



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **68635** (13) **U**
(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2011 06946</p> <p>(22) Дата подання заявки: 02.06.2011</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.04.2012</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2012, Бюл.№ 7</p>	<p>(72) Винахідник(и): Ткаченко Олексій Андрійович (UA), Білан Марина Володимирівна (UA), Давиденко Павло Олександрович (UA), Місків Віталій Валерійович (UA), Зажарський Володимир Володимирович (UA), Ковальов Анатолій Васильович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Ворошилова, 25, м. Дніпропетровськ, 49027 (UA)</p>
---	---

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ M. BOVIS КОНВЕРСОВАНИХ ФОРМ ЗА ТЕМПЕРАТУРИ 3 °C

(57) Реферат:

Спосіб культивування M. bovis конверсованих форм на щільних живильних середовищах.

UA 68635 U

Корисна модель належить до ветеринарної мікробіології і може бути використана для підвищення ефективності бактеріологічної діагностики туберкульозу тварин, селекції вакцинних штамів для конструювання препаратів специфічної профілактики хвороби.

5 Питання біологічних властивостей мікобактерій, зокрема бичачого виду, дотепер потребують вивчення, оскільки з'являються все нові й нові повідомлення авторів про особливості деяких з них. Так, в 2004 році повідомлено про *M. bovis* швидкорослого штаму, а в наступному - про втрату здатності швидко розмножуватися за пасажів через штучне живильне середовище. Також відмічено, що цей, згаданий вище штам *M. bovis*, на такому середовищі конверсує в некіслотостійкі паличкоподібні та ниткоподібні форми з паралельною зміною характеру росту культури: наліт, димка. (Ткаченко О. Швидкорослі *M. bovis* у проблемі туберкульозу // Ветеринарна медицина України. - 2004. - № 7. - С. 14-17. Поліморфізм і мінливість *M. bovis* швидко- та повільнорослих штамів / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В.Зажарський та інші // Ветеринарна медицина України. - 2009. - № 3. - С. 30-33. Морфологічні особливості реверсії некіслотостійких *M. bovis* у бактеріальну кислотостійку форму / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, Л.О.Ковальова, О.Є. Галатюк, // Ветеринарна медицина України. - 2009. - № 6.-С. 28-30).

Відмічено, що наступні пасажі мікобактерій змінених форм через штучне живильне середовище з різним рН призводять до появи L-форм, та певний період зберігають здатність, реверсувати у вихідні кислотостійкі палички збудника туберкульозу бичачого виду. (Морфологічні особливості реверсії некіслотостійких *M. bovis* в бактеріальну кислотостійку форму / Ткаченко О.А., Білан М.В., Ковальова Л.О., Галатюк О.Є. // Ветеринарна медицина України. - 2009. - № 6 - С. 28-30).

Між тим авторами акцентовано, що в окремих випадках поява форм мікобактерій, конверсія та реверсія супроводжувалися втратою мікобактеріями вихідної здатності формувати колонії.

25 На такому фоні зміни властивостей мікобактерій бичачого виду, необхідно було з'ясувати, чи не набули багаторазово пасажовані через штучне живильне середовище *M. bovis* здатність розмножуватися та формувати колонії за значно нижчої, ніж традиційна температури.

Відомо, що оптимальна температура для росту *M. bovis* на штучних живильних середовищах 37-38 °С, хоча вони можуть рости в діапазоні 36-39 °С. За кімнатної (18-22 °С) та підвищеної (45 °С) температури мікобактерії туберкульозу не ростуть. (Туберкулёз животных и меры борьбы с ним / Ю.Я. Кассич, А.Т. Борзяк, А.Ф. Кочмарский и др.; Под ред. Ю.Я. Кассича. // К.: «Урожай», 1990. - 340 с).

Тест з визначення росту культури за різних температур є одним з основних критеріїв в диференціальній діагностиці *M. bovis* від мікобактерій пташиного виду та деяких атипичних. (Туберкулёз сельскохозяйственных животных / Под ред. В.П. Шишкова, В.П. Урбана - М.: Агропромиздат, 1991. - 255 с).

З літературних джерел відомо, що *M. kansasii*, *M. gordonae* і *M. scrofulaceum* ростуть як за температури 37 °С, так і за кімнатної температури (20-22 °С), проте дещо повільніше. *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. smegmatis* ростуть як за температури 22-37 °С, так і за 45 °С і частіше - за кімнатної температури (18-22 °С). Інший термостабільний сапрофіт - *M. phlei* може рости навіть за температури 52 °С. Того самого часу швидкорослий мікроорганізм *M. fortuitum* добре росте лише за температур 22 та 37 °С. За більш високих температур він гине. (Туберкулёз сельскохозяйственных животных / Под ред. В.П. Шишкова, В.П. Урбана -М.: Агропромиздат, 1991. - 255 с).

45 Вивчення умов культивування *M. bovis* конверсованих форм на штучному живильному середовищі за температури 3 °С раніше не досліджувались.

Задачею корисної моделі є розробка способу культивування *M. bovis* за температури 3 °С.

Поставлена задача досягається тим, що проводять культивування *M. bovis* за температури 3 °С.

50 Приклад 1

На початку дослідів виявляли вплив тривалості культивування на інтенсивність росту культури за температури 3 °С, її залежність від кількості пасажів та інтенсивності росту мікобактерій в термостаті (за 37 °С). Для цього відбирали *M. bovis* восьми пасажів (у проміжку 168-188 пересівів), які культивувалися в термостаті протягом трьох місяців на середовищі з рН 6,5 (по три пробірки кожної генерації); семи пасажів (168-180) - з рН 6,7; семи (116-123) - з рН 7,1 та переносили для подальшого культивування за 3 °С на термін від 9 до 20 місяців.

60 По закінченні цих термінів так само, як і після культивування за температури 37 °С, проводили облік й характеризували ріст колоній мікобактерій (культур). (Настанова по діагностиці туберкульозу / В.М. Манченко, З.Р. Троценко, М.С. Павленко та ін. - Київ, 1994. - 39 с).

У підсумку були одержані дані впливу тривалості культивування *M. bovis* за температури 3 °C на середовищі з різним рН на інтенсивність росту культури, її залежність від кількості пасажів та інтенсивності росту мікобактерій в термостаті (37 °C) (таблиця 1). У цілому, зі збільшенням кількості пересівів (37 °C) на досліджуваних середовищах підвищується вірогідність формування окремо видимих колоній (3 °C).

Аналіз результатів дослідження інтенсивності росту культури засвідчив: на середовищі з рН 6,5 до культивування за температури 3 °C макроскопічно сформованих колоній мікобактерій не відмічено; то після різнотривалого перебування за таких температурних умов колонії переважно формувалися мікобактеріями з більшою кількістю пасажів.

Подібну закономірність росту колоній виявлено й на середовищі з рН 6,7. Мікобактерії останніх генерацій за температури 3 °C стимулювали утворення колоній більш, як у два рази, а 175 генерація мікобактерій за відсутності росту за температури 37 °C стимулювала утворення значної кількості колоній за температури 3 °C.

Таблиця 1

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

рН середовища	Пасаж	Характер культури та кількість колоній (37 °C)	Тривалість культивування за 3 °C, місяці	Характер та кількість колоній (3 °C)
6,5	168	Ріст відсутній	19	Наліт по лінії посіву, 2 сірі колонії
	170	Ріст відсутній	18	Наліт-плями біло-жовті
	173	Наліт	13	Суцільний білий наліт
	177	Наліт	11	Інтенсивний наліт кольору середовища
	178	Наліт	11	Інтенсивний наліт, 3 колонії жовтого відтінку
	179	Ріст відсутній	11	Інтенсивний біло-жовтий наліт, 2 біло-жовті колонії
	183	Наліт	10	1 велика біла колонія, наліт
	188	Наліт	9	2 дрібні колонії, наліт
6,7	168	4 дрібні колонії	20	Суцільний наліт, багато біло-зелених колоній
	170	4 дрібні колонії	20	3 великі біло-жовті колонії, 10 дрібних колоній
	173	4 колонії	13	Багато жовто-коричневих колоній (більше 20)
	175	Ріст відсутній	13	14 колоній із зеленим відтінком
	176	8 колоній	13	Багато сіро-жовтих колоній
	178	4 колонії	13	5 жовто-білих колоній
	180	Наліт	10	Наліт та 2 дрібні колонії зеленого кольору
7,1	116	Наліт	20	Суцільний наліт та шорсткі білі колонії (1 велика, 5 дрібних)
	117	Наліт	20	Багато дрібних білих гладеньких колоній, 1 велика шорстка помаранчева та 1 велика гладенька помаранчево-жовта
	118	5 дрібних колоній	20	Суцільний білий наліт, 1 велика біла шорстка колонія, 10 дрібних колоній
	119	5 дрібних колоній	18	Суцільний білий наліт, 1 велика біла шорстка колонія, 10 дрібних колоній
	120	Наліт	18	Суцільний біло-зелений наліт, 1 колонія зелено-біла
	122	Ледь помітний наліт	13	Суцільний білий наліт, 1 велика біла шорстка колонія
	123	Наліт	13	Наліт

На середовищі з рН 7,1 до перенесення дослідних зразків в умови 3 °C формувалися поодинокі колонії в 118 та 119 генераціях, тобто із семи у двох, у той час як культивування за температури 3 °C призвело до формування колоній на середовищах шести пробірок (генерація 116, 117, 118, 119, 120, 122), у тому числі збільшилася кількість колоній 118 та 119 пасажів.

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

Аналізуючи залежність росту колоній на середовищі в умовах температури 3 °C від тривалості цих умов, виявлено зворотну залежність частоти формування колоній. Зі зменшенням тривалості перебування досліджуваних проб в умовах низької плюсової температури збільшується частота появи колоній. Це може бути зумовлено більш глибокими, хоча й не з'ясованими, напевно, адаптивними змінами біологічних властивостей мікобактерій, з найбільшою кількістю генерацій, за яких у конверсованих в некіслотостійкі форми мікобактерій підвищується здатність (за окремим винятком, причому у віддалені строки) формувати колонії.

Отже, ці дослідження засвідчили, що інтенсивність розмноження *M. bovis* в умовах температури 3 °C більшою мірою залежать від генерації збудника (активації його адаптивних функцій за цього), тобто від кількості пасажів через живильне середовище, ніж від тривалості культивування за традиційної й низької плюсової температури. Таке явище характерне для

мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 6,5 та 6,7. На такому ж, тільки з рН 7,1 середовищі, така сама закономірність нечітко простежується, що може бути зумовлено іншими змінами біологічних властивостей мікобактерій під впливом такого вмісту в середовищі кислотно-лужних грам-еквівалентів. Перед усім це може стосуватися морфологічних ознак й тинкторіальних властивостей багаторазово пасажованих мікобактерій.

Обґрунтованими виявилися дослідження культуральних властивостей, зокрема колоній, які сформувалися в термостаті за температур 37 (пасаж 168-188, рН 6,5; 168-180, рН 6,7; 116-123 рН 7,1) та 3 °С в обох дослідах наприкінці культивування.

Приклад 2

Вивчають культуральні властивості *M. bovis*, які формували колонії за температури 3 °С (наприкінці досліду) на середовищі з рН 6,5, 6,7, 7,1: кількість, форму, величину, поверхню колоній, пігментоутворення, прозорість, емульгованість у фізіологічному розчині. (Настанова по діагностиці туберкульозу / В.М. Манченко, З.Р. Троценко, М.С. Павленко та ін. - Київ, 1994.-39 с).

Характеристика культуральних властивостей *M. bovis* першої (після термостату) та другої (пересів культури культивованої в термостаті, яка сформувалася за 3 °С) генерацій в умовах культивування на середовищі з рН 6,5 за 3 °С наведена в табл. 2.

Встановлено, що інтенсивність росту культури двох аналізованих генерацій практично не відрізняється, за винятком 170 пасажу другої генерації, де вона виявлялася пишною.

Проте за характером росту культури відрізнялися суттєво. Якщо в першій генерації ріст культури мікобактерій характеризувався нальотом та окремими колоніями, то в другій - практично окремими колоніями. Кількість сформованих колоній домінувала в другій генерації мікобактерій, а їх величина практично виявилася подібною, що вірогідно зумовлено тривалістю культивування, яка була, як мінімум, в три рази меншою, ніж за першої генерації.

Форма колоній виявилася іншою тільки у 183 пересіві другої генерації.

Поверхня колоній першої та другої генерацій була гладенькою.

Консистенція в першій генерації крихка та щільна й крихка - в другій. Чітке пігментоутворення зареєстровано тільки в окремих колоній першої (178) та другої (170, 177) генерацій, але за прозорістю відмінностей не відмічено - всі вони були матовими. Емульгованість колоній у фізіологічному розчині виявлялася слабкою.

Характеристика культуральних властивостей мікобактерій першої та другої генерацій на середовищі з рН 6,7 (за 3 °С) наведена у табл. 3.

Бачимо, що інтенсивність росту колоній мікобактерій першої генерації була вищою, ніж другої. Подібна закономірність зберігається і для характеру росту, де в першій генерації (майже в половині пасажів) колонії розташовуються скупченнями, а в другій - тільки окремо. Це свідчить про вплив терміну культивування: перша генерація культивувалася в декілька разів триваліше, ніж друга (13 і більше місяців та 3 місяці відповідно). Така ж тенденція відзначена й за кількістю та величиною колоній, яких було більше в першій генерації.

Зауважимо, що за формою, поверхнею та консистенцією колоній першої та другої генерацій мікобактерій практично не відрізняються, за винятком форми (неправильна) - у 175 пасажі та консистенції (волога) - у 168 пасажі першої генерації.

Найбільш вираженим було пігментоутворення у колоній 173 пасажу першої генерації (жовто-коричневий колір).

Усі сформовані колонії пасажів першої та другої генерацій мали матову прозорість та задовільну емульгованість.

Таблиця 2

Характеристика культуральних властивостей (колоній) *M.bovis* першої та другої генерацій, культивованих на середовищі з рН 6,5 за температури 3 °С

Пасаж	Генерація	Показник характеристики культуральних властивостей (колоній) <i>M.bovis</i>																					
		Інтенсивність росту			характер росту		кількість		Величина			форма		Поверхня (гладенька)	Консистенція		Пігментотворення (колір)			Прозорість (матова)	Емульгуваність (слабка)		
		Слабка	Помірна	Пишна	Наліт	Окремі колонії	Подинокі	Числені	Дрібні	Середні	Великі	Правильна	Неправильна		Крихка	Щільна	Непігментовані	Сіро-жовтий	Жовтий				
168	1	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
168	2	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
170	1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
170	2	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
173	1	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
173	2	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
177	1	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
177	2	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
178	1	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+
178	2	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
179	1	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
179	2	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
183	1	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
183	2	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
188	1	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+

Таблиця 3

Характеристика культуральних властивостей (колоній) *M.bovis* першої та другої генерацій, культивованих на середовищі з рН 6,7 за температури 3 °С

Пасаж	Генерація	Показник характеристики культуральних властивостей (колоній) <i>M.bovis</i>																												
		Інтенсивність росту			характер росту		Кількість		Величина		форма		Консистенція			Пігментотворення (колір)						Прозорість (матова)	Емульгуваність (задовільна)							
		Слабка	Помірна	Пишна	Наліт	Окремі колонії	Скупчення	Подиноки	Числені	Дрібні	Середні	Великі	Правильна	Неправильна	Поверхня (гладенька)	Крихка	Волога	Суха	Непігментовані	Сіро-жовтий	Жовто-коричневий			Зелений	Сірий	Білий	Біло-жовтий	Біло-зелений		
168	1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
168	2	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
170	1	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
170	2	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
173	1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
173	2	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
175	1	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
175	2	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
176	1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
176	2	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
178	1	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
178	2	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
180	1	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
180	2	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

5 Характеристика культуральних властивостей *M bovis* першої генерації (пересів культури, яка формувалася за 3 °С після культивування в термостаті) та другої (пересів культури першої генерації) на середовищі з рН 7,1 за температури 3 °С наведена в табл. 4.

10 Оскільки колонії мікобактерій першої генерації 117 пасажу мали відмінні культуральні характеристики, а саме: (а) помаранчеві колонії з гладенькою; (б) шорсткою поверхнею та (в) білі гладенькі колонії, було вирішено дослідити їх кожен окремо, тому *M. bovis* другої генерації представлені 117(а), 117(б), та 117(в) пасажами.

Аналізуючи дані табл.4 встановили, що інтенсивність росту культури двох генерацій мала суттєві відмінності. Так, *M bovis* першої генерації росли помірно, а другої - слабо, за винятком 117 (а, б, в) пасажу, де відмічено пишну інтенсивність росту. Мікобактерії цих варіантів першої генерації утворювали наліт та окремі колонії, тоді як, в другій - лише окремі колонії та їх скупчення.

Відмічено поодинокі колонії в першій (крім 118 пасажу) та в другій генераціях, за виключенням 117 пасажу, де їх кількість була численною.

Величина колоній мікобактерій першої генерації була дрібною та великою за всіх пересівів, (крім 120, де відмічено наявність лише дрібних, та лише великих - 122). У другій генерації спостерігалися в основному дрібні колонії і тільки в 117 (а, б, в) та 118 пасажах середні й великі, які в подальшому формували суцільний ріст.

Форма колоній мікобактерій першої та другої генерацій була правильною, крім 117 пасажу першої генерації, де вона була змішаною: правильна й неправильна.

Поверхня колоній 116-119 пасажів першої генерації характеризувалась як гладенька та шорстка, 120 - гладенька та 122 - шорстка, у всіх інших пересівах гладенька.

Консистенція колоній була крихкою та сухою.

Таблиця 4

Характеристика культуральних властивостей (колоній) *M.bovis* першої та другої генерацій, культивованих на середовищі з рН 7,1 за температури 3 °С

Пасаж	Генерація	Показник характеристики культуральних властивостей (колоній) <i>M.bovis</i>																							
		інтенсивність росту			характер росту		кількість		величина			форма		Поверхня		Консистенція		пігментоутворення (колір)					Прозорість (матова)	Емульгуваність (задовільна)	
		Слабка	Помірна	Пишна	Наліт	Окремі колонії	Скупчення	Поодинокі	Численні	Дрібні	Середні	Великі	Правильна	Неправильна	Гладенька	Шорстка	Крихка	Суша	Сіро-жовтий	Помаранчевий	Сіро-білий	Білий			Біло-зелений
116	1	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
116	2	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
117	1	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
117а	2	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
117б	2	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
117в	2	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
118	1	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
118	2	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
119	1	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
119	2	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
120	1	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
120	2	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
122	1	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
122	2	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
123	1	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
123	2	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+

Примітка: величина колоній: дрібні - величиною на межі видимості; середні - до 1 мм в діаметрі; великі - більше 1 мм.

Пігментоутворення притаманне для всіх колоній. У першій генерації переважаючим був білий колір, крім 116-117 пасажів, відмічений ще й помаранчевий, та 119 - біло-зелений, а в другій - сіро-білий в усіх пасажах та сіро-жовтий в 117а, б, в.

Колонії матові, задовільно емульгуються.

Приклад 3

Вивчали морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості *M. bovis*, які культивовані за температури 3 °С. Готували мазки шляхом нанесення на скельце зависі мікобактерій бактеріологічною петлею. Висушені та фіксовані мазки фарбували за Ціль-Нільсеном. (Настанова по діагностиці туберкульозу / В.М. Манченко, З.Р. Троценко, М.С. Павленко та ін. - Київ, 1994. - 39 с).

Дані морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей *M. bovis* першої та другої генерацій, культивованих на середовищі з рН 6,5 за температури 3 °С узагальнені в табл. 5.

Встановлено, що мікобактерії досліджуваних пересівів першої генерації утримують фарбу фуксину (кислотостійкі), хоча в окремих випадках серед них зустрічаються й некислотостійкі форми (170 і 183). Тільки в одному пересіві з цієї генерації (178) колонії формували некислотостійкі варіанти (форми) мікроорганізму. В той же час в другій генерації колонії

формували в значній кількості (у 3 з 8 пересівів) тільки невисотостійкі форми, ще в двох - невисотостійкі та висотостійкі. Таке явище можна пояснити тривалістю культивування мікобактерій, оскільки друга генерація за часом менше культивувалася в декілька разів. Це могло вплинути на тинкторіальні властивості досліджуваних мікроорганізмів.

5 Підкреслимо, що одна культура (пересів 168, друга генерація) формувалася висотостійкими елементарними тільцями. Їх кількість в полі зору мікроскопа виявилася не досить значною (скупчень не виявлено). У 188 пересіві першої генерації такі морфологічні форми (висотостійкі тільця) вміщувалися поряд з паличкоподібними варіантами мікобактерій.

10 Усі мікроорганізми досліджуваних пересівів, як першої, так і другої генерації, мали форму прямих паличок із заокругленими кінцями, за винятком 170 пересіву, де вміщувалися й нитчасті форми. Крім цього, 170 пересів другої генерації поряд з висотостійкими паличками містив й невисотостійкі овали з різною оптичною щільністю поверхні.

15 За довжиною мікроорганізмів суттєвої різниці не виявлено: домінували короткі мікобактерії. Це стосується й товщини, в переважній більшості тонкі, іноді виявлялися як тонкі, так і товсті форми мікроорганізмів переважно першої генерації (у 3 з 8 пересівів).

Щодо зернистості, то в двох культурах першої генерації (173 та 179) мікобактерії були зернисті, у той час як другої - тільки в одній (173 пересів).

У табл. 6 наведено дані морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей *M. bovis* першої та другої генерації, культивованих на середовищі з рН 6,7 за температури 3 °С.

20

Таблиця 5

Характеристика морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей *M.bovis* першої та другої генерації в умовах культивування на середовищі з рН 6,5 за температури 3 °С

Пасаж	Генерація	Тинкторіальні властивості		Морфологічні ознаки													
		Кислотостійкі	Некислотостійкі	довжина			товщина		форма			Кінці (заокруглені)	Зернистість	Розташування		Елементарні тільця (кислотостійкі)	овали (L-форми, не висотостійкі)
				Довгі	Короткі	Коккоподібні	Тонкі	Товсті	Прямі	Вигнуті	Нитчасті			Скупчення	Поодинокі		
168	1	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	2															+	-
170	1	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
	2	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
173	1	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
177	1	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
178	1	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	2	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
179	1	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
	2	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
183	1	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	2	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
188	1	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
	2	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-

25 Аналіз результатів дослідження показав, що мікроорганізми всіх культур першої та другої генерації володіють вираженою висотостійкістю і мають паличкоподібну форму. Мікобактерії першої генерації виявилися довшими від традиційних на фоні коротких кокоподібних форм. Збудники другої генерації в більшості мали короткі форми, і тільки культура 175-176 пересівів формувалася як довгими, так і короткими мікобактеріями. Того ж часу, мікобактерії усіх пересівів були тонкими, за формою досліджувані збудники виявилися прямими і вигнутими, із заокругленими кінцями. Зазначимо, що всі форми мали виражену зернистість, тобто вміщували ту чи іншу кількість зерен (іноді до 12). Одночасно характерним є скупчене розміщення мікобактерій у першій генерації. Для другої генерації показовим є більш поодинокі розміщення мікроорганізмів у полі зору мікроскопа, хоча й зустрічаються скупчення мікобактерій. Крім цього, тільки в одній культурі із семи пасажів другої генерації (173) зареєстровані лише висотостійкі елементарні тільця, хоча ці утворення виявлялися в різних кількостях у культурах (колоніях) інших пересівів другої генерації. У першій генерації таких утворень не виявлено в культурах жодного із пересівів.

35

Характеристика морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей *M.bovis* першої та другої генерації в умовах культивування на середовищі з рН 6,7 за температури 3 °С

Пасаж	Генерація	Тинкторіальні властивості		Морфологічні ознаки												
		Кислотостійкі	Некислотостійкі	довжина			товщина		форма		кінці (заокруглені)	Зернистість	розташування		елементарні тільця (кислотостійкі)	Овали (L-форми, не кислотостійкі)
				Довгі	Короткі	Кокоподібні	тонкі	товсті	прямі	вигнуті			Скупчення	Поодинокі		
168	1	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
170	1	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	2	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
173	1	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
175	1	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
176	1	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
178	1	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
180	1	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
	2	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-

Характеристика результатів морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей *M. bovis* першої та другої генерації, культивованих на середовищі з рН 7,1 за температури 3 °С, наведена в табл. 7.

5 У ході аналізу встановлено, що мікобактерії першої генерації утримують фарбу фуксину (кислотостійкі) і лише в одному, 117 пересіві, виявлена мішана культура (кислотостійкі та некислотостійкі). У другій генерації тільки в чотирьох пересівах із семи, колонії формувалися кислотостійкими формами, в інших 117а і 119 мішаними, а 117б і в - тільки некислотостійкими.

10 Майже всі колонії, які стимульовані мікроорганізмами у формі паличок, вміщували кислотостійкі елементарні тільця (пасажі 120 і 122 першої генерації та 117 (а, б, в), 118 і 119 відповідно другої). Винятком виявилася культура 118 пасажу другої генерації, яка формувалася некислотостійкими овалами (L-форми) з різною оптичною щільністю поверхні та, як правило поодиноких кислотостійких елементарних тілець.

15 За довжиною мікобактерії суттєво не відрізнялися проте дещо домінували короткі форми. У 117 пересіві першої генерації відмічалася наявність поміж інших і кокоподібних форм, а в другій генерації цього ж пересіву - довгих й коротких паличок та кокоподібних форм (117б). Протилежне явище відмічено в культурі 119 пасажу, де в першій генерації були довгі й короткі палички, а в другій - кокоподібні.

20 Стосовно товщини мікроорганізмів, то в першій генерації це товсті й тонкі, а в другій - переважно тонкі.

Культури першої генерації 116-118 пасажів формувалися мікобактеріями прямої та вигнутої форм, а всі інші пересіви мікроорганізмами прямої форми. Проте всі вони мали заокруглені кінці.

25 Щодо зернистості, то в *M.bovis* першої генерації вона була присутня, крім 117 пасажу, тоді як мікобактерії другої генерації її зберегли тільки в 116 та 123 пасажах.

Характерна спільна властивість для мікобактерій обох генерацій - скупчене розташування.

Характеристика морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей *M. bovis* першої та другої генерації в умовах культивування на середовищі з рН 7,1 за температури 3 °С

Пасаж	Генерація	Тинкторіальні властивості		Морфологічні ознаки												
		Кислотостійкі	Некислотостійкі	Довжина			Товщина		Форма		Кінці (заокруглені)	Зернистість		Розташування (скупчення)	Елементарні тілця (кислотостійкі)	Овали (Л-Форми, не кислотостійкі)
				Довгі	Короткі	Кокподібні	Тонкі	Товсті	Прямі	Вигнуті		Виражена	Відсутня			
116	1	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
	2	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
117	1	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
117a	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
117б	2	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
117в	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
118	1	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
119	1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	2	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
120	1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	2	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-
122	1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	2	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-
123	1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	2	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-

Отже, багаторазові пасажі *M. bovis* одного швидкорослого штаму на середовищі з різним рН сприяли дисоціації з появою різних варіантів мікобактерій, що принципово відрізняються за морфологічними ознаками, тинкторіальними, культуральними й іншими властивостями. Явищу дисоціації передували, напевно, й зміни хімічного складу клітинної стінки, оскільки досить легко змінюються тинкторіальні властивості (кислотостійкість). Усі ці фактори не могли не вплинути на метаболізм мікобактерій. Це, безумовно, змінило характер розмноження мікроорганізмів. Скудний в часі, а іноді взагалі відсутній ріст мікобактерій в останніх досліджуваних пасажах, за 37 °С, сприяв зміні метаболізму, стимулюючи, генетично потенційну здатність до обмінних процесів мікробної клітини за низьких плюсових температур.

З метою виявлення можливого впливу кількості пасажів на швидкість формування колоній на середовищі з різним рН проведено паралельне дослідження описаних вище культур, за температури культивування 3 та 37 °С. Для цього використано культури мікобактерій, які одержані на середовищі за температури 3 °С.

Приклад 4

Попередньо готували завись *M. bovis*: 1 мг культури на 1 см³ фізіологічного розчину з колоній кожного пасажу, які утворилися на середовищі за температури 3 °С та висівали на живильне середовище трьох пробірок з відповідним рН 6,5; 6,7; 7,1 та подальшим культивуванням за температур 3 та 37 °С.

Вплив кількості пасажів на інтенсивність розмноження *M. bovis* на середовищі з рН 6,5; 6,7; 7,1 за температур 3 та 37 °С наведено в табл. 8, 9, 10.

Встановлено, що на живильному середовищі з рН 6,5 за низької плюсової температури початок росту колоній відмічається здебільшого на 10 добу, у той час як за 37 °С - тільки на 45 добу (170 пасаж). Мікобактерії усіх інших пасажів (за 37°С) почали формувати колонії в більш віддалені терміни (на 52 та 59 добу).

Особливістю культивування мікобактерій за таких температур на середовищі з рН 6,5 є низька інтенсивність розмноження збудника, що супроводжується формуванням поодиноких колоній (2-5). Водночас за умов низької плюсової температури в деяких пасажах (170) спостерігається значна інтенсивність розмноження з великою кількістю утворених колоній (хоча й у віддалені терміни: на 66 добу). Отже, ці дослідження підтвердили здатність мікобактерій

розмножуватися, накопичуватися на штучному живильному середовищі за температури, яка вважається непридатною для метаболізму цих мікроорганізмів.

За температури 3 °C відбувається в 4-5 разів швидше розмноження та відповідно формування колоній, ніж за температури 37 °C. Це може бути зумовлено зміною біохімічного складу в процесі багаторазових пасажів через штучне живильне середовище.

Очевидним стало те, що інтенсивність розмноження мікобактерій, а й відповідно швидкість та кількість сформованих колоній визначаються кількістю генерацій (пасажів) *M. bovis* та їх конверсованих форм.

Таблиця 8

Вплив кількості пасажів на інтенсивність розмноження *M. bovis* на живильному середовищі з рН 6,5 за температури 3 та 37 °C

Пасаж	t°C	Доба культивування, кількість колоній										
		10	17	24	31	38	45	52	59	66	73	80
168	3	2	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5
	37	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1
170	3	5	6	6	6	6	6	6	6	20	20	20
	37	-	-	-	-	-	2	2	3	4	5	5
173	3	-	2	2	3	3	3	3	3	3	3	4
	37	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	2
177	3	-	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	37	-	-	-	-	-	-	1	1	2	3	3
178	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	37	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
179	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	37	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
183	3	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3
	37	-	-	-	-	-	-	2	2	3	3	3
188	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	37	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1

Примітка: - кількість колоній на початку росту культури

10

Провівши подібні дослідження з мікобактеріями, які культивовані на середовищі з рН 6,7 за двох температурних режимів, ми одержали практично ідентичні результати: поодинокі колонії, які формувалися на 11 добу за умов 3 °C та на 46-60 добу за традиційної температури культивування (табл. 9). В одній культурі (180 пасаж) відмічено найбільшу кількість колоній наприкінці дослідження.

15

На середовищі з рН 7,1 за температури 3 і 37 °C встановлено (табл. 10), що початок росту, тобто, формування колоній за низької плюсової температури відбувся на одинадцятую добу, за винятком 117 пасажу, де ріст відмічено на четверту добу. За традиційної температури культивування (37 °C) колонії з'явилися на 25 добу, крім 117 пересіву - на 11 добу. На цей період спостережень, інтенсивність росту мікобактерій була слабкою і характеризувалась появою поодиноких колоній.

20

Таблиця 9

Вплив кількості пасажів на інтенсивність розмноження *M. bovis* на живильному середовищі з рН 6,7 за температури 3 та 37 °C

Пасаж	t°C	Доба культивування, кількість колоній										
		11	18	25	32	39	46	53	60	67	74	81
168	3	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	37	-	-	-	-	-	2	2	2	3	3	4
170	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	37	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1
173	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	37	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1

Продовження таблиці 9

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	12
175	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	37	-	-	-	-	-	1	1	1	2	2	2
176	3	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5
	37	-	-	-	-	-	-	-	2	2	3	3
178	3	-	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	37	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2
180	3	5	5	5	5	55	5	5	5	5	8	11
	37	-	-	-	-	-	2	2	2	3	3	4

Примітка: - кількість колоній на початку росту культури

У подальшому, інтенсивність розмноження мікобактерій за температури 3 °С характеризувалася пишним ростом лише в 117 (а, б, в) пасажі, що вже на 25 добу культивування сприяло значному збільшенню кількості колоній (більше 25). В інших субкультурах виявлявся помірний ріст, який характеризувався поступовим утворенням нових колоній, зазвичай до десяти.

Між іншим, за температури 37 °С інтенсивність розмноження мікроорганізмів 117 пасажу характеризувалася помірним ростом та поступовим збільшенням кількості колоній за період спостереження, з максимальною їх кількістю на 60 добу; мікобактерії інших пересівів мали слабкий ріст, за якого формувалося до 5 колоній.

Виходячи з даних табл. 9 та 10, можна, як і в першому випадку, стверджувати, що вплив кількості пасажів на інтенсивність розмноження мікобактерій і за низької плюсової температури, і за традиційної не простежується.

Таблиця 10

Вплив кількості пасажів на інтенсивність розмноження *M. bovis* на живильному середовищі з рН 7,1 за температури 3 та 37 °С

Пасаж	t°C	Доба культивування, кількість колоній									
		4	11	18	25	32	39	46	53	60	67
116	3	-	1	1	2	3	4	4	4	5	5
	37	-	-	-	1	1	2	2	2	2	2
117а	3	3	7	9	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
	37	-	1	1	2	2	2	2	3	4	4
117б	3	3	10	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
	37	-	1	1	1	2	4	5	5	8	10
117в	3	1	6	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
	37	-	5	5	8	8	10	11	12	14	14
118	3	-	2	3	3	5	5	5	5	5	6
	37	-	-	-	1	1	2	2	2	2	2
119	3	-	3	5	8	8	9	9	9	10	10
	37	-	-	-	2	2	2	2	3	3	3
120	3	-	1	1	2	2	3	4	4	6	7
	37	-	-	-	1	2	2	3	3	3	4
122	3	-	1	2	2	24	4	4	5	5	7
	37	-	-	-	1	1	2	2	2	3	3
123	3	-	1	2	2	2	3	3	5	5	8
	37	-	-	-	1	1	2	2	2	3	4

Примітка: »>» - більше
 - кількість колоній на початку росту культури

Отже, за допомогою різних сенсорних і регуляторних механізмів мікобактерії в умовах багаторазових пасажів, перебудовуючи роботу свого генетичного апарату, змінюючи морфологічні ознаки та культуральні властивості (відсутній ріст колоній за традиційних температурних режимів культивування у віддалені строки пасажування), зберігають свою

життєздатність та набувають властивостей розмножуватися за низьких плюсових температур. Це не вивчена й не описана раніше властивість *M. bovis*. Такий методичний підхід культивування *M. bovis* суттєво підвищує ефективність селекції мікроорганізмів, особливо їх дисоційованих та таких форм, які не культивуються (не формують колоній за звичайних температур), що важливо для одержання вакцинних штамів.

Тому розроблений спосіб забезпечує достовірно ефективніше культивування *M. bovis* конверсованих форм за 3 °С, ніж за 37 °С. Під час цього колонії формувалися значно раніше (на 21 добу), інтенсивніше та в більшій кількості.

10 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб культивування *M. bovis* конверсованих форм на щільних живильних середовищах, який **відрізняється** тим, що для підвищення адаптивної здатності мікроорганізмів, культивування проводять при температурі 3 °С.

15

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601