

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДИСОЦІАТИВНИХ ФОРМ *M. BOVIS*: КУЛЬТУРАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ЗА ТЕМПЕРАТУР 3 І 37°C

О.А. ТКАЧЕНКО, доктор ветеринарних наук, професор
М.В. БІЛАН, кандидат ветеринарних наук, доцент
В.В. МІСКІВ, асистент
П.О. ДАВИДЕНКО, аспірант
В.В. ЗАЖАРСЬКИЙ, кандидат ветеринарних наук, доцент
Дніпропетровський державний аграрний університет

Туберкульоз і досі найактуальніша проблема. Понад сто років учені світу цілеспрямовано досліджують біологічні властивості мікобактерій, проте це не дало вичерпних відповідей та бажаного рівня знань для покращення епізоотичної й, особливо, епідемічної ситуації, хоча розробка методів діагностики, профілактичних і оздоровчих заходів у першій половині ХХ ст. за чіткої й раціональної реалізації забезпечила їх певну ефективність на окремих територіях чи в країнах. Однак накопичений масив інформації щодо збудника хвороби, який постійно зростає, обґрунтовує необхідність реалізації цих знань у практику. В першу чергу йдеться про існування в природі (окрім класичних за морфологічними ознаками та тинкторіальними й іншими властивостями мікобактерій, на базі яких й розроблена існуюча система протитуберкульозних заходів) фільтрувальних, некислотостійких нитко- та паличкоподібних елементарних тілець, L-форм [1, 4].

Вочевидь, поглиблені дослідження форм збудника туберкульозу можуть змінити характер і методологічний підхід щодо профілактики й викоринення хвороби тварин.

Проте існують питання, які майже не вивчаються, і навіть такі, над якими науковці не замислюються й дотепер. Це стосується явищ дисоціації мікобактерій та властивостей їхніх дисоціативних форм. Мікробна дисо-

ціація – процес зміни суттєвих ознак у культурі мікроба за появи нових властивостей, які відрізняються від материнської культури при збереженні основних таксономічних ознак.

Особливо цінними можуть виявитися дані стосовно дисоціації туберкульозної палички, оскільки вони сприятимуть порівняльному аналізу мікобактерій у питаннях поліморфізму й мінливості з іншими мікроорганізмами та визначенню важливих для вивчення біології збудника туберкульозу методів, корисних для практичних цілей.

Поодинокі свідчення авторів середини ХХ ст. наголошують на тому, що процес дисоціації зазвичай виявляється за систематичних і тривалих спостережень форм колоній мікроба на щільному чи рідкому середовищах (за знаходження мікроорганізму в незвичайних для нього умовах: старіння культури, дія хімічних, фізичних і біологічних чинників). Дисоціація супроводжується різноманітними змінами властивостей культури: морфології мікроба, його біохімічних властивостей, стійкості до чинників довкілля, вірулентності, антигенності й імунізувальної здатності. Останнє часто використовується для конструювання вакцин [3].

Тому в цій публікації представлено результати досліджень культуральних особливостей *M. bovis*, багаторазово пасажованих крізь щільне живильне сере-



довище з різним рН, культивованих за різних температур.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Обґрунтуванням такого спрямування досліджень стали результати пасажування *M. bovis* швидко-рослого штаму крізь щільне живильне середовище з різним рН, опубліковані 2004–2009 рр. Нами було встановлено, що багаторазові пересіви культури *M. bovis* сприяли поступовому зниженню вірулентності аж до цілковитої її втрати у варіантів, які культивувалися на середовищі з рН 6,5 та 6,7 (з 100-го пересіву), зі збереженням її у мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 7,1, й інтенсивності росту колоній аж до абсолютної їх відсутності. Натомість, типові і конверсовані в інші форми мікобактерії формували на середовищі культуру у вигляді нальоту, на якому з часом в окремих пересівах з'являлися поодинокі колонії. Вірогідно такі явища могли супроводжуватися фундаментальними змінами фенотипу *M. bovis* багаторазово пасажованого штаму, які, безумовно, спричиняють появу нової раси мікроорганізмів з дотепер невідомими властивостями.

З цією метою вивчали вплив тривалості культивування на інтенсивність росту культури за температури 3°C, її залежність від кількості пасажив та інтенсивності росту мікобактерій в термостаті за t 37°C. Для цього відібрали *M. bovis* восьми пасажив (зі 168-го до 188-го), які культивувалися в термостаті за t 37°C протягом трьох місяців на середовищі з рН 6,5 (по три пробірки кожної генерації); семи – (168–180) з рН 6,7; семи – (116–123) з рН 7,1 та надалі культивували за температури 3°C протягом 9–20 міс. По закінченні цих строків, так само як і після культивування за t 37°C, проводили облік та досліджували характер росту колоній мікобактерій (культури).

Потім досліджували та описували культуральні властивості *M. bovis* першої (одержана за t 3°C після культивування в термостаті за t 37°C) та другої (культура, сформована за t 3°C мікобактеріями колоній першої генерації після культивування в термостаті за t 37°C) генерацій в умовах культивування на середовищі з рН 6,5; 6,7 та 7,1 за температури 3°C.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вивчаючи вплив тривалості культивування *M. bovis* на середо-

Таблиця

Вплив тривалості культивування на інтенсивність росту культури за t 3°C та її залежність від кількості пасажів й інтенсивності росту мікобактерій в термостаті (37°C)

pH середовища	Пасаж	Характер культури, кількість колоній, t 37°C	Культивування за t 3°C, місяці	Характер культури, кількість колоній, t 3°C
6,5	168	Ріст відсутній	19	Наліт, 2 колонії
	170	Ріст відсутній	18	Наліт-плями
	173	Наліт	13	Наліт
	177	Наліт	11	Інтенсивний наліт
	178	Наліт	11	Інтенсивний наліт, 3 колонії
	179	Ріст відсутній	11	Інтенсивний наліт, 2 колонії
	183	Наліт	10	Наліт, 1 велика колонія
	188	Наліт	9	Наліт, 2 дрібні колонії
6,7	168	4 дрібні колонії	20	Наліт, більше 20 колоній
	170	4 дрібні колонії	20	3 великі колонії, 10 дрібних колоній
	173	4 колонії	13	Більше 20 колоній
	175	Ріст відсутній	13	14 колоній
	176	8 колоній	13	Більше 20 колоній
	178	4 колонії	13	5 колоній
	180	Наліт	10	Наліт та 2 дрібні колонії
7,1	116	Наліт	20	Наліт і шорсткі колонії (1 велика, 5 дрібних)
	117	Наліт	20	Багато дрібних гладеньких колоній, 1 велика шорстка та 1 велика гладенька
	118	5 дрібних колоній	20	Наліт, 1 велика шорстка колонія, 10 дрібних колоній
	119	5 дрібних колоній	18	Наліт, 1 велика шорстка колонія, 10 дрібних колоній
	120	Наліт	18	Наліт, 1 колонія
	122	Ледь помітний наліт	13	Наліт, 1 велика шорстка колонія
	123	Наліт	13	Наліт

вищі з різним pH на інтенсивність росту культури за t 3°C, її залежність від кількості пасажів та інтенсивності росту мікобактерій за t 37°C встановлено (див. таблицю), що загалом зі збільшенням кількості пересівів (за t 37°C) підвищується вірогідність формування окремих колоній (за t 3°C): якщо на середовищі з pH 6,5 до культивування за t 3°C макроскопічно сформованих колоній не відмічено, то після різнотривалого перебування за таких температурних умов (3°C) вони, переважно, формувалися мікобактеріями, які багаторазово пересівалися.

Подібна закономірність росту колоній виявлена й на середовищі з pH 6,7. Мікобактерії останніх генерацій за t 3°C стимулювали утворення колоній більш як удвічі, а мікобактерії 175-ї генерації за відсутності росту за t 37°C —

утворення значної кількості колоній за t 3°C.

На середовищі з pH 7,1, до перенесення дослідних середовищ із зависсю мікобактерій в умови 3°C, формувалися поодинокі колонії в 118-й та 119-й генераціях, тобто з семи у двох, у той час як культивування за t 3°C супроводжувалося формуванням колоній на середовищі шести пробірок (генерація 116, 117, 118, 119, 120, 122), в т. ч. збільшилася кількість колоній 118-го та 119-го пасажів (з п'яти до одинадцяти).

В останній генерації (123-й пасаж) ріст колоній був відсутній.

Аналізуючи залежність інтенсивності росту колоній на середовищі за t 3°C від тривалості цих умов (3°C), виявлено зворотну залежність частоти формування колоній. Зі зменшенням тривалості перебування дослі-

джуваних мікобактерій в умовах низької плюсової температури збільшується частота появи колоній. Це зумовлено більш глибокими, хоча й нез'ясованими напевно, адаптивними змінами біологічних властивостей мікобактерій з найбільшою кількістю генерацій, за яких конверсовані в неісоглотостійкі форми мікобактерії [2, 5] не здатні (за окремим винятком, до того ж у віддалені строки) формувати колонії.

Інтенсивність росту колоній (культури) за t 3°C практично не залежить від інтенсивності їх формування за t 37°C. Так, на середовищі з pH 6,5 на тлі їх відсутності за t 37°C відмічено ріст за t 3°C, з pH 6,7 та 7,1 спостерігається така ж закономірність.

Отже, ці дослідження засвідчили, що інтенсивність розмноження *M. bovis* за t 3°C більшою мірою залежать від генерації збудника (тобто кількості пасажів крізь живильне середовище), ніж від тривалості культивування за традиційної чи низької плюсової температури. Таке явище характерне для культивованих на середовищі з pH 6,5 та 6,7 мікобактерій. Лише на середовищі з pH 7,1 подібна закономірність простежується нечітко, що, імовірно, зумовлено іншими змінами біологічних властивостей мікобактерій під впливом такого вмісту в середовищі кислотнo-лужних грам-еквівалентів. Передусім, це може стосуватися морфологічних ознак і тинкторіальних властивостей багаторазово пасажованих мікобактерій.

Досліджуючи та характеризуючи культуральні властивості *M. bovis* першої та другої генерацій в умовах культивування на середовищі з різним pH за t 3°C, встановлено, що інтенсивність росту культури двох генерацій практично не відрізняється, за виключенням 170-го (pH 6,5) пасажу другої генерації, де вона виявилася пишною. На середовищі з pH 6,7 інтенсивність росту колоній першої генерації була вищою, ніж другої, а з pH 7,1 — мала суттєві відмінності. Так, *M. bovis* першої генерації

помірно росли, а другої — слабо, за виключенням 117-го пасажу, де відмічено високу інтенсивність росту. Мікобактерії цього варіанта (в одній пробірці) першої генерації утворювали наліт й окремі колонії, тоді як другої — лише окремі колонії та їх скупчення. У зв'язку з тим, що колонії мікобактерій першої генерації 117-го пасажу мали відмінні культуральні характеристики, а саме: помаранчеві колонії з гладенькою (а) та шорсткою (б) поверхнею і білі гладенькі колонії (в), в подальшому їх досліджували окремо (рис.1).

За характером росту на середовищі з pH 6,5 культури відрізнялися суттєво. Якщо в першій генерації ріст характеризувався нальотом та окремими колоніями, то в другій — тільки окремими колоніями. Це ж відмічено на середовищі з pH 7,1 у першій генерації (рис. 2). Проте в другій ріст вирізнявся лише окремими колоніями та їх скупченнями (117-й а, б, в пасаж).

На середовищі з pH 6,7 колонії першої генерації розташовувалися скупченнями майже в половині пасажів (у трьох із семи), тоді як у другій — тільки окремо. Це свідчить про вплив терміну культивування на характер росту культури — перша генерація культивувалася в декілька разів триваліше, ніж друга.

Помічено, що кількість і розмір колоній мікобактерій генерацій на досліджуваному середовищі з різним pH відрізнялися. На середовищі з pH 6,5 кількість колоній домінувала в другій генерації мікобактерій, проте величина виявилася подібною до першої генерації; з pH 6,7 кількість і розмір колоній домінували в першій генерації мікобактерій; з pH 7,1 кількість колоній виявилася майже однаковою, за виключенням 117-го пасажу першої генерації, де вона була численною. Щодо розміру колоній мікобактерій першої генерації, то вони були дрібні та значні у всіх пересівах (окрім 120-го, де відмічено наявність лише дрібних колоній, та 122-го, де були тільки великі). У другій генерації

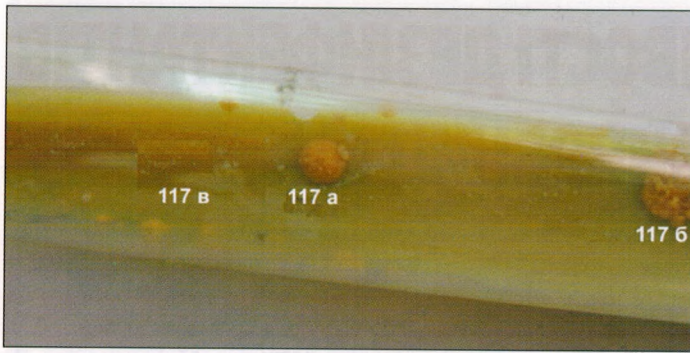


Рис. 1. Колонії *M. bovis* першої генерації, культивованих за $t\ 3^{\circ}\text{C}$

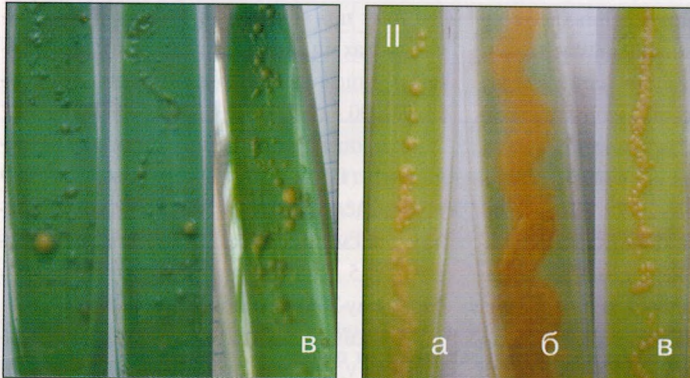


Рис. 2. Культура *M. bovis* дисоціативних форм 117-го пасажу, яка сформована за $t\ 3^{\circ}\text{C}$: I – двотижнева, II – чотиритижнева друга генерація

ції спостерігались здебільшого дрібні колонії та лише в 117-му (а, б, в) та 118-му пасажах – середні й великі, що і надалі формували суцільний ріст (рис. 3).

Форма колоній на середовищі з різним рН у першій та другій генераціях була правильною (за виключенням 183-го пасажу другої генерації з рН 6,5; 175-го пасажу першої генерації з рН 6,7 – неправильно; 117-го пасажу першої генерації з рН 7,1 – змішана).

Поверхня колоній виявилася гладенькою (S-форма) у переважній більшості першої та другої генерацій, за виключенням колоній 116–119-го пасажів першої генерації на середовищі з рН 7,1 (гладенька і шорстка) та 122-го пасажу (шорстка). За консистенцією колонії здебільшого були крихкими і сухими, а на середовищі з рН 6,5 першої генерації – крихкими та щільними, другої – крихкими.

Проте чітку здатність утворювати пігмент в умовах традиційного культивування за $t\ 37^{\circ}\text{C}$ виявлено в окремих колоній першої (178, рН 6,5; 173, рН 6,7; 117,

рН 7,1) та другої (170; 177, рН 6,5; 117, рН 7,1) генерацій. Водночас за прозорістю й емульгованістю колонії всіх пересівів і генерацій практично не відрізнялися – м'якова та помірна відповідно.

Отже, дослідження культуральних особливостей *M. bovis* багаторазово пасажованого штаму через штучне середовище з різним рН та його дисоціативних форм засвідчили, що еволюційно закладена здатність забезпечує біологічний цикл, який передбачає конверсію (трансформацію) з набуттям можливостей розмножуватися і формувати колонії на середовищі з різним рН за низьких плюсових температур. Такі риси збудника з'являються в популяції як кислотостійких вірулентних мікроорганізмів, так і в таких, що втратили ці властивості. Вони здатні утворювати колонії різні за формою, структурою, а окремі з них – продукувати пігмент.

ВИСНОВКИ

1. Збільшення кількості пасажів *M. bovis* за $t\ 37^{\circ}\text{C}$ через щіль-

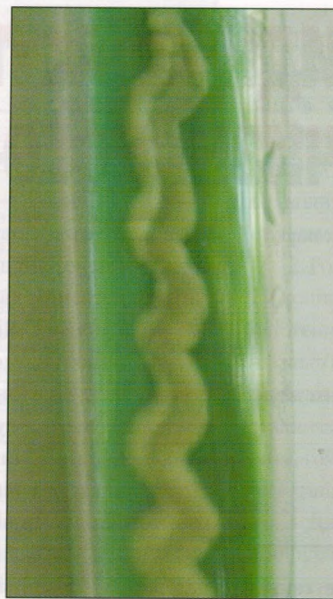


Рис. 3. Культура *M. bovis* другої генерації 118-го пасажу

не живильне середовище супроводжується підвищенням вірогідності формування окремо видних колоній за температури 3°C .

2. Інтенсивність росту колоній (культури) за $t\ 3^{\circ}\text{C}$ не залежить від інтенсивності їх формування за температури 37°C .

3. У процесі біологічного циклу *M. bovis* з'являються дисоціативні форми незалежно від вмісту в середовищі кислотних грам-еквівалентів та вірулентності материнської популяції, проте значно раніше на такому з рН 7,1, ніж з рН 6,5 і 6,7. Особливістю культуральних властивостей нових рис конверсованих (трансформованих) форм *M. bovis* є здатність продукувати пігмент і в субкультурах, що формуються за низьких плюсових температур.

Перспективи досліджень

Морфологічні ознаки, тинкторіальні й вірулентні властивості дисоціативних форм *M. bovis* та їх ліпідний склад.

ЛІТЕРАТУРА

1. Асташова Е.А., Кадочкин А.М. Особенности морфогенеза Л-форм микобактерий туберкулёза бычьего вида // Ветеринария. – 1989. – №7. – С. 31–34.
2. Білан М.В., Давиденко П.М., Ковальова Л.О. та ін. Морфоло-

гічні аспекти реверсії неацидотостійких ниткоподібних *M. bovis* в бактеріальну кислотостійку форму / Зб. наук. праць Всеукраїнської наук.-практ. конф. «Сучасні проблеми туберкульозу в Україні: причини та шляхи їх подолання» (28 листопада 2008 р.). – К., 2008. – С. 149–153.

3. Вейсфейлер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулёза и атипичные микобактерии. – Будапешт: Издво АН Венгрии, 1975. – 336 с.

4. Космодамианский В.Н. Бактериология и патогенез туберкулёза. – М.: Медгиз, 1950. – 198 с.

5. Ткаченко О.А., Білан М.В., Зажарський В.В. Поліморфізм і мінливість *M. bovis* швидко- та повільнорослих штамів // Ветеринарна медицина України. – 2009. – №3 – С. 30–33.

РЕЗЮМЕ

Биологические свойства диссоциативных форм *M. bovis*: культуральные особенности при температурах 3 и 37°C. А.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Мискив и др.

В работе показано неизвестное до сегодняшнего дня свойство у конверсированных (трансформированных) форм *M. bovis*: размножение при низких плюсовых температурах (3°C) и формирование колоний, в т. ч. и с продуцированием пигмента. При таких условиях культивирования микобактерии формируют колонии, которые при традиционных температурах редко образуют (или не образуют).

Biological properties of dissociative *M. bovis* forms: cultural features at 3 and 37°C. А.А. Tkachenko, М.В. Bilan, V.V. Miskiv et al.

In work has been shown property of converted (transformed) *M. bovis* forms, that is unknown for present time: reproduction at low temperature above zero (3°C) and formation colonies, including colonies with pigment production. Under these conditions of cultivation form colonies those mycobacterium, that at traditional temperatures form it rarely (don't form).