

О. М. Кулішенко,
П. О. Давиденко, В. В. Зажарський

к-ти вет.н., доценти

О. А. Ткаченко

д.вет.н., професор

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет

МОРФОЛОГІЯ ТА КУЛЬТУРАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ДИСОЦІАТИВНИХ ФОРМ МУСОВАСТЕРІУМ BOVIS, КУЛЬТИВОВАНИХ ЗА 3 ТА 37 °С

У статті наведені результати досліджень впливу різних температур культивування 3 та 37° С на культуральні властивості, морфологічні та тинкторіальні ознаки *M. bovis* дисоціативних форм субкультур 117 а, 117 б, 117 в, 118. Зазначені субкультури *M. bovis* (дисоціативні форми) за пасажування набули стійкої властивості до росту при низьких плюсових температурах (3° С) і втратили здатність до розмноження при температурі 37° С. У процесі культивування за температури 3°С дисоціативні форми *M. bovis* змінили свою морфологічну будову та набули здатності інколи утворювати помаранчевий пігмент впродовж пасажування, хоча ця ознака притаманна іншій групі мікобактерій — фотохромогенних атипових мікобактерій. Культури з інтенсивно помаранчевим забарвленням містять форми мікобактерій, які суттєво відрізняються морфологічними ознаками від стандартних музейних культур. Інтенсивно забарвленні дисоціативні субкультури представлені неокислотостійкими паличками та коками.

Ключові слова: мікробна дисоціація, культуральні властивості *M. bovis*, кислотостійкість, морфологічні та тинкторіальні ознаки мікобактерій.

Постановка проблеми. Багаторічними дослідженнями кафедри епізоотології та інфекційних хвороб ДЦАЕУ було отримано чотири клони неокислотостійких дисоціативних форм мікобактерій, які принципово відрізнялися за своїми культуральними, сенсibiliзувальними та патогенними властивостями, морфологічними і тинкторіальними ознаками від вихідного епізоотичного штаму *M. bovis* [1-8]. Перспективним було з'ясування властивостей у отриманих дисоціантів за подальшого пасажування за різних температур.

Аналіз останніх досліджень та постановка завдання. Отримані генерації дисоціантів, набули здатності культивування за температури 3°С, що описано у спеціальній літературі тільки окремими авторами [4-8], а тому вимагає подальшого дослідження.

Метою дослідження було вивчення культуральних властивостей, морфологічних і тинкторіальних ознак *M. bovis* дисоціативних форм культивованих за 3 та 37° С .

Об'єкти та методика досліджень. Пересів культур *M. bovis* дисоціативних форм здійснювали методом прямого пересіву на щільне ячне живильне середовище Мордовського «Нове» (рН 6,5) з наступним культивуванням у термостаті ТСО-80/1 за температури 3 та 37°С. Культуральні властивості вивчали методом огляду посівів кожної доби з описом початку росту та кольору колоній.

Морфологічні і тинкторіальні властивості мікобактерій, досліджували шляхом виготовлення мазків з культур, отриманих за пересіву з 60, 70, 80, 90, 100, 110 та 120 генерації кожної субкультури дисоціативних форм. В наступному їх фарбували за методом Ціля-Нільсена і піддавали мікроскопії із фотографуванням під мікроскопом Місcomed з вмонтованою фотокамерою в інтерфейсі з ноутбуком зі спеціальним програмним забезпеченням.

Результати досліджень. Морфологічні і тинкторіальні ознаки дисоціативних форм 60, 70, 80, 90 генерації були представлені (рис. 1).

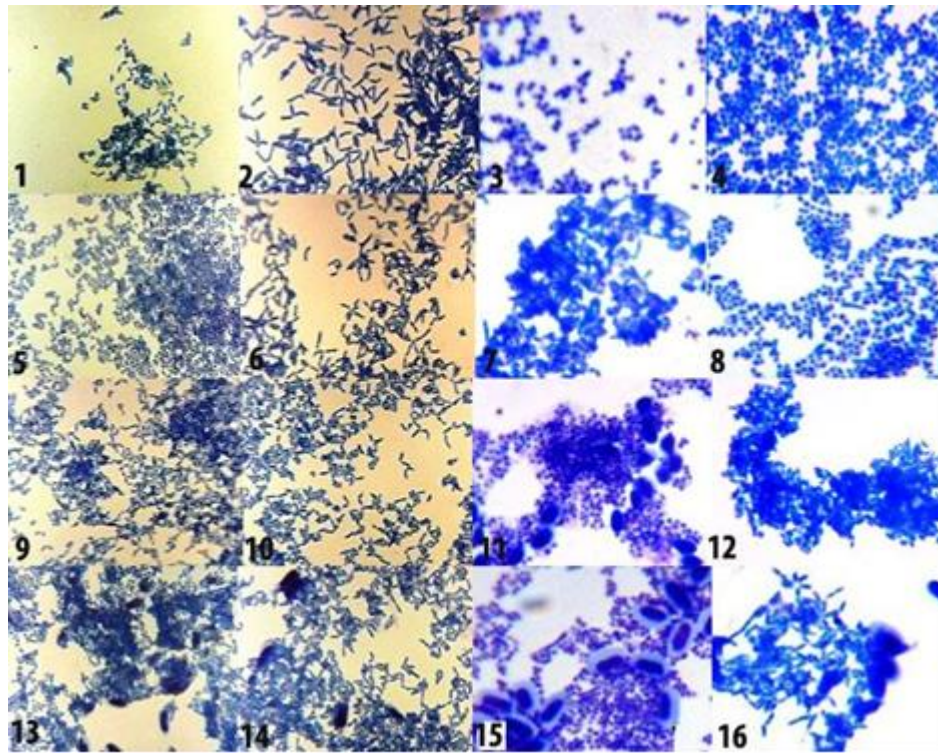


Рис. 1. Морфологічні та тинкторіальні ознаки *M. bovis* дисоціативних форм: 1.-117 а; 2.-117 а; 3.-117 а; 4.-117 а (60 генерація); 5.-117 б; 6.-117 б; 7.-117 б; 8.-117 б (70 генерація); 9.-117 в; 10.-117 в; 11.-117 в; 12.-117 в (80 генерація); 13.-118; 14.-118; 15.-118; 16.-118 (90 генерація) 3° С.

У 60 генерації - 117 а - некислотостійкі палички; 117 б - некислотостійкі коки; 117 в - некислотостійкі палички та коки; 118 - некислотостійкі коки та овали (L-форми); у 70 генерації - 117 а - некислотостійкі палички; 117 б - некислотостійкі палички; 117 в — некислотостійкі палички та коки; 118 — некислотостійкі палички, коки та овали (L-форми); у 80 генерації — 117 а — некислотостійкі коки; 117 б — некислотостійкі палички та коки; 117 в — некислотостійкі та кислотостійкі коки, великі некислотостійкі овали (L-форми); 118 – некислотостійкі коки та великі некислотостійкі овали (L-форми); у 90 генерації — 117 а — некислотостійкі коки; 117 б - некислотостійкі коки; 117 в - некислотостійкі палички; 118 - некислотостійкі палички та великі некислотостійкі овали (L-форми).

В результаті досліджень культуральних властивостей дисоціативних форм *M. bovis* 100 та наступних генерацій, було встановлено, що за пасажування субкультур 117а, 117б, 117в та 118 за температури 37° С ріст колоній спостерігався на 8-ї добу. Методом прямого пересіву вищезазначених субкультур вдалося отримати лише три генерації від 101 до 103, у подальшому ріст культур за температури 37° С не спостерігався. За температури 3° С вдалося отримати культури у 20 генераціях *M. bovis* дисоціативних форм субкультур 117а, 117б, 117в та 118 від 101 до 120. Ріст цих субкультур за температури 3° С спостерігався на 6-8 добу, притому під кінець дослідження від 106 до 120 генерацій спостерігалася пришвидшення росту вищезазначених субкультур відповідно 4-5 добу. Під час культивування цих же субкультур за температури 37° С спостерігалася тенден-

ція до затримки росту. На початку культивування ріст культур спостерігався на 8-10 добу, а вже у наступних пересівах на 13-14 добу з наступним припиненням росту.

Культури 100 генерації *M. bovis* дисоціативних форм мали наступний колір колоній: субкультура 117 а - суцільний ріст яскраво-помаранчевого кольору; 117 б - суцільний ріст яскраво-жовтого кольору; 117 в - суцільний ріст блідо-жовтого кольору; 118 — суцільний блідо-кремового кольору (рис. 2).



Рис. 2. Культуральні властивості *M. bovis* дисоціативних форм 100 генерації

Впродовж пасажування штамів дисоціативних форм *M. bovis* спостерігали зміну забарвлення колоній і особливо яскраво це проявлялося зі зникненням та появою яскраво-помаранчевого забарвлення в усіх вищезазначених субкультур у темряві. Так субкультура *M. bovis* 117а на початку досліджу мала яскраво помаранчеве забарвлення. Потім із 101 до 111 генерації блідо-жовтий колір колоній. Генерація 112 субкультури *M. bovis* 117а утворила яскраво-помаранчевий пігмент у темряві, а з її 13 до 120 генерації колонії знову мали блідо-жовте та блідо-кремове забарвлення. Субкультура *M. bovis* 117 б у 101 та 109 генераціях утворила помаранчевий пігмент у темряві. В усіх інших генераціях субкультура *M. bovis* 117 в мала блідо-жовте та блідо-кремове забарвлення. Субкультура *M. bovis* 117 в у 104 та у 109 генераціях утворила помаранчевий пігмент. В усіх інших генераціях мікобактерії цієї ж субкультури продукували блідо-жовтий та блідо-кремовий пігмент. Субкультура *M. bovis* 118 утворила помаранчевий пігмент у 108 генерації.

Згідно класифікації атипичних мікобактерій, запропонованою Раніоном у 1959 році, мікобактерії, які здатні утворювати помаранчевий пігмент у темряві, відносяться до другої групи фотохромогенних атипичних мікобактерій. Типовими представниками яких є *M. scrofulaceum*, *M. goodnae*, *M. aquae* [4].

Із вищезазначеного можна зробити висновок, що під час пасажів за низьких температур (3° С) дисоціативні форми *M. bovis* стали набувати морфологічних і тинкторіальних ознак притаманних другій групі атипичних фотохромогенних мікобактерій.

Дослідженням морфологічних і тинкторіальних ознак *M. bovis* дисоціативних форм 100 генерації субкультур 117 а, 117 б, 117 в та 118, було встановлено, що: субкультура 117 а, у полі зору мікроскопу, була представлена дрібними некіслотостійкими

коками; субкультури 117 б — некіслотостійкі палички з обрубаними краями та дрібні фіолетові елементарні тільця між ними; субкультури 117 в - некіслотостійкі палички та коки, які розміщені поодинокі та скупченнями; субкультура 118 - великі некіслотостійкі овали (L-форми) та елементарні тільця у вигляді скупчень.

Мікроскопією пофарбованих мазків *M. bovis* дисоціативних форм 110 генерації, що культивувалися за 3° С встановлено, що: субкультура 117 а представлена некіслотостійкими паличками з обрубаними краями та овалами (L-форми); субкультура 117 б - некіслотостійкими паличками з обрубаними краями, які розміщені поодинокі та попарно і кіслотостійкими зернами (елементарними тільцями); субкультура 117 в - некіслотостійкими паличками та коками у вигляді скупчень; субкультура 118 — некіслотостійкими паличками та великими синіми овалами (L-форми).

Ці дані свідчать про тенденцію до зміни морфології та тинкторіальних ознак *M. bovis* дисоціативних форм під час пасажування на щільному середовищі Мордовського «Нове» (рН 6,5) за температури 3° С. Так, у субкультури 117 а у 100 генерації відмічали некіслотостійкі коки, а у 110 генерації - некіслотостійкі палички та овали (L-форми); у субкультури 117 б — у 100 генерації — некіслотостійкі палички та елементарні тільця, а у 110 генерації — некіслотостійкі палички та кіслотостійкі елементарні тільця; у субкультури 117 в - в 100 генерації - некіслотостійкі палички та овали з елементарними тільцями, а у 110 генерації некіслотостійкі палички та коки; у субкультури 118-у 100 генерації - некіслотостійкі палички та великі овали (L-форми), а у 110 генерації — некіслотостійкі палички та овали (L-форми).

За подальших пасажувань і мікроскопії пофарбованих мазків *M. bovis* дисоціативних форм субкультур 117 а, 117 б, 117 в, 118 120 генерації встановили: 117 а — некіслотостійкі короткі палички; 117 б — довгі некіслотостійкі палички з обрубаними краями; 117 в - некіслотостійкі палички з обрубаними краями; 118 — некіслотостійкі палички та великі овали (L-форми) з елементарними тільцями.

Досліджуючи морфологічні і тинкторіальні ознаки дисоціативних форм *M. bovis*, які набули у процесі культивування здатності утворювати помаранчевий пігмент деякі особливості (рис. 3).

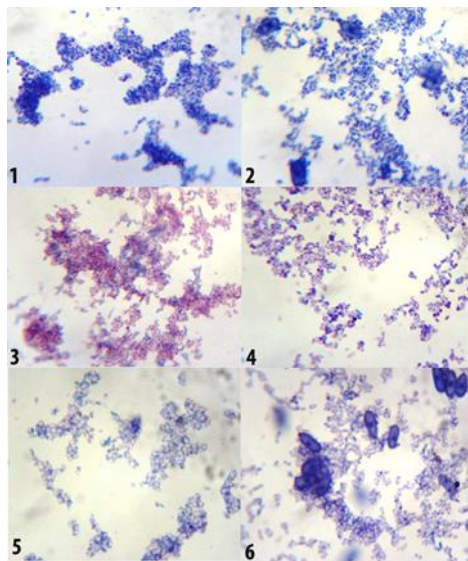


Рис.3. Морфологічні і тинкторіальні ознаки *M. bovis* дисоціативних форм, що утворили помаранчевий пігмент : 1.-117 в (104 генерація); 2.-118

(108 генерація); 3.-117 б (109 генерація); 4.-117 а (112 генерація); 5. 117 а (116 генерація); 6. 118 (120 генерація).

Субкультура 117 в (104 генерація) була представлена - некіслотостійкими паличками та коками, а у 100 генерації - некіслотостійкими паличками та коками у вигляді скупчень ; субкультура 118 (108 генерація) — дрібні некіслотостійкі коки та великі овали (L-форми), а у 110 генерації — некіслотостійкими паличками та великими овалами(L-форми); 117 б (109 генерація) — некіслотостійкі палички та кислотостійкі коки, напівпрозорі (L-форми), а у 110 генерації - некіслотостійкі палички та кислотостійкі елементарні тільця; 117 а (112 генерація) - некіслотостійкі палички, кислотостійкі коки та напівпрозорі (L-форми), а у 110 пересіві - некіслотостійкі палички та великі овали (L-форми); 117 а (116 генерація) - некіслотостійкі коки та напівпрозорі (L-форми), а у 120 генерації - некіслотостійкі короткі палички; 118 (120 генерація) — великі некіслотостійкі овали та напівпрозорі (L-форми), а у 120 генерації - некіслотостійкі палички та великі овали (L-форми) з елементарними тільцями.

Отже, із вищезазначеного, можна зробити висновок, що у процесі пасажування за температури 3° С, *M. bovis* дисоціативних форм набувають здатності утворювати помаранчевий пігмент та мають виражену тенденцію до L- трансформації.

Висновки та перспективи подальших досліджень. За пасажування *M. bovis* дисоціативних форм субкультур 117 а, 117 б, 117 в, 118, за різних температур 3 та 37° С, набули стійкої властивості культивування за низьких плюсових температур (3° С), та втратили здатність розмножуватися за температури термостату (37° С).

У процесі культивування, за температури 3° С, *M. bovis* дисоціативних форм субкультур 117 а, 117 б, 117 в, 118 змінили свою морфологічну будову та набули здатності інколи утворювати помаранчевий пігмент за пасажування, що є притаманним другій групі фотохромогенних атипичних мікобактерій, типовими представниками яких є *M. scrofulaceum*, *M. goodii*, *M. aquae*.

Культури з інтенсивно помаранчевим забарвленням вміщують принципово інші морфологічні форми мікобактерій: субкультури з інтенсивно помаранчевим забарвленням вміщують - некіслотостійкі палички та коки, дрібні некіслотостійкі коки та великі сині овали (L-форми), некіслотостійкі палички та кислотостійкі коки, напівпрозорі (L-форми), а культури із незначним пігментуванням - некіслотостійкі палички та кислотостійкі і елементарні тільця та великі некіслотостійкі овали (L-форми).

Доцільним є подальше дослідження властивостей генерацій *M. bovis* дисоціативних форм за низьких плюсових температур.

Література

1. Морфологічні особливості реверсійної здатності *Mycobacterium bovis* М. В. Білан, Л. О. Ковальова, О. А. Ткаченко, О. Є. Галатюк // Вісн. Дніпропетровського держ. аграр. ун-ту. – 2010. – № 2. – С. 99-102.
2. Биологические свойства *Mycobacterium bovis*, диссоциативных L- и других форм при различных температурах культивирования / А. А. Ткаченко, И. Н. Шендрик, В. В. Мискив [и др.] // Экология и животный мир. – Мн., 2013. – № 2. – С. 24-31.
3. Вейсфелер Ю. К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичных микобактерий / Ю. К. Вейсфелер. - Будапешт : Изд-во АН Венгрии, 1975. - 336 с.

4. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості за температури 3 та 37 °С / О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Зажарський [та ін.] // *Вет. медицина України*. – 2010. – № 12. – С.27-30.
5. Закономірності поліморфізму та мінливості *M. bovis* швидкорослих та повільнорослих штамів / О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Зажарський [та ін.] // *Вісн. Дніпропетровського держ. аграр. ун-ту*. – 2009. – № 1. – С. 94-99.
6. Поліморфізм та мінливість *M. bovis* швидкорослих та повільнорослих штамів / О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Зажарський [та ін.] // *Вет. медицина України*. – 2009. – № 3. – С. 30-33.
7. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: культуральні особливості за температури 3 та 37 °С / О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Місків та ін. // *Ветеринарна медицина України*. – 2010. – №3. – С. 33-35.
8. Ткаченко О. А. Елементарні тільця в біологічному циклі розвитку *M. bovis* / О. А. Ткаченко, М. В. Білан, Л. О. Ковальова // *Науковий вісник ХЗВУ*. – Т. 1. – № 3, 2010. – С. 212-215.