

## Original researches

### Depending of biochemical activities *Mycobacterium bovis* on passages and temperature of cultivation

O. A. Tkachenko, N. I. Kozak, M.V. Bilan, A. R. Ponomarenko  
Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

Received: 03 March 2019  
Revised: 29 March 2019  
Accepted: 10 April 2019

Dnipro State Agrarian and Economic  
University, Sergii Efremov Str., 25, Dnipro,  
49600, Ukraine

Tel.: +38-056-744-81-32  
E-mail: iamnatykozak@gmail.com

**Cite this article:** Tkachenko, O. A., Kozak, N. I., Bilan, M. V., & Ponomarenko, A. R. (2019). Depending of biochemical activities *Mycobacterium bovis* on passages and temperature of cultivation. Theoretical and Applied Veterinary Medicine, 7(2), 84–89. doi: 10.32819/2019.71015

**Abstract.** The tuberculosis of cattle remains a serious problem both in Ukraine and for the whole world for many years. In spite of the fact that in science now much known about the agent of tuberculosis, some of the mechanisms through which mycobacteria manage to survive in the conditions of macroorganism and the environment have not been studied. Difficulties in overcoming of tuberculosis and mycobacteriosis can be connected with the incredible plasticity of life processes within the bacterial cells of mycobacteria. Understanding the enzymatic processes in the bacterial cell and their changes in response to the influence of external factors can lead to an understanding of the complex mechanism of adaptation and survival of mycobacteria, both in macroorganism and in the environment. The aim of our research was to determine the influence of the number passage of high-resistance strain *Mycobacterium bovis* in the organism of guinea pigs (*Cavia porcellus*), the temperature of cultivation (3°C; 37°C) on changes in biochemical activity. The ability of *M. bovis* and dissociative forms to grow on a nutrient medium with addition of sodium salicylate and on usual nutrient media (meat-peptone extract and meat-peptone agar) was investigated. The research was carried out using the high-virulence strain *M. bovis*, which was stored in the museum of the Laboratory of the Department of epizootology and infectious diseases of Dnipro State Agrarian and Economic University during 10–13 years, as well as dissociative forms 117-a, b, v, 118. The results of the research indicate the ability of mycobacteria to change biochemical activity under the influence of external factors. It has been established that the number of passages through a dense egg nutrient medium does not have a direct effect on the enzymatic activity of *M. bovis*. In dissociative forms with increasing number of inoculation of subcultures, the activity of nitrate reductase increases and peroxidase activity, dehydrogenase activity and catalase activity decrease. It has been found that low positive culturing temperature (3 °C) contributes to increase of catalase activity and hydrolysis ability of Tween-80. It has been determined that after passage through the organism of guinea pigs, *M. bovis* increase the activity of dehydrogenase and catalase and reduce nitrate reductase activity and hydrolysis ability of TWIN-80. So, the results presented in the article shows that the existence of mycobacteria is able to change the function of their own systems according to the changes of environment conditions..

**Keywords:** biochemical properties; catalase; peroxidase; dehydrogenase; hydrolysis of Tween-80; reduction of nitrates.

### Залежність біохімічної активності *Mycobacterium bovis* від пасажів і температури культивування

O. A. Ткаченко, Н. І. Козак, М. В. Білан, А. Р. Пономаренко

Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, Україна

**Анотація.** Проблема туберкульозу великої рогатої худоби, на сьогодні, залишається актуальною як в Україні, так і в усьому світі. Незважаючи на те, що існує багато відомостей про збудника туберкульозу, деякі механізми його виживання в умовах макроорганізму та зовнішнього середовища не вивчені. Складності подолання туберкульозу та мікобактеріозів пов'язані з неймовірною пластичністю життєвих процесів всередині клітин мікобактерій. Розуміння ферментативних процесів у клітині та їх змін у відповідь на вплив зовнішніх факторів може підштовхнути до розуміння складного механізму адаптації та виживання мікобактерій як в умовах макроорганізму, так і в навколишньому середовищі. Метою досліджень було встановити вплив кількості пасажів високовірulentного штаму *Mycobacterium bovis* через організм морських свинок (*Cavia porcellus*), температури культивування (3 °C; 37 °C) на зміни біохімічної активності. Досліджено здатність *M. bovis* та дисоціативних форм рости на живильному середовищі з додаванням натрію саліциловокислого та на звичайних живильних середовищах (м'ясо-пептонному бульйоні та м'ясо-пептонному агарі). Дослідження проводили з використанням високовірulentного штаму *M. bovis*, який зберігали в музеї лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпровського державного аграрно-економічного університету протягом 10–13 років, а також дисоціативних форм 117-а, б, в, 118. Результати досліджень свідчать про здатність мікобактерій змінювати біохімічну активність під впливом зовнішніх факторів. Встановлено, що кількість пасажів через щільне яєчне живильне середовище не має прямого впливу на ферментативну активність *M. bovis*. У дисоціативних форм зі збільшенням кількості пересівів субкультур підвищується активність нітратредуктази та знижується активність пероксидази, дегідрогенази та каталази. З'ясовано, що низька плюсова температура культивування (3 °C) сприяє підвищенню каталазної активності та здатності до гідролізу ТВІН-80. З'ясовано, що після пасажування через організм морських свинок, *M. bovis* підвищують активність дегідрогенази та каталази, знижують нітратредуктазну активність і здатність до гідролізу ТВІН-80. Отже згідно результатів наведених у статті, мікобактерії здатні змінювати функцію власних систем відповідно до змін умов середовища.

**Ключові слова:** біохімічні властивості; каталаза; пероксидаза; дегідрогеназа; гідроліз ТВІН-80; редукція нітратів.

## Вступ

Традиційно визначення біохімічних властивостей мікроорганізмів застосовують у мікробіологічній практиці для полегшення визначення належності бактерій до конкретного виду та їх типізації. Проте, літературні джерела стосовно біохімічної активності мікобактерій свідчать про різну оцінку ефективності методів та їх доцільності використання в лабораторній ідентифікації мікроорганізмів.

Відомо, що *M. bovis* володіють каталазою та пероксидазою активністю (Yavorska & Sybina, 2009). Стверджується, що *M. bovis* штаму у *Vallee* володіють ферментом каталазою, помірної активності (++) (Djachenko et al., 2009), тоді як згідно даних Kassich (2013) *M. bovis* не володіє каталазою активністю та здатністю до редукції нітратів і гідролізу Твін-80. У роботах Tkachenko (2017), де оцінювали біохімічну активність *M. bovis* та її дисоціативних форм, сверджується, що патогенний штам володіє слабкою біохімічною активністю, а саме, відсутністю каталази, пероксидази, нітратредуктази та слабкою дегідрогеназою активністю, тоді як дисоціативні форми, навпаки, мають виражену каталазну, пероксидазну та дегідрогеназну активність.

Все це наштовхує на думку, що внаслідок варіацій фенотипових характеристик мікобактерій виникає мінливість і їх біохімічних характеристик (Niemann et al., 1999; Tkachenko et al., 2007). Такі твердження є доречні, оскільки, з попередніх досліджень відомо, що мікобактерії володіють високим ступенем мінливості, а зміна біологічних властивостей *M. bovis* (культура, тинкторіальних, морфології) може супроводжуватися й іншими змінами, зокрема метаболізму, з яким тісно пов'язані синтетазні системи (ферменти зокрема) (Tkachenko, 2017). Це підтверджено дослідженнями й інших авторів, у результаті яких встановлено, що біохімічні властивості мікобактерій можуть частково змінюватися у певних стадіях розвитку (Wayne & Sramek, 1992; Lysenko et al., 2011).

Проте знання про наявність ферментних систем у мікобактерій дозволяє краще зрозуміти такі особливості, як вірулентність і стійкість до антимікобактеріальних препаратів (Chapman, 1971; Chapman, 1977; Yavorska & Sybina, 2009).

З огляду на вищевикладене, метою було з'ясування пластичності ферментативних систем мікобактерій під впливом багаторазового пасажування через щільне живильне середовище за різних температур культивування та пасажування через організм лабораторних тварин.

## Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили в навчальній лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпровського державного аграрно-економічного університету. В роботі використано музейний швидкорослий штам *M. bovis*, який пасажували (Tkachenko et al., 2007) через щільне живильне яєчне середовище Мордовського (Нове) з pH 6,7 за 37 °C, а саме, пасажі 54, 115, 143, 171, 195 (вихідні культури зберігали на середовищі без пересівів у пробірках закритих гумовими пробками за температури 3°C протягом 10–13 років), а також його дисоціативні варіанти, одержані за 2–3 °C культивування – 117-а, б, в, 118 (240-ї генерації). Дисоціанти були отримані внаслідок відщеплення авірулентних клітин від вірулентного епізоотичного штаму *M. bovis*, що відбулось після 116-ти разового пересівання за вислу вірулентної культури на щільне живильне середовище та зберігання культур 117 пасажу протягом 20 місяців за умови низьких плюсових температур (Tkachenko, 2017). Контролем слугував патогенний високовірулентний лабораторний штам *M. bovis* 100-го пасажу. У біохімічних тестах використовували 3–4 тижневі культури бактерій першої генерації. Культури 54, 115, 171, 143, 195 пасажів *M. bovis* досліджували на зміни

біохімічної активності до та після пасажування через організм морських свинок.

Біопробу проводили на морських свинках (*Cavia porcellus*) згідно методики (Manchenko et al., 1994; Tkachenko et al., 2010). Зависом кожної культури (пасаж 54, 115, 171, 143, 195) заражали двох тварин під шкіру з внутрішньої сторони стегна в 1,0 мг/см<sup>3</sup> фізіологічного розчину. Через кожні 30 діб після ін'єкції їх досліджували туберкуліновою пробою – внутрішньошкірно ППД-туберкуліном для свавців у дозі 25 МО в об'ємі 0,1 см<sup>3</sup> стерильного ізотонічного розчину. Облік реакції проводили через 24 та 48 год, а щотижневий контроль змін маси дослідних тварин кожні 10 діб методом зважування. По закінченню терміну біопробу (90 діб) морських свинок евтаназували ефірним наркозом і проводили патолого-анатомічні та бактеріологічні дослідження за загальноприйнятими методиками (Tkachenko et al., 2010).

Визначення каталазою та пероксидазою активності проводили одночасно (модифікована методика Богена). З цією метою до культур додавали свіжовиготовлену суміш 2%-вого розчину перекису водню та 0,5%-вого розчину пірогалолу А, які змішували безпосередньо перед постановкою реакції. Облік проводили через 15 та 30 хв (каталаза) та через 1,5–2 год (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 пурпурогалін у присутності перекису водню. Облік реакції проводили в хрестах: (+++) – темно-коричневий колір колоній; (++) – коричневий; (+) – блідо-коричневий колір; (–) – колір не змінюється.

Дегідрогеназну активність, яка ґрунтується на виявленні окисно-відновного ферменту дегідрогенази та продуктів метаболізму, визначали в пробірках Епіндорфа (Bloch, 1950). Для цього 4,0 см<sup>3</sup> завису мікробних клітин із концентрацією 10,0 мг/см<sup>3</sup> у фосфатному буфері pH 7,4–7,6 перемішували з 1 см<sup>3</sup> 1%-вого розчину глюкози і 0,1 см<sup>3</sup> 0,02%-вого розчину метиленового синього. На отриманий уміст у пробірці нашаровували стерильне вазелінове масло. Пробірки ставили в термостат за температури 38 °C з подальшим контролем часу знебарвлення барвника. Облік реакції здійснювали через 15–30 хв і 24 год. Контролем були пробірки із зависом збудника та метиленовим синім без глюкози.

Редукцію нітратів, проводили за методами М. Tsuramura (1961) в модифікації Т.Б. Ільїної й співавт. (1982). Для цього на торсійних вагах відмірювали 10,0 мг вологої біологічної маси із культури мікобактерій і вносили в бактеріологічну пробірку, що вміщувала 1,0 см<sup>3</sup> 0,067 М-фосфатного буфера (pH 7,1) з 0,1%-вим розчином нітрату натрію. Після суспендування культури інкубували за температури 37 °C протягом 20–22 год. Утворення нітрату перевіряли додаванням у пробірку двох крапель 2%-го розчину пара-диметиламінобензальдегіду на 1%-му розчині соляної кислоти. За позитивної реакції виникає жовте забарвлення, за негативної – колір розчину не змінюється (рис. 1Б).

Реакцію гідролізу ТВІН-80 визначали за модифікованою методикою Вайна. Під час дослідження використовували 1/15 М фосфатний буфер (pH 7) – 100,0 см<sup>3</sup>, ТВІН-80 – 0,5 см<sup>3</sup>, основний нейтральний червоний, 0,1 % – 2,0 см<sup>3</sup>. Перед початком досліді усі три реагенти змішували, розливали по 4,0 см<sup>3</sup> у пробірки й автоклавували за 120 °C 15 хвилин. Протягом доби перевіряли на стерильність у термостаті. Для визначення здатності бактерій гідролізувати ТВІН-80 три бактеріологічні петлі кожної з досліджуваних культур емульгували в пробірках із виготовленим субстратом (ТВІН-80 із нейтральним червоним).

Пробірки витримували в термостаті, реакцію перевіряли через 4 год, на 5-у та 10-у добу. Тест вважався позитивним, якщо рожево-червоне забарвлення з'явилося до 10-ої доби, негативним, якщо забарвлення не з'явилося. Контролем була пробірка із середовищем без реактивів.

Культури мікроорганізмів досліджували на здатність рости на звичайних живильних середовищах (м'ясо-пептонний бульйон і м'ясо-пептонний агар) та яєчному середовищі з додаванням натрію саліциловокислого. Для цього до середовища Мордовського перед його згортанням додавали натрій саліцилат з розрахунку 100 000,0 мкг на 1,0 см<sup>3</sup> середовища. Контролем слугували пробірки з посівами на класичне живильне середовище Мордовського.

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

### Результати

На першому етапі дослідження з'ясували коливання активності ферментів мікобактерій залежно від кількості пасажів і температури культивування (табл. 1). Необхідно зазначити, що не всі культури задіяні в досліді здатні рости за низької температури культивування (3 °C), пасажі 54, 143, 195, а також контрольний високовірулентний штам *M. bovis* росли тільки за 37 °C. Деякі культури (пасаж 135 та дисоціанти – 117-а, б, в, 118), проявляли ростові властивості тільки за низьких плюсових температур (3 °C).

З огляду на дані, наведені в таблиці 1, можна стверджувати, що відмічена тенденція до зміни біохімічної активності досліджуваних мікроорганізмів. Встановлено підвищення каталазної активності залежно від зниження температури культивування (пасажі 115 та 171). Пероксидазна активність спостерігалася тільки у контрольному високовірулентного штаму з усіх досліджуваних культур. Дегідрогеназна активність у перші 15–30 хв не була виявлена в жодній культурі, але вже через 24 год відмічалася майже в усіх культур, окрім 54 пасажу та 117-а. Редукція нітратів виявилася позитивною в усіх культур окрім пасажу 143 та 171 за температури культивування 37 °C. 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 5 добу.

Якщо співставити отримані в цьому досліді результати з раніше опублікованими даними по дослідженні ферментативної активності *M. bovis* дисоціативних форм 15 генерації (Tkachenko, 2017), то можна стверджувати про значні зміни біохімічної активності бактерій.

Провівши зараження лабораторних тварин дослідними культурами (пасажі 54–195) у жодній з дослідних тварин не встановили позитивної алергічної реакції на туберкулін та не відмічали зниження маси тіла. По закінченню біопробі (90 діб) в органах дослідних тварин не виявили патологоанатомічних змін. Виготовлену суспензію з органів морських свинок висіяли на щільне живильне середовище, а у отриманих культур дослідили біохімічну активність.

Якщо порівняти дані таблиці 1 (вихідні культури) та 3 (культури отримані з органів лабораторних тварин після одноразового пасажування через організм морських свинок), то можна прослідкувати певні закономірності в змінах біохімічної активності культур досліджуваних пасажів, а саме: підвищення активності ферменту дегідрогенази – пасажі 54, 135 і 171 (за 3 °C); втрату здатності редукувати нітрати, особливо в культур одержаних за низьких температур (за 3 °C) – пасажі 115, 135 171, та за 37 °C пасаж 195; підвищення каталазної активності – пасажі 115 і 171 за обох температур культивування (3 та 37 °C); ферментативна здатність до гідролізу ТВІН-80 в переважній більшості культур знижувалась – пасажі 115 (3 та 37 °C), 171 (3°C), 135, 195, і тільки в одній культурі – пасаж 54 незначно підвищувалась. Також слід зазначити, що біохімічна активність однієї культури – пасажу 143 після пасажування через організм морських свинок залишилась незмінною.

На останньому етапі дослідження з'ясували здатність *M. bovis* розмножуватися й накопичуватися на простих живильних середовищах і за наявності натрію саліциловокислого (табл. 4). Усі досліджувані культури мали здатність рости на МПА та майже всі (за винятком пасажів 54 та 117А) на МПБ. На сере-

Таблиця 1. Ферментативна активність *Mycobacterium bovis*

| № пасажу | Температура культивування, °C | Каталаза    | Пероксидаза | Дегідрогеназа |           | Редукція нітратів | Гідроліз ТВІН-80 |           |           |
|----------|-------------------------------|-------------|-------------|---------------|-----------|-------------------|------------------|-----------|-----------|
|          |                               |             |             | 15–30 хв      | 24 год    |                   | 4 год            | 5 діб     | 10 діб    |
| 54       | 37                            | ++<br>80%   | –<br>100%   | –<br>100%     | –<br>80%  | –<br>100%         | –<br>100%        | –<br>80%  | –<br>80%  |
|          | 37                            | –<br>100%   | –<br>100%   | –<br>80%      | ±<br>60%  | –<br>80%          | –<br>100%        | ±<br>80%  | –<br>80%  |
| 115      | 3                             | –<br>100%   | –<br>100%   | –<br>80%      | –<br>80%  | –<br>80%          | –<br>100%        | –<br>60%  | –<br>80%  |
|          | 37                            | +++<br>100% | –<br>100%   | –<br>80%      | ±<br>60%  | –<br>100%         | –<br>100%        | ±<br>60%  | ±<br>60%  |
| 143      | 37                            | +++<br>100% | –<br>100%   | –<br>100%     | –<br>80%  | –<br>100%         | –<br>100%        | –<br>100% | –<br>100% |
|          | 37                            | –<br>60%    | –<br>100%   | –<br>80%      | –<br>100% | –<br>80%          | –<br>100%        | –<br>60%  | –<br>60%  |
| 171      | 3                             | –<br>100%   | –<br>100%   | –<br>100%     | ±<br>80%  | –<br>80%          | –<br>100%        | ±<br>60%  | –<br>80%  |
|          | 37                            | –<br>80%    | –<br>100%   | –<br>100%     | –<br>80%  | –<br>80%          | –<br>100%        | –<br>60%  | –<br>60%  |
| 195      | 37                            | –<br>80%    | –<br>100%   | –<br>100%     | –<br>80%  | –<br>80%          | –<br>100%        | –<br>60%  | –<br>60%  |
|          | 35                            | –<br>60%    | –<br>60%    | –<br>100%     | –<br>60%  | –<br>80%          | –<br>100%        | –<br>80%  | –<br>80%  |
| Контроль |                               | –<br>60%    | –<br>60%    | –<br>100%     | –<br>60%  | –<br>80%          | –<br>100%        | –<br>80%  | –<br>80%  |

Примітка: + – позитивна реакція; – – негативна реакція; ± – сумнівна реакція.

**Таблиця 2.** Ферментативна активність дисоціативних форм *Mycobacterium bovis* 15 та 240 генерації

| № пасажу | Генерація | Каталаза   | Пероксидаза | Дегідрогеназа |          | Редукція нітратів | Гідроліз ТВІН-80 |          |           |
|----------|-----------|------------|-------------|---------------|----------|-------------------|------------------|----------|-----------|
|          |           |            |             | 15–30 хв      | 24 год   |                   | 4 год            | 5 діб    | 10 діб    |
| 117-а    | 240       | ++<br>100% | –<br>100%   | –<br>100%     | –<br>80% | –<br>100%         | –<br>100%        | –<br>80% | –<br>80%  |
|          | 15        | +++        | +++         | +             | –        | –                 | Не досліджували  |          |           |
| 117-б    | 240       | –<br>60%   | –<br>100%   | –<br>100%     | –<br>60% | –<br>80%          | –<br>100%        | –<br>80% | –<br>80%  |
|          | 15        | +++        | +++         | +             | –        | –                 | Не досліджували  |          |           |
| 117-в    | 240       | –<br>80%   | –<br>100%   | –<br>100%     | –<br>60% | –<br>60%          | –<br>100%        | –<br>60% | –<br>80%  |
|          | 15        | +++        | +++         | +             | –        | –                 | Не досліджували  |          |           |
| 118      | 240       | –<br>80%   | –<br>100%   | –<br>80%      | –<br>80% | –<br>80%          | –<br>100%        | –<br>80% | –<br>100% |
|          | 15        | +++        | +++         | +             | –        | –                 | Не досліджували  |          |           |

**Примітка:** + – позитивна реакція; – – негативна реакція; ± – сумнівна реакція.

довищі з натрієм саліциловокислим колонії утворювали більшість культур, окрім пасажів 54, 135, 171 (за 3 °C) та 118.

### Обговорення

Вже описана багатьма авторами (Djachenko et al., 2009; Yavorska & Sybirna, 2009; Lysenko et al., 2011; Glebenjuk & Telizhenko, 2015; Tkachenko, 2017) висока мінливість мікобактерій, їх культуральних, тинкторіальних властивостей і морфології ще раз підтверджена нашим дослідом стосовно біохімічної активності цих мікроорганізмів. Отримані результати досліджень переконливо свідчать про неймовірну пластичність ферментативних систем *M. bovis*, що можна розглядати як механізм пристосування до змін середовища існування бактерій.

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 (так у

культур вирощених за температури 3 °C була вища каталазна активність і здатність до гідролізу ТВІН-80).

Стосовно дисоціативних форм, за даними Tkachenko (2017), культури 117-а, б, в і 118 у 15 генерації володіли добре вираженою активністю ферментів каталази, пероксидази та дегідрогенази (знебарвлення розчину метиленової синьки за 15–30 хв) та не володіли нітратредукуючими властивостями. Тоді як у 240 генерації в них знизилася 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 варіанті 117-б повністю та неповністю – в 117-в і 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 за-

**Таблиця 3.** Ферментативна активність *Mycobacterium bovis* після пасажування через організм лабораторних тварин

| № пасажу | Температура культивування, °C | Каталаза    | Пероксидаза | Дегідрогеназа |           | Редукція нітратів | Гідроліз ТВІН-80 |           |           |
|----------|-------------------------------|-------------|-------------|---------------|-----------|-------------------|------------------|-----------|-----------|
|          |                               |             |             | 15–30 хв      | 24 год    |                   | 4 год            | 5 діб     | 10 діб    |
| 54       | 37                            | ++<br>100%  | –<br>100%   | –<br>100%     | ±<br>100% | –<br>100%         | –<br>100%        | –<br>100% | ±<br>60%  |
|          |                               | ++<br>100%  | –<br>100%   | –<br>80%      | ±<br>60%  | –<br>100%         | –<br>100%        | –<br>80%  | –<br>80%  |
| 115      | 3                             | ++<br>100%  | –<br>100%   | –<br>100%     | –<br>100% | –<br>100%         | –<br>100%        | ±<br>60%  | –<br>80%  |
|          |                               | +++<br>100% | –<br>100%   | –<br>100%     | ±<br>100% | –<br>100%         | –<br>100%        | ±<br>100% | ±<br>100% |
| 143      | 37                            | +++<br>100% | –<br>100%   | –<br>100%     | –<br>100% | –<br>100%         | –<br>100%        | –<br>100% | –<br>100% |
|          |                               | +++<br>100% | –<br>100%   | –<br>80%      | –<br>100% | –<br>100%         | –<br>100%        | –<br>100% | –<br>100% |
| 171      | 3                             | ++<br>100%  | –<br>100%   | –<br>80%      | –<br>100% | –<br>100%         | –<br>100%        | –<br>100% | ±<br>80%  |
|          |                               | ++<br>100%  | –<br>100%   | –<br>80%      | –<br>100% | –<br>100%         | –<br>100%        | –<br>100% | ±<br>80%  |
| 195      | 37                            | –<br>100%   | –<br>100%   | –<br>80%      | –<br>60%  | –<br>100%         | –<br>100%        | –<br>60%  | ±<br>60%  |

**Примітка:** + – позитивна реакція; – – негативна реакція; ± – сумнівна реакція.

**Таблиця 4.** Ріст *Mycobacterium bovis* і дисоціативних форм на звичайних живильних середовищах і середовищі з додаванням натрію саліциловокислого

| № пасажу | Температура культивування, °C | Середовище Мордовського | Середовище з додаванням натрію саліциловокислого | МПА | МПБ |
|----------|-------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------|-----|-----|
| 54       | 37                            | —                       | —                                                | +   | —   |
| 115      | 37                            | +                       | +                                                | +   | +   |
|          | 3                             | +                       | +                                                | +   | +   |
| 135      | 3                             | +                       | —                                                | +   | +   |
| 143      | 37                            | +                       | +                                                | +   | +   |
|          | 37                            | +                       | +                                                | +   | +   |
| 171      | 3                             | —                       | —                                                | +   | +   |
| 195      | 37                            | +                       | +                                                | +   | +   |
| Контроль | 37                            | —                       | +                                                | +   | +   |
| 117a     | 3                             | +                       | +                                                | +   | —   |
| 117б     | 3                             | —                       | +                                                | +   | +   |
| 117в     | 3                             | +                       | +                                                | +   | +   |
| 118      | 3                             | +                       | —                                                | +   | +   |

**Примітка:** + – відмічено ріст культури; — – ріст культури відсутній.

гально значно знизили свою біохімічну активність (дегідрогеназну та каталазну; пероксидазна зникла повністю), але набули нової здатності, що раніше не відмічалася, редукувати нітрати.

Традиційно 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 & Højberg, 1999; Fritz, 2002; Glebenyuk & Petrussha, 2018). Крім того, аналіз наявності ферменту нітратредуктази широко використовують у лабораторній практиці в якості альтернативного методу виявлення резистентності нітратредуктазно-позитивних штамів мікобактерій до протитуберкульозних препаратів, таких як ізоніазид, рифампіцин, етамбутол, офлоксацин, стрептоміцин та деякі інші. Штам вважався стійким, якщо він володіє нітратредуктазною активністю (Fonseca et al., 2002; Angeby et al., 2002; Montoro et al., 2005; Martin et al., 2005; Lemus, 2006).

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

Цікавими були також 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°C) та здатності до гідролізу ТВІН-80. Особливо цікаво те, що після пасажування через живий організм *M. bovis* у бактерій підвищилася активність ферментів дегідрогенази та каталази. Це багатofункціональні гемозалежні ферменти, які беруть активну участь у окисно-відновних процесах антиоксидантного захисту мікробної клітини.

У літературних джерелах 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 і рекомбінантних штамів *M. tuberculosis*, їх вимірювали як внутрішньоклітинно (в моноцитах людини), так і в живильному середовищі. Результати свідчать про те, що в штамів у яких була присутня навіть мінімальна активність каталази виживало значно більше бактерій (85%) за впливу екзогенного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Автори припускають, що стійкість мікобактерій до окисних метаболітів може бути важливим механізмом бациллярного 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 атипичними мікобактеріями, такими як *M. avium* показало, що виживання мікобактерій посилюється (Manca et al., 1998).

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).

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

Проте, отримані результати свідчать, що остаточна типізація мікобактерій і визначення видової належності на основі біохімічних тестів є неможливою, оскільки ці характеристики можуть сильно варіювати в представників одного й того ж виду залежно від умов середовища існування конкретного мікроорганізму.

Така точка зору також підтримується й іншими вченими (Yavorska & Sybirna, 2009; Lysenko et al., 2011). Мікобактерії

здатні швидко змінювати метаболічні процеси та пристосовуватись до умов оточуючого середовища. Порівняна сила біохімічних тестів поодинокі обмежена, оскільки різні види можуть проявляти подібні чи ідентичні результати в однакових реакціях. Для ідентифікації на рівні виду рекомендується додатково проводити й інші дослідження, наприклад, аналіз жирних кислот, виявлення швидкості росту бактерій, ПЛР дослідження (Wayne & Sramek, 1992; Tkachenko, 2017).

#### Висновки.

1. Ферментативна активність *M. bovis* (пасажі 54–195) не залежить від кількості пересівів субкультур. У дисоціативних форм зі збільшенням кількості пересівів субкультур знижується активність дегідрогенази, каталази, пероксидази та підвищується активність нітратредуктази, що може свідчити про набуття ними патогенності.

2. Мікобактерії одержані за низьких плюсових температур, проявляють вищу каталазну активність і здатність до гідролізу ТВІН-80, порівняно з культурами які виростили за 37 °C.

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

#### References

- 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.
- Bonick, 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.
- Chapman, J. S. (1971). The ecology of the atypical *Mycobacteria*. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 22(1), 41–46.
- Chapman, J. S. (1977). Epidemiology. The atypical *Mycobacteria* and human *Mycobacteriosis*, 33–43.
- Djachenko, G. M., Kravchenko, N. O., Iliny, V. V., Dmytruk, O. M., & Golovach, O. V. (2009). Adaptacija ta minlyvist vlastyvojest mikobakterij riznyh vydiv za vplyvu antybakterialnyh preparativ [Adaptation and variability of the properties of mycobacteria of different species for the influence of antibacterial drugs]. *Silskogospodarska Mikrobiologija*, 9, 158–165 (in Ukrainian).
- 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.
- Fritz, C. (2002). Dependence of *Mycobacterium bovis* BCG on anaerobic nitrate reductase for persistence is tissue specific. *Infection and Immunity*, 70(1), 286–291.
- Glebenjuk, V. V. & Telizhenko, K. V. (2015). Vydova nalezhnist' mikobakterij, vydilenyh vid tvaryn u Dnipropetrovs'koi oblasti [Species belonging to mycobacteria isolated from animals in the Dnipropetrovsk region]. *Science and technology bulletin of SRC for biosafety and environmental control of AIC*, 3 (1), 61–64 (in Ukrainian).
- Glebenjuk, V. V., & Petrusa, V. G. (2018). Stability attenuation of BCG vaccine strain. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 20(83), 168–171.
- Yavorska, G. V., & Sybirna, R. I. (2009). Morfolohichno-kulturalni i fiziolohe-biokhimichni vlastyvoli atypovykh mikobakterii [Morphological-cultural and physiological and biochemical properties of atypical mycobacteria]. *Mikrobiolohichni Zhurnal*, 71(4), 27–34 (in Ukrainian).
- Kassich, V. Ju. (2013). Mikobakterii ta ih dyferenciacija [Mycobacteria and their differentiation]. *Visnyk Sumskogo Nacionalnogo Agrarnogo Universytetu*, 2, 109–115 (in Ukrainian).
- 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.
- 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.
- Lysenko, A. P., Vlasenko, I. G., Vlasenko, V. V., & Babichuk, Ju. V. (2011). Biohimicheskie svojstva bacyljarnyh i izmenennyh form mikobakterij, vyrashchennyh na pitatel'nyh sredah [Biochemical properties of bacillary and modified forms of mycobacteria grown on nutrient media]. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 13(50), 249–252 (in Russian).
- 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*, 67(1), 74–79.
- Manchenko, V. M., Trocenko, Z. R., & Pavlenko, M. S. (1994). Nastanova po diagnostyky tuberkulozu [Guidelines for diagnosing tuberculosis]. Kyiv (in Ukrainian).
- 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.
- 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.
- 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.
- Philippot, L., & Højberg, O. (1999). Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression*, 1446(1–2), 1–23.
- Tkachenko, O. A. (2017). Minlyvist *Mycobacterium bovis*: monografija [Mycobacterium bovis variability: monograph]. Zhytomir, Polissja (in Ukrainian).
- Tkachenko, O. A., Usejeva, N. G., Glebenjuk, V. V. & Kulishenko, O. M. (2007). Biologichna aktyvnist epizootychnykh ta muzejnykh shtamiv *M. bovis* [Biological activity of the epizootic and museum strains *M. bovis*]. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, № 3(34), 218–224 (in Ukrainian).
- Wayne, L. G., & Sramek, H. A. (1992). Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(1), 1–25.