атипівих мікобактерій, виділених від великої рогатої худоби в господарствах України. Ветеринарна медицина, (98), 124-127.
203. Завгородній, А. І., Палій, А. П., Загребельний, В. О., & Репін, М. В. (2012). Ультраструктурні зміни атипівих мікобактерій після дії Хлорантоїну. Ветеринарна медицина, (96), 107-110.
204. Завгородній, А. І., Палій, А. П., Стегній, Б. Т., & Калашник, М. В. (2014). Біологічні властивості L-форм мікобактерій, виділених із біоматеріалу. Ветеринарна медицина України, (11), 9-12.
205. Земскова, З. С., & Дорожкова, І. Р. (1984). Скрыто протекающая туберкулезная инфекция. Москва: Медицина, 222.
206. Ильина, Т. Б. (1980). Бактериологическая и биохимическая идентификация микобактерий. Методические рекомендации. МЗ РСФСР НИИ туберкулеза. Москва, 24.
207. Кассіч, В. Ю. (2004). Мінливість мікобактерій, епізоотологічний моніторинг, заходи і засоби боротьби з туберкульозом тварин в умовах радіаційного впливу. дис.... д-ра. вет. наук/В.Ю. Кассіч.–Харків.

208. Кассіч, В. Ю. (2013). Мікобактерії та їх диференціація. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина, (2), 109-115.
209. Кассіч, В. Ю., Левченко, А. Г., Івченко, В. Д., Кассіч, О. В., Головка, В. О., Кассич, В. Ю., ... & Головка, В. А. (2017). Алергічна діагностика зоонозів та засоби для її проведення. Вісник Сумського національного аграрного університету, Серія «Ветеринарна медицина», 1 (40), 164–169.
210. Катола, В. М. (2013). Об инфицировании крови в норме и при патологии. Бюллетень физиологии и патологии дыхания, (47), 111-116
211. Козак, Н. І. (2018). Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія *M. bovis* різних морфологічних форм за тривалого зберігання та низьких плюсових температур. Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету, (1-2), 36-41.
212. Кулішенко, О. М., Давиденко, П. О., Зажарський, В. В., & Ткаченко, О. А. (2015). Морфологія та культуральні властивості дисоціативних форм *Mycobacterium bovis*, культивованих за 3 та 37° С. Житомирський національний агроєкологічний університет, Т. 3, № 1(49), 88–94.
213. Лемиш, А.П. (2008). Ранняя диагностика туберкулеза крупного рогатого скота на основе выявления бактериологического маркера инфекции. Минск, 21.
214. Лысенко, А. П., Власенко, В. В., & Хунлян Ван (2015). Измененные формы микобактерий туберкулезаю. Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария, 3, 35–40
215. Лысенко, А. П., Власенко, І. Г., Власенко, В. В., & Бабийчук, Ю. В. (2011). Биохимические свойства бацylлярных и измененных форм микобактерий, выращенных на питательных средах. Науковий вісник

- Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького, 13(4-1 (50)).
216. Манченко, В. М., Троценко, З. Р., & Павленко, М. С. (1994). Настанова по діагностиці туберкульозу та ін. Київ, 39.
217. Мордовской Г.Г. (1988). Методы оценки ростовых свойств различных питательных сред для выращивания микобактерий туберкулёза. Проблемы и перспективы развития бактериологии во фтизиатрии: труды Московского НИИ туберкулёза. М., СХИ, 31-35.
218. Николаева, Г. М., & Дорожкова, И. Р. (1988). Морфология измененных форм микобактерий туберкулеза. Проблемы туберкулеза, (4), 57-59
219. Овдиенко, Н. П., Сыпин, В.Д., & Кассич, В. Ю. (2002). Мониторинг туберкулеза крупного рогатого скота в зоне радиоактивного загрязнения. Ветеринария, №3, 5–10.
220. Палий, А. П. (2013). Эпизоотологический мониторинг туберкулеза крупного рогатого скота и научно-экспериментальное обоснование разработки и применения средств дезинфекции.
221. Палій, А. П. (2018). Диференційна чутливість мікобактерій до хлорних дезінфектантів. Мікробіологічний журнал, (80, № 2), 104-116.
222. Палій, А. П. (2018). Ефективність антибактеріальної дії дезінфікуючого засобу «Екоцид С» щодо мікобактерій. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University, 8(1).
223. Палій, А. П., Стегній, Б. Т., Ведмідь, В. О., & Загребельний, В. О. (2016). Дезінфікуючі препарати при туберкульозі тварин. Вет. медицина: Міжвід. тематич. наук. зб, 172-176.
224. Сосницький, О. І., & Сосницька, А. О. (2017). Вивчення культуральних властивостей та імунобіологічної активності *Mycobacterium avium* ІЕКВМ-УААН. Науково-технічний бюлетень

- Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК, (5, № 2), 54-59.
225. Ткаченко О.А., Козак Н.І. (2019). Вплив середовища на частоту виділення фільтривних форм мікобактерій. Аграрний вісник Причорномор'я. Ветеринарні науки. Випуск 93 181-187.
226. Ткаченко, О. А. (2004). Швидкоростучі *M. bovis* у проблемі туберкульозу. Ветеринарна медицина України (7) 14-17.
227. Ткаченко, О. А. (2014). Біологічний цикл розвитку *Mycobacterium bovis*. Ветеринарна медицина України, (10), 15-20.
228. Ткаченко, О. А. (2017). Мінливість *Mycobacterium bovis*.
229. Ткаченко, О. А., Білан, М. В., Зажарський, В. В., & Ковальова, Л. О. (2010). Лабораторна діагностика туберкульозу тварин. Видавництво Свідлер, Дніпропетровськ.
230. Ткаченко, О. А., Білан, М. В., Зажарський, В. В., Усеєва, Н. Г., Ковальова, Л. О., Таран, Ю. М., & Давиденко, П. О. (2009). Закономірності поліморфізму та мінливості *M. bovis* швидкорослих та повільнорослих штамів. Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету, 1, 94–99.
231. Ткаченко, О. А., Білан, М. В., Зажарський, В. В., Усеєва, Н. Г., Ковальова, Л. О., Таран, Ю. М., & Давиденко, П. О. (2009). Поліморфізм та мінливість *M. bovis* швидкота повільнорослих штамів. Ветінформ, 3, 30-33.
232. Ткаченко, О. А., Білан, М. В., Місків, В. В., Давиденко, П. О., & Зажарський, В. В. (2010). Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: культуральні особливості за температур 3 та 37°C. Ветеринарна медицина України, № 3, 33-35.
233. Ткаченко, О. А., Білан, М. В., Шендрик, І. М., & Северина, Ю. В. (2017). Ознаки та властивості *Mycobacterium bovis* в аспекті штаммових відмінностей. Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету, (3), 109-114.

234. Ткаченко, О. А., Козак, Н. І., Білан, М. В., & Пономаренко, А. Р. (2019). Залежність біохімічної активності *Mycobacterium bovis* від пасажів та температури культивування. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 7(2), 84–89. doi:10.32819/2019.71015
235. Цинзерлинг, В. А., & Агапов, М. М. (2017). Современные подходы к морфологической диагностике туберкулеза. *Туберкулез и болезни легких*, 95(2), 7-12. doi:10.21292/2075-1230-2017-95-2-7-12
236. Шлеева, М. О., Салина, Е. Г., & Капрельянц, А. С. (2010). Покоящиеся формы микобактерий. *Микробиология*, 79(1), 3-15.
237. Яворська, Г. В., & Сибірняк, Р. І. (2009). морфолого-культуральні і фізіолого-біохімічні властивості атипичних мікобактерій. *Мікробіологічний журнал*, (71, № 4), 27-34.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Козак, Н. І.** (2018). Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія *M. bovis* різних морфологічних форм за тривалого зберігання та низьких плюсових температур. Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету, (1-2), 36-41.
2. Ткаченко, О. А., **Козак, Н. І.**, Білан, М. В., & Пономаренко, А. Р. (2019). Залежність біохімічної активності *Mycobacterium bovis* від пасажів та температури культивування. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 7(2), 84–89. doi:10.32819/2019.71015
3. Tkachenko, O., Bilan, M., Hlebeniuk, V., **Kozak, N.**, Nedosekov, V., & Galatiuk, O. (2020). Dissociation of *Mycobacterium bovis*: Morphology, Biological Properties and Lipids. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 8(3). doi:10.17582/journal.aavs/2020/8.3.317.
4. Tkachenko, O., **Kozak, N.**, Bilan, M., Hlebeniuk, V., Alekseeva, N., Kovaleva, L., ... Galatiuk, O. (2021). The Effect of Long-Term Storage on *Mycobacterium bovis*. *Polish Journal of Microbiology*, 70(3). doi:10.33073/pjm-2021-031.
5. Ткаченко О.А., **Козак Н.І.** (2019). Вплив середовища на частоту виділення фільтривних форм мікобактерій. Аграрний вісник Причорномор'я. Ветеринарні науки. Випуск 93 181-187.
6. **Козак Н. І.** Вплив температури культивування та віку культур *Mycobacterium bovis* на появу L-форм. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції «Вирішення сучасних проблем у ветеринарній медицині» Полтава, 14–15 лютого 2019 року, С 92 – 93.

ДОДАТОК Б

«Затверджено»
Проректор з наукової роботи
та інноваційної діяльності
Кондратюк В. М.
«_____» _____ 2021р.



АКТ

про провадження результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати кандидатської дисертаційної роботи аспірантки факультету ветеринарної медицини Дніпровського державного аграрно-економічного університету **Козак Наталії Ігорівни** за темою: «Фільтривні форми дисоціантів *Mycobacterium bovis*: ідентифікація та їх біологічні властивості», впроваджені у навчальний процес при викладанні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин», «Лабораторна діагностика заразних хвороб» та використовуються в наукових дослідженнях кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології факультету ветеринарної медицини, Національного університету біоресурсів і природокористування України, м. Київ. Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології, протокол № 7 від 20 серпня 2021 року.

Завідувач кафедри
канд. вет. наук., доцент



В. В. Мельник



ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з навчальної роботи
Сумського НАУ,
к.е.н., професор



В.М. Жмайлов
В.М. Жмайлов
Вересень 2021 р.

А К Т

про впровадження/використання результатів дисертаційної роботи у навчальний процес і науково-дослідну роботу

Даним актом стверджується, що матеріали дисертаційної роботи **Козак Наталія Ігорівна «Фільтривні форми дисоціантів *Mycobacterium bovis*: ідентифікація та їх біологічні властивості»**, представленої на здобуття наукового ступеня здобуття доктор філософії (211 «Ветеринарна медицина»), використовуються у навчальному процесі та науково-дослідній роботі кафедри ветсанекспертизи, мікробіології, зоогієни та безпеки і якості продуктів тваринництва.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри ветсанекспертизи, мікробіології, зоогієни та безпеки і якості продуктів тваринництва Сумського національного аграрного університету (протокол №1 від "27" серпня 2021 р.).

Декан факультету ветеринарної
медицини, д.вет.н., доцент

О.Л. Нечипоренко

Завідувачка кафедри ветсанекспертизи,
мікробіології, зоогієни
та безпеки і якості продуктів тваринництва
д.вет.н., професор

Т.І. Фотіна

ЗАТВЕРДЖУЮ

Ректор Подільського державного
аграрно-технічного університету,
професорВолодимир ІВАНИШИН
«16» 09 2021 р.

А К Т

**про впровадження/використання результатів дисертаційної роботи у
навчальний процес і науково-дослідну роботу**

Даним актом стверджується, що матеріали дисертаційної роботи **КОЗАК Наталії Ігорівни «Фільтривні форми дисоціантів *Mycobacterium bovis*: ідентифікація та їх біологічні властивості»**, представлені на здобуття наукового ступеня доктора філософії (спеціальність 211 «Ветеринарна медицина»), використовуються у навчальному процесі та науково-дослідній роботі кафедри інфекційних та інвазійних хвороб Подільського державного аграрно-технічного університету.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри інфекційних та інвазійних хвороб Подільського державного аграрно-технічного університету (протокол № 2 від «1» вересня 2021 р.).

Декан факультету ветеринарної
медицини і технологій
у тваринництві, доцент

Олег ЦВІГУН

Завідувач кафедри інфекційних
та інвазійних хвороб, доцент

Андрій МУШИНСЬКИЙ

ПОГОДЖЕНО

Проректор з науково-педагогічної роботи
Державного біотехнологічного університету

Олександр Олександрович, технічних наук, доцент



Алфьоров О. І.

10.09. 2021 р.

А К Т

про впровадження результатів дисертаційної роботи у
навчальний процес

Даним актом стверджується, що матеріали дисертаційної роботи **Козак Наталії Ігорівни «Фільтривні форми дисоціантів *Mycobacterium bovis*: ідентифікація та їх біологічні властивості»**, представлені на здобуття наукового ступеня доктора філософії (спеціальність 211 «Ветеринарна медицина»), використовуються у навчальному процесі при вивченні дисципліни «Епізоотологія та інфекційні хвороби» у розділі «Діагностика туберкульозу тварин», для підготовки здобувачів ступеня вищої освіти «Магістр» зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» на кафедрі епізоотології та мікробіології факультету ветеринарної медицини Державного біотехнологічного університету.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри епізоотології та мікробіології (протокол №1 від «2» вересня 2021 р.).

Декан факультету ветеринарної
медицини, професор

О. М. Бобрицька

Завідувач кафедри епізоотології
та мікробіології, доцент

Р. В. Северни

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи та
міжнародних зв'язків

Олексій ДАНЧУК

14 вересня 2021 р.



А К Т

про впровадженні/використання результатів дисертаційної
роботи у навчальний процес і науково-дослідну роботу

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи **КОЗАК Наталія Ігорівна** на тему «Фільтривні форми дисоціантів *Mycobacterium bovis*: ідентифікація та їх біологічні властивості», представленої на здобуття наукового ступеня здобуття доктор філософії (211 «Ветеринарна медицина»), впроваджено в навчальну програму для викладання дисциплін: «Епізоотологія та інфекційні хвороби», «Спеціальна епізоотологія» та «Ветеринарна мікробіологія».

Результати дисертаційної роботи Наталії Ігорівни щодо ефективної методики ідентифікації та біологічних властивостей (культуральних та тинкторіальних властивостей, морфології, ферментативної активності, вірулентності) мікобактерій та їх фільтривних форм використовуються під час читання лекцій, для проведення лабораторних занять, а також для виконання наукових досліджень на кафедрі епізоотології, паразитології та мікробіології ім. проф. В. Я. Атамася під час підготовки фахівців ОС «Магістр» за освітньою програмою «Ветеринарна медицина» в Одеському державному аграрному університеті.

Результати дисертаційної роботи обговорені та прийняті до впровадження на засіданні кафедри епізоотології, паразитології та мікробіології ім. проф. В. Я. Атамася (протокол № 2 від 14 вересня 2021 р.).

Завідувач кафедри епізоотології,
паразитології та мікробіології
ім. проф. В. Я. Атамася, професор

Ігор ПАНІКАР

Декан факультету ветеринарної
медицини, доцент

Катерина РОДІОНОВА



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Дніпровського державного
аграрно-економічного університету
Професор Грицан Ю.І.
2021р.



ВИСНОВОК З БІОЕТИЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ

Дніпровського державного аграрно-економічного університету щодо експериментальних досліджень, аспірантки Дніпровського державного аграрно-економічного університету Козак Наталії Ігорівни викладених у дисертаційній роботі на здобуття ступеня доктор філософії (PhD) «Фільтривні форми дисоціантів *Mycobacterium bovis*: ідентифікація та їх біологічні властивості»

Комісія з проведення біоетичної експертизи Дніпровського державного аграрно-економічного університету у складі Склярова Павла Миколайовича, доктора ветеринарних наук, професора кафедри хірургії і акушерства с.-г. тварин; Сосницького Олександра Івановича, доктора ветеринарних наук, професора кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин; Бібена Івана Андрійовича, кандидата ветеринарних наук, доцента кафедри паразитології та ветеринарно-санітарної експертизи, декана факультету ветеринарної медицини; Зажарського Володимира Володимировича, кандидата ветеринарних наук, доцента кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин; Чумака Владислава Олександровича, кандидата ветеринарних наук, доцента кафедри фізіології та біохімії с.-г. тварин розглянула експериментальні дослідження, проведені автором і представлені в дисертаційній роботі на тему: «Фільтривні форми дисоціантів *Mycobacterium bovis*: ідентифікація та їх біологічні властивості».

Висновок комісії: експериментальні дослідження аспіранки факультету ветеринарної медицини Дніпровського державного аграрно-економічного університету Козак Наталії Ігорівни «Фільтривні форми дисоціантів *Mycobacterium bovis*: ідентифікація та їх біологічні властивості» проведені на мінімальній кількості лабораторних тварин (морські свинки) з урахуванням «Загальноетичних принципів експериментів на тваринах», схвалених на Національному конгресі з біоетики (м. Київ, 2001 р.) із дотриманням міжнародних вимог Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) і відповідають закону України «Про Захист тварин від жорстокого поводження» (м. Київ, 2006 р.).

ДОДАТОК В





МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ

СЕРТИФІКАТ

учасника Міжнародної науково-практичної конференції
«АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ ЕПІЗООТОЛОГІЇ ТА ЗАРАЗНИХ ХВОРОБ ТВАРИН»
 присвячена 80-річчю від дня народження професора Атамася В. Я.

Козак Н. І.
 Дніпровський державний аграрно-економічний університет

Ректор



М.М.Брошков



Одеса, 24-26 жовтня 2019 року

ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД
«ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ ІНСТИТУТ ПРОФЕСІЙНОГО РОЗВИТКУ І ОСВІТИ»

ПОСВІДЧЕННЯ № 40504

Видано Козак Наталія Ігорівна
(прізвище, ім'я та по батькові)

посада (фах) аспірант
(перелік основних нормативно-правових актів з охорони праці)

місце роботи Дніпр. держ. аграрно-економіч. ун-т
(перелік основних нормативно-правових актів з охорони праці)

про те, що він(а) пройшов(ла) навчання і виявив(ла) потрібні знання
по 35-й спеціальності технічного міністерства з розробки банків медичних стерильних інструментів
(перелік основних нормативно-правових актів з охорони праці)

Підстава: протокол засідання комісії з перевірки знань
 від 08.10 2017 р. № 3/6

М. п. _____ (прізвище)
 Голова комісії З.В. Малин (підпис)

Відомості про періодичну перевірку знань

Посада (фах) _____
 виявив(ла) потрібні знання _____ (перелік основних нормативно-правових актів з охорони праці)

Підстава: протокол засідання комісії з перевірки знань
 від " " 20__ р. № _____

М. п. _____ (прізвище)
 Голова комісії _____ (підпис)

Відомості про періодичну перевірку знань

Посада (фах) _____
 виявив(ла) потрібні знання _____ (перелік основних нормативно-правових актів з охорони праці)

Підстава: протокол засідання комісії з перевірки знань
 від " " 20__ р. № _____

М. п. _____ (прізвище)
 Голова комісії _____ (підпис)

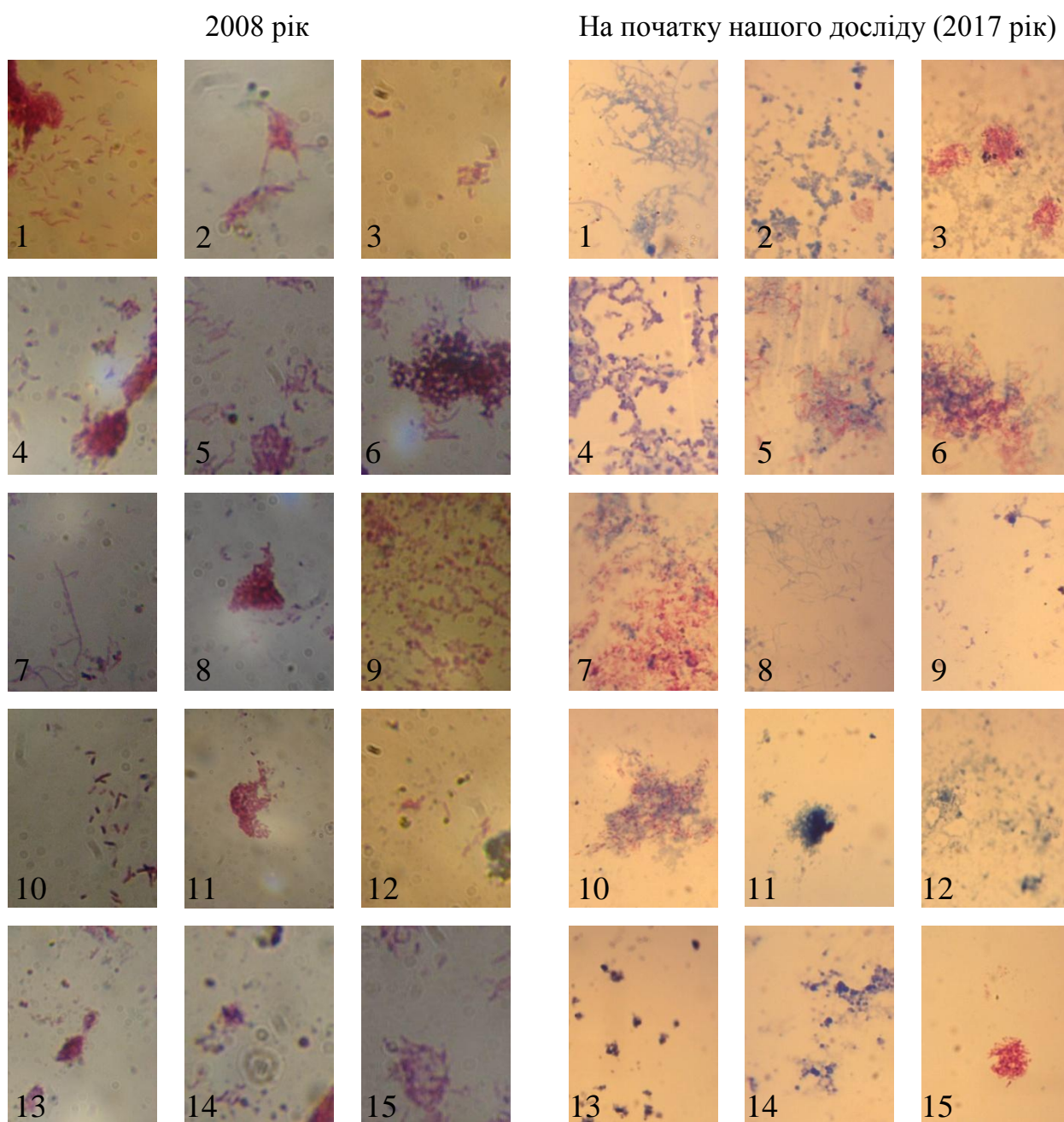


ДОДАТОК Г

Культуральні властивості мікобактерій культур, які багаторічно зберігались на середовищі з рН 6,5

Показник	№ пасажу								
	54	115	135	148	171	172	173	190	180
Тривалість зберігання (років)	10	10	11	11	10	10	10	9	9
Інтенсивність росту	Помірний	Слабкий	Слабкий	Пишний	Пишний	Помірний	Пишний	Слабкий	Слабкий
Характер росту	Скупчення колоній	Наліт	Росинчастий	Наліт	Наліт	Наліт	Наліт	Окремі колонії	Окремі колонії
Кількість колоній	Чисельні	Поодинокі	Поодинокі	Чисельні	Чисельні	Чисельні	Чисельні	Поодинокі	Поодинокі
Величина колоній	Дрібні	Середні	Дрібні	Дрібні	Дрібні	Дрібні	Дрібні	Дрібні	Середні
Форма колоній	Правильна	Правильна	Правильна	Правильна	Правильна	Правильна	Неправильна	Правильна	Неправильна
Поверхня колоній	S	S	R	R	R	R	R	S	R
Консистенція	Слизова	Крихка	Слизова	Слизова	Крихка	Крихка	Крихка	Крихка	В'язка
Пігмент (колір)	слонової кістки	слонової кістки	слонової кістки	слонової кістки	слонової кістки	слонової кістки	слонової кістки	Білі	Білі
Прозорість	Напівпрозорі	Матові	Напівпрозорі	Напівпрозорі	Матові	Матові	Матові	Матові	Матові
Емульгованість у фізрозчині	Задовільна	Задовільна	Задовільна	Задовільна	Задовільна	Задовільна	Слабка	Задовільна	Задовільна

ДОДАТОК Д



Морфологія мікобактерій вихідних культур: рН 6,5 пасажі: 1 – 54;
 2 – 115; 3 – 135; 4 – 148; 5 – 171; 6 – 172; 7 – 173; 8 – 190; 9 – 193;
 рН 6,7 пасажі: 10 – 126; 11 – 192; рН 7,1 пасажі: 12 – 141; 13 – 142; 14 –
 143; 15 – 174 (фарбування за Циль-Нільсеном, $\times 1600$).

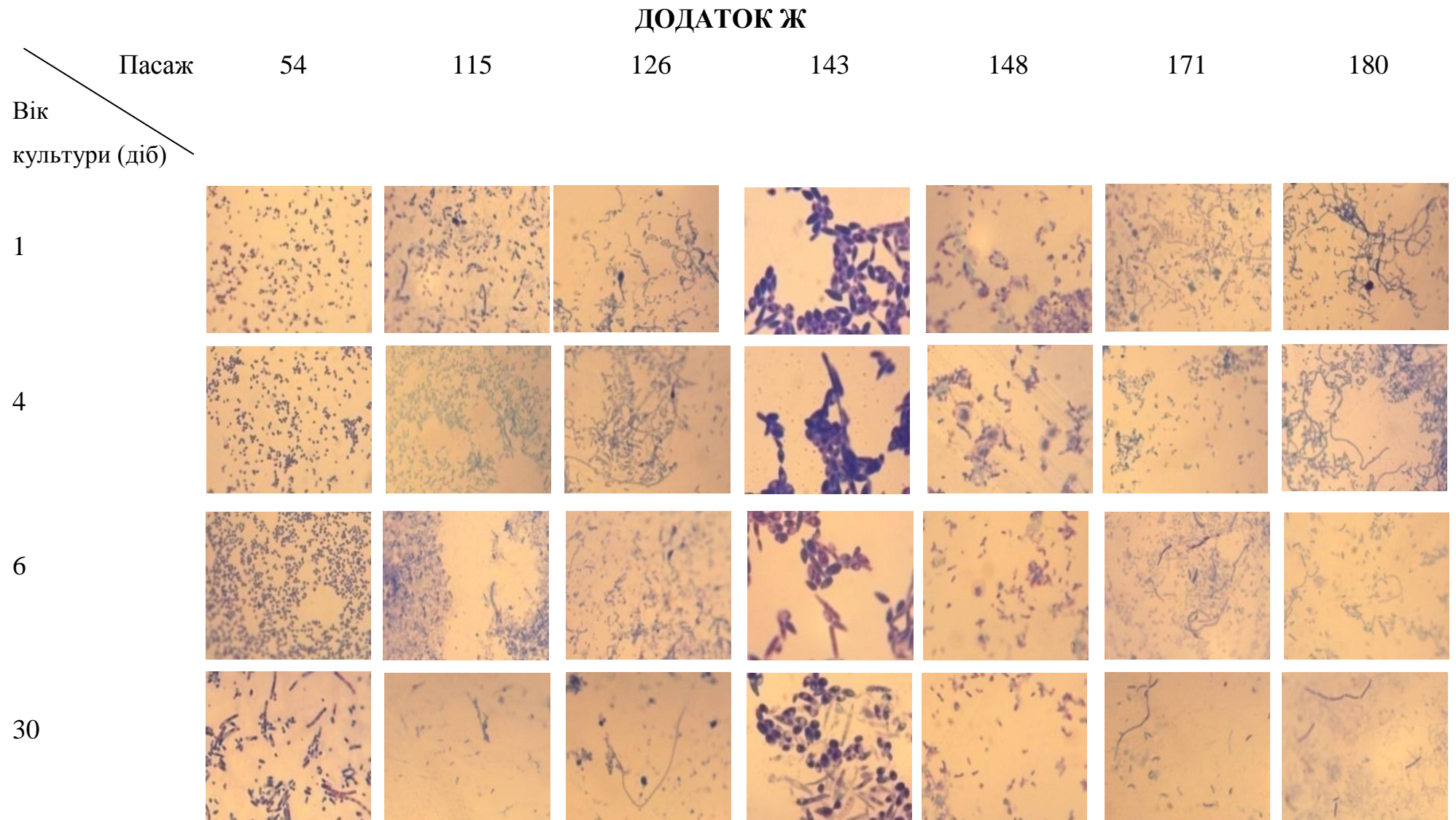


Рис 3.4. Морфологія субкультур отриманих за температури культивування $37,0 \pm 0,5$ °С
(фарбування за Циль-Нільсеном, $\times 1600$)

ДОДАТОК 3

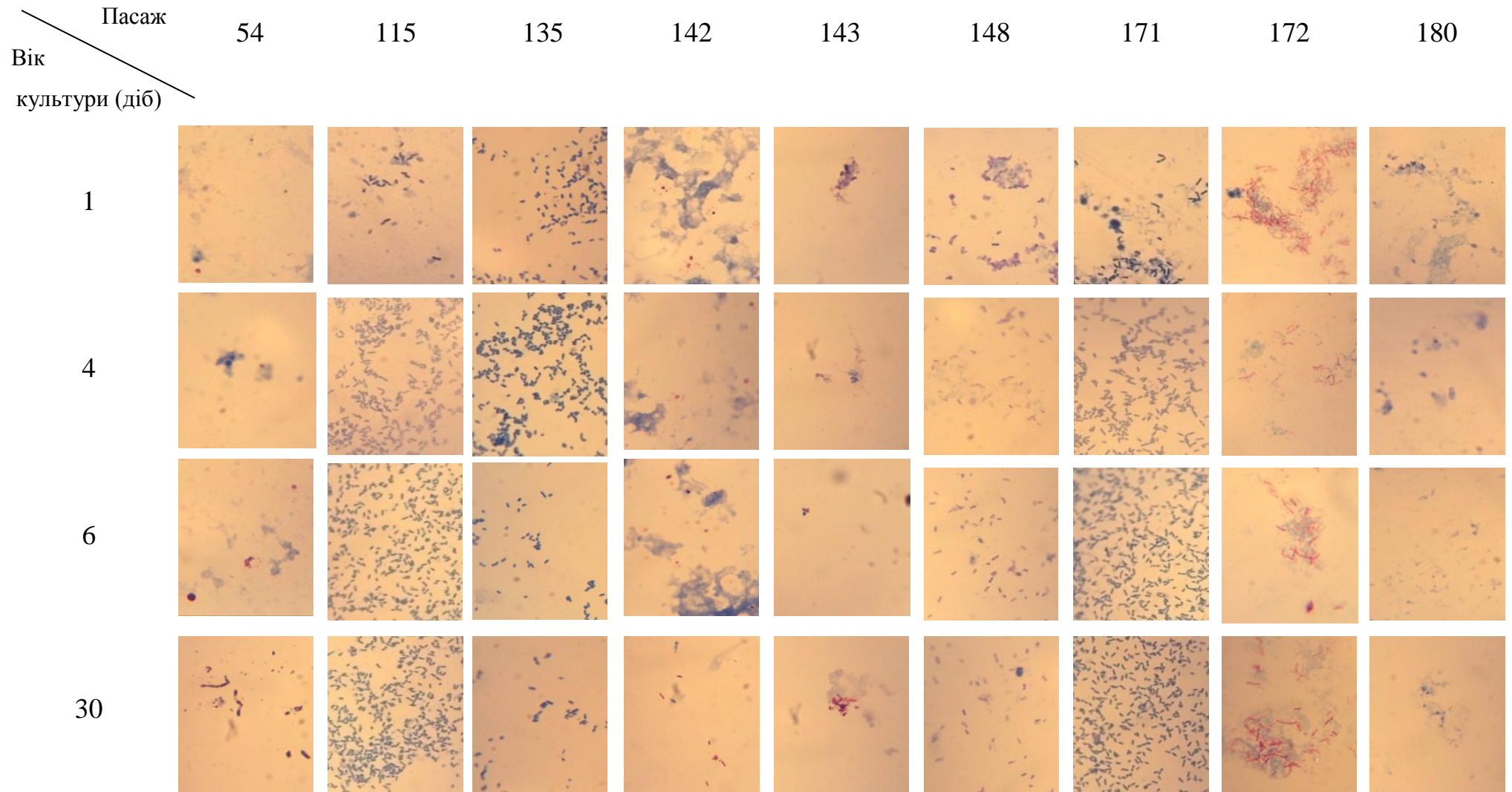


Рис 3.4. Морфологія субкультур отриманих за температури культивування $3,0 \pm 0,5$ °C (фарбування за Циль-Нільсеном, $\times 1600$)

ДОДАТОК И

Ферментативна активність *M. bovis* з фільтратів культур отриманих після одноразового пасажування через організм лабораторних тварин

№ пасажу	Фільтрат	Температура культивування (°C)	Каталаза	Дегідрогеназа (24 години)	Редукція нітратів	Гідроліз ТВІН-80	
						5 діб	10 діб
54	Ф-0,05	3,0±0,5	+++	-	±	-	-
	Ф-0,1	3,0±0,5	+++	±	-	-	-
115 (37,0±0,5 °C)	Ф-0,05	37,0±0,5	+++	±	-	-	+
		3,0±0,5	+++	-	-	-	-
	Ф-0,1	3,0±0,5	++	-	-	-	-
115 (3,0±0,5 °C)	Ф-0,05	3,0±0,5	+++	±	-	-	-
	Ф-0,1	3,0±0,5	++	-	+	-	-
135	Ф-0,1	37,0±0,5	+	-	-	-	-
	Ф-0,05	3,0±0,5	++	-	-	-	-
143	Ф-0,05	3,0±0,5	+++	-	-	-	-
	Ф-0,1	3,0±0,5	+++	±	+	-	-
171 (37,0±0,5 °C)	Ф-0,05	3,0±0,5	++	-	-	-	-
	Ф-0,1	3,0±0,5	+++	-	-	-	-
171 (3,0±0,5 °C)	Ф-0,05	3,0±0,5	+++	+	±	-	-
	Ф-0,1	3,0±0,5	+++	-	-	-	-
180	Ф-0,05	3,0±0,5	++	-	-	-	-
	Ф-0,1	3,0±0,5	+++	-	-	-	-

Примітки: «+» – позитивна реакція; «-» – негативна реакція; «±» – сумнівна реакція; активність каталази (інтенсивність утворення бульбашок): «+++» – значне, «++» – помірне, «+» – поодинокі; «-» – відсутнє.

ДОДАТОК К

Ріст культур *M. bovis* з фільтратів культур, отриманих після одноразового пасажування через організм лабораторних тварин на звичайних живильних середовищах і середовищі з додаванням натру саліциловокислого

№ пасажу	Фільтрат	Температура культивування (°C)	МПБ	МПА	Середовище з додаванням натру саліциловокислого
54	Ф-0,05	3,0±0,5	–	–	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	+	–	–
115 (37,0±0,5 °C)	Ф-0,05	37,0±0,5	+	+	+
		3,0±0,5	+	+	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	–	–	–
115 (3,0±0,5 °C)	Ф-0,05	3,0±0,5	–	–	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	–	–	–
135	Ф-0,1	37,0±0,5	–	+	–
	Ф-0,05	3,0±0,5	+	+	–
143	Ф-0,05	3,0±0,5	–	–	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	+	+	–
171 (37,0±0,5 °C)	Ф-0,05	3,0±0,5	–	–	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	–	+	–
171 (3,0±0,5 °C)	Ф-0,05	3,0±0,5	–	–	–
	Ф-0,1	3,0±0,5	–	–	–
180	Ф-0,05	3,0±0,5	+	–	–
	Ф-0,1,	3,0±0,5	–	–	–

Примітка: «+» – відмічено ріст культури; «–» – ріст культури відсутній.