

УДК 619:616:98:579.873.21:636.2

КУЛЬТУРАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА МОРФОЛОГІЧНІ І ТИНКТОРІАЛЬНІ ОЗНАКИ ДИСОЦІАТИВНИХ ФОРМ MYCOBACTERIUM BOVIS КУЛЬТИВОВАНИХ ЗА 3 ТА 37° С

КУЛІШЕНКО О. М. к. вет. н., доцент
ДАВИДЕНКО П. О. к. вет. н., доцент
ГЛЕБЕНЮК О.Г. лікар вет. медицини
ЛИСЕЧКО В.Г. студент
РОСТКОВ С.А. студент

Дніпропетровський державний аграрно-
економічний університет
м. Дніпропетровськ
1980oleg.80@mail.ru

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.

Встановлено, що за пасажування *M. bovis* дисоціативних форм субкультур 117 а, 117 б, 117 в, 118, за різних температур 3 та 37° С, вони набули стійкої властивості культивування за низьких плюсових температур (3°С) та втратили здатність розмножуватися за температури термостата (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 атипових мікобактерій, типовими представниками яких є *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. aquae*.

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

Мікробна дисоціація, культуральні властивості *M. bovis*, кислотостійкість, морфологічні та тинкторіальні ознаки мікобактерій

Багаторічними дослідженнями кафедри епізоотології та інфекційних хвороб ДДАЕУ було отримано чотири клони некислотостійких дисоціативних форм мікобактерій, які принципово відрізнялися за своїми культуральними, сенсифілізуючими та патогенними властивостями, морфологічними і тинкторіальними ознаками від вихідного епізоотичного штаму *M. bovis* [1-8]. 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.

Перспективним було з'ясування властивостей у отриманих дисоціантів за подальшого пасажування за різних температур.

Метою дослідження було вивчення культуральних властивостей, морфологічних і тинкторіальних ознак *M. bovis* дисоціативних форм

культивованих за 3 та 37° С.

Матеріали і методи дослідження. Робота виконувалася впродовж 2014-2015 років на базі навчально-дослідної лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб ДДАЕУ. Пересів культур *M. bovis* дисоціативних форм здійснювали методом прямого пересіву на щільне яєчне 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 подальшому їх фарбували за методом Ціля-Нільсена і підда-

вали мікроскопії з фотографуванням під мікроскопом Micromed з вмонтованою фотокамерою в інтерфейсі з ноутбуком зі спеціальним програмним забезпеченням.

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

У результаті досліджень культуральних властивостей дисоціативних форм *M. bovis* сотої та наступних генерацій (таблиця, рис. 2, 3) було встановлено, що за пасажування субкультур 117а, 117б, 117в та 118 за температури 37° С ріст колоній спостерігався на 8-14 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, при чому під кінець дослідження від 106 до 120 генерацій спостерігалось пришвидшення росту вищезазначених субкультур відповідно 4-5 добу. Під час культивування цих же субкультур за температури 37° С спостерігалась тенденція до затримки росту. На початку культивування ріст культур спостерігався на 8-10 добу, а вже у наступних пересівах на 13-14 добу з наступ-

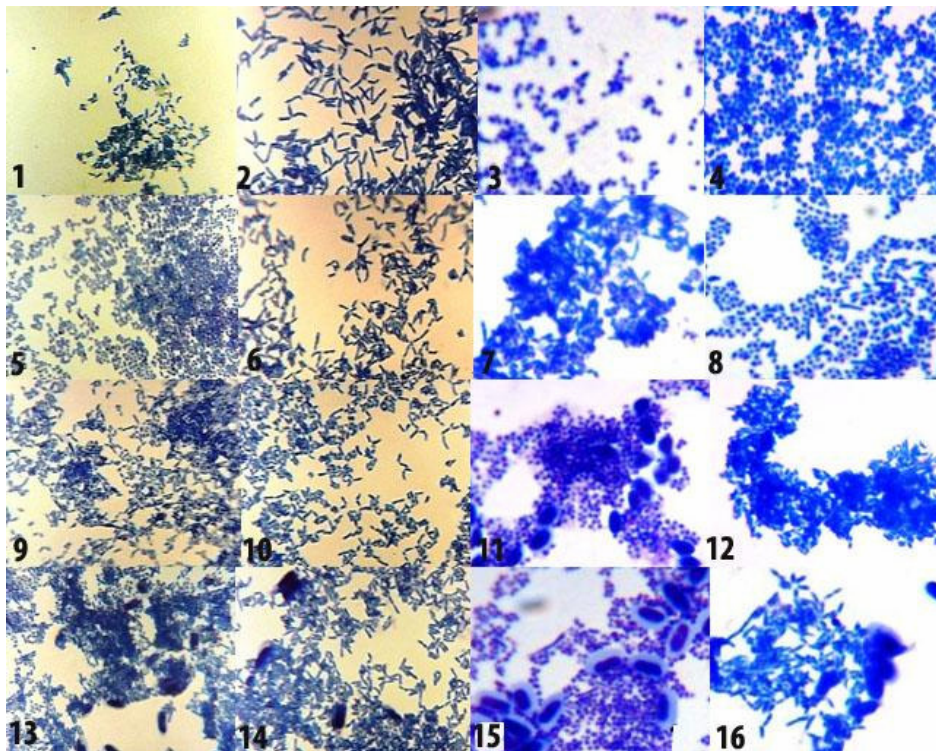


Рис. 1. Морфологічні та тинкторіальні ознаки *M. bovis* дисоціативних форм:

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.

Таблиця. Культуральні властивості *M. bovis* дисоціативних форм субкультур 117а, 117б, 117в та 118 культивованих за 3 та 37° С

№ пасажу	Субкультура							
	117а		117б		117в		118	
	температура, ° С							
	3	37	3	37	3	37	3	37
1	2	3	4	5	6	7	8	9
101	6	9	7	8	8	8	8	10
102	9	14	8	11	9	12	7	13
103	6	13	6	14	5	13	7	13
104	5	—*	6	—	5	—	6	—
105	5	—	6	—	5	—	6	—
106	4	—	5	—	6	—	5	—
107	4	—	5	—	4	—	6	—
108	4	—	5	—	4	—	5	—
109	4	—	5	—	4	—	5	—
110	4	—	5	—	4	—	5	—
111	4	—	5	—	4	—	4	—
112	4	—	5	—	4	—	5	—
113	4	—	4	—	5	—	4	—
114	4	—	5	—	5	—	4	—
115	4	—	4	—	5	—	4	—
116	4	—	5	—	4	—	4	—
117	4	—	4	—	5	—	4	—
118	4	—	4	—	4	—	4	—
119	4	—	4	—	4	—	4	—
120	4	—	4	—	4	—	4	—

Примітка:—* – відсутність росту.

ним припиненням росту.

Культури 100 генерації *M. bovis* дисоціативних форм мали наступне 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. 4).

Упродовж 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 дослідів 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 113 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* 117б 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 помара-

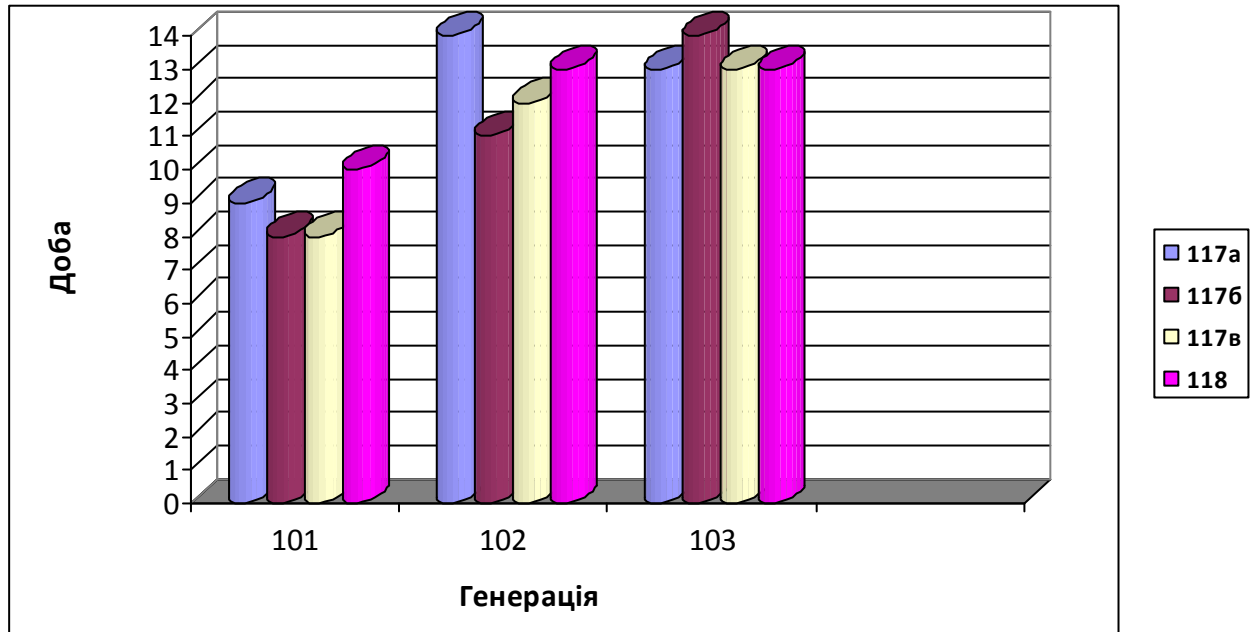


Рис. 2. Початок росту дисоціативних форм *M. bovis* субкультури 117 а, 117 б, 117 в та 118, культивованих за температури 37° С

нчевий 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. gordonae*, *M. aquae* [4].

Із вищезазначеного можна зробити висновок, що під час пасажів за низьких температур

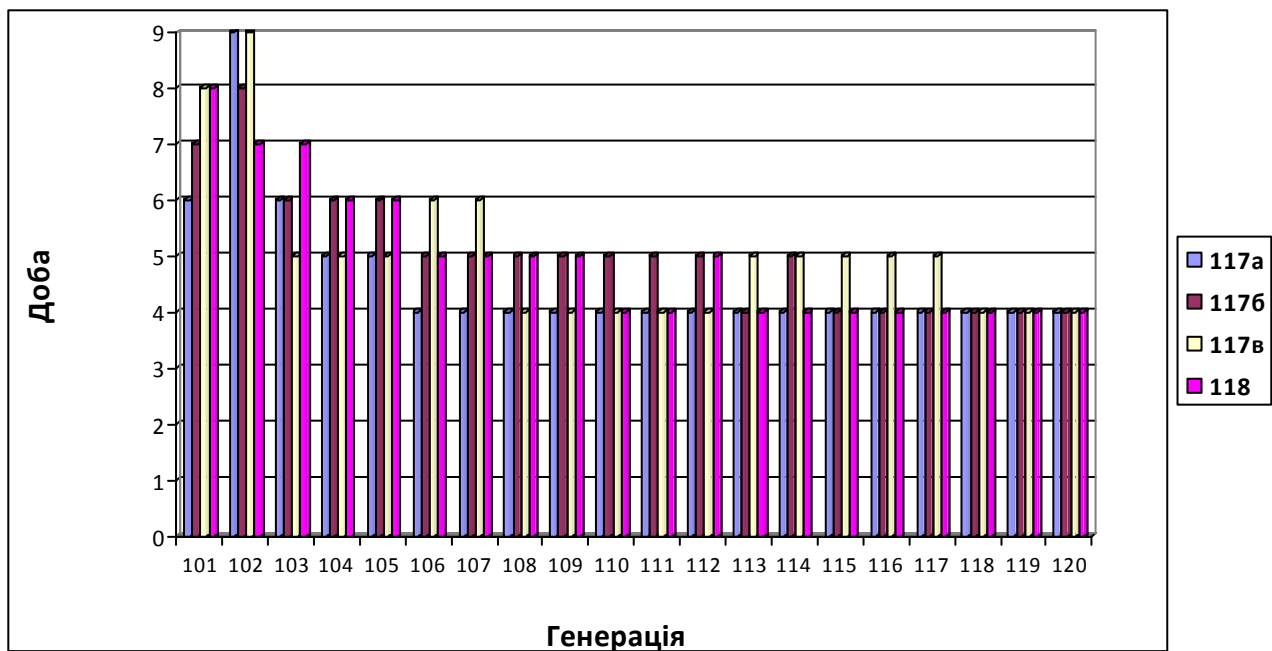


Рис. 3. Початок росту дисоціативних форм *M. bovis* субкультури 117 а, 117 б, 117 в та 118 культивованих за 3° С

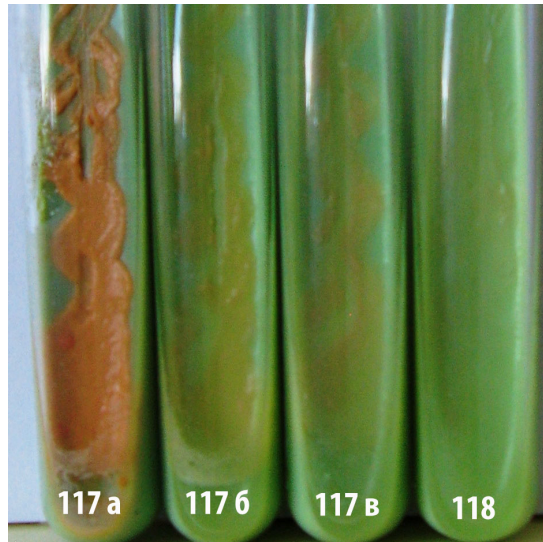


Рис. 4. Культуральні властивості *M. bovis* дисоціативних форм 100 генерації

(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 (рис. 5), було встановлено, що: субкультура 117 а, у полі зору мікроскопа, була представлена дрібними некислотостійкими коками; субкультура 117 б – некислотостійкими паличками з обрубаними краями та дрібними фіоле-

товими елементарними тільця між ними; субкультура 117 в – некислотостійкими паличками та коками, які розміщені поодинокі та скупченнями; субкультура 118 – великими некислотостійкими овалами (L-форми) та елементарними тільцями у вигляді скупчень.

Мікроскопією пофарбованих мазків *M. bovis* дисоціативних форм 110 генерації, що культивувалися за 3° С встановлено (рис. 6), що: субкультура 117 а представлена некислотостійкими паличками з обрубаними краями та овалами (L-форми); субкультура 117 б – не-

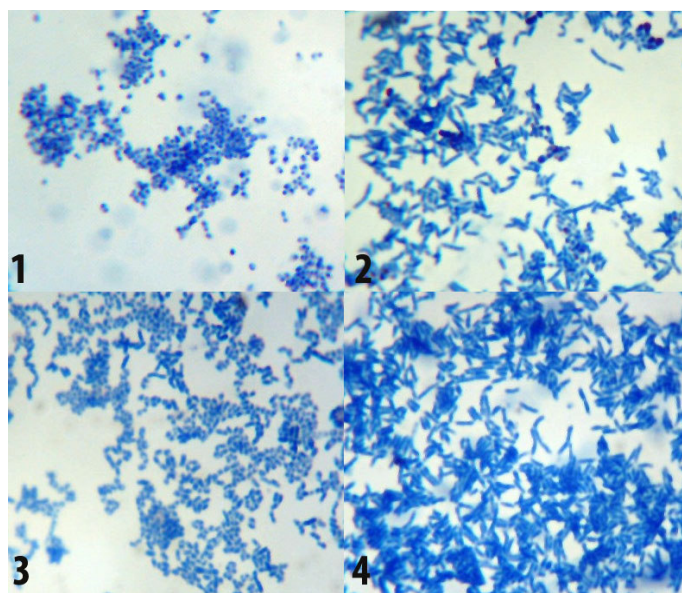


Рис. 5. Морфологічні і тинкторіальні ознаки *M. bovis* дисоціативних форм : 1.-117 а; 2.-117 б; 3.-117 в; 4.-118 (100 генерація)

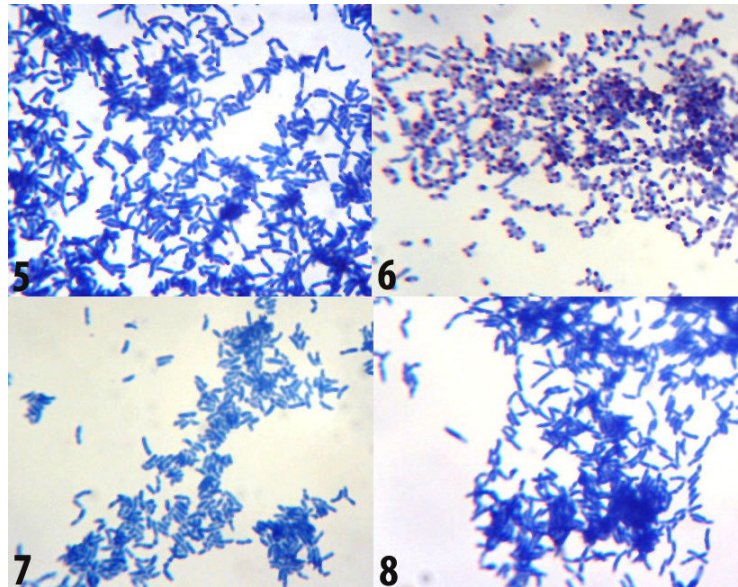


Рис. 6. Морфологічні та тинкторіальні ознаки *M. bovis* дисоціативних форм:
5.-117 а; 6.-117 б; 7.-117 в; 8.-118 (110 генерації)

кислотостійкими паличками з обрубаними краями, які розміщені поодинокі та попарно і кислотостійкими зернами (елементарними тільцями); субкультура 117 в – некислотостійкими паличками та коками у вигляді скупчень; субкультура 118 – некислотостійкими 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 некислотостійкі коки, а у 110 генерації – некислотостійкі палички та овали (L-форми); у субкультури 117 б – у 100 генерації – некислотостійкі палички та елементарні тільця, а у 110 генерації – некислотостійкі палички та кислотостійкі елементарні тільця; у субкультури 117 в – в 100 генерації – некислотостійкі палички та овали з елементарними тільцями, а у 110 генерації – некислотостійкі палички та

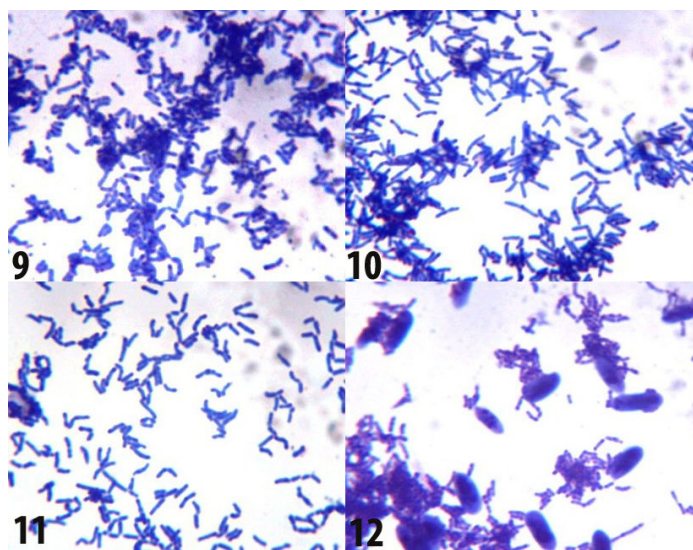


Рис. 7. Морфологічні і тинкторіальні ознаки *M. bovis* дисоціативних форм:
9.-117 а; 10.-117 б; 11.-117 в; 12.-118 (120 генерація)

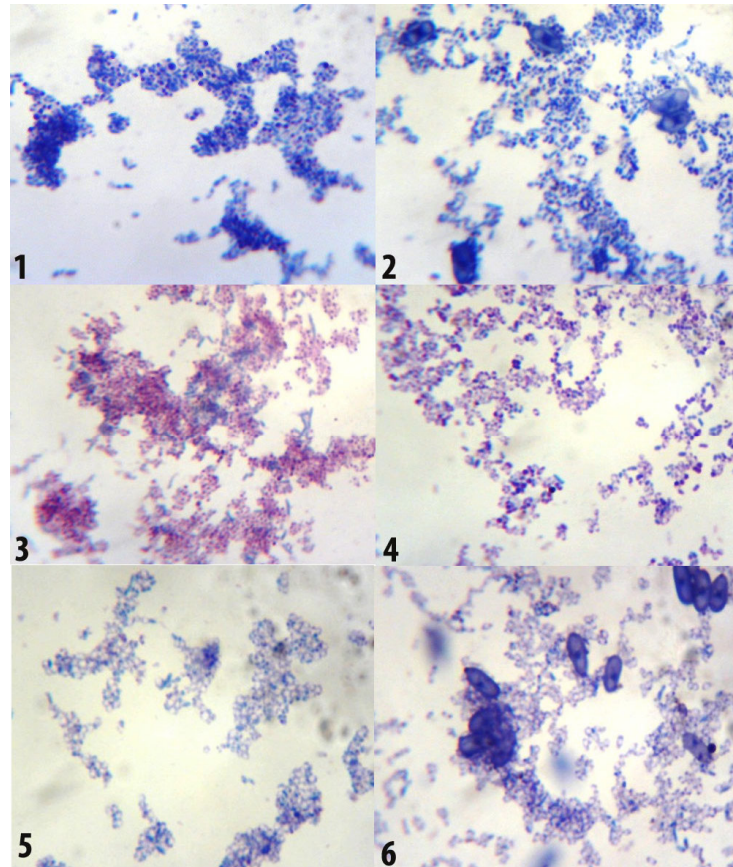


Рис. 8. Морфологічні і тинкторіальні ознаки *M. bovis* дисоціативних форм, що утворили помаранчевий пігмент : 1.-117 в (104 генерація); 2.-118 (108 генерація); 3.-117 б (109 генерація); 4.-117 а (112 генерація); 5. 117 а (116 генерація); 6. 118 (120 генерація).

коки; у субкультурі 118 – у 100 генерації – не-кислотостійкі палички та великі овали (L-форми), а у 110 генерації – не-кислотостійкі палички та овали (L-форми).

За подальших пасажувань і мікроскопії пофарбованих мазків *M. bovis* дисоціативних форм субкультур 117 а, 117 б, 117 в, 118 (рис.7) 120 генерації встановили: 117 а – не-кислотостійкі короткі палички; 117 б – довгі не-кислотостійкі палички з обрубаними краями; 117 в – не-кислотостійкі палички з обрубаними краями; 118 – не-кислотостійкі 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 встановлено (рис. 7): субкультура 117 в (104 генерація) була представлена – не-кислотостійкими паличками та коками, а у 100 генерації – не-кислотостійки-

ми паличками та коками у вигляді скупчень ; субкультура 118 (108 генерація) – дрібні не-кислотостійкі коки та великі овали (L-форми), а у 110 генерації – не-кислотостійкими паличками та великими овалами (L-форми); 117 б (109 генерація) – не-кислотостійкі палички та кислотостійкі коки, напівпрозорі (L-форми), а у 110 генерації – не-кислотостійкі палички та кислотостійкі елементарні тільця; 117 а (112 генерація) – не-кислотостійкі палички, кислотостійкі коки та напівпрозорі (L-форми), а у 110 пере-сіві – не-кислотостійкі палички та великі овали (L-форми); 117 а (116 генерація) – не-кислотостійкі коки та напівпрозорі (L-форми), а у 120 генерації – не-кислотостійкі короткі палички; 118 (120 генерація) – великі не-кислотостійкі овали та напівпрозорі (L-форми), а у 120 генерації – не-кислотостійкі палички та великі овали (L-форми) з елементарними тільцями.

Отже, із вищезазначеного, можна зробити висновок, що у процесі пасажування за темпе-

ратури 3° С, *M. bovis* дисоціативних форм набувають здатності утворювати помаранчевий пігмент та мають виражену тенденцію до L-трансформації.

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

2. 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 атипових мікобактерій, типовими представниками яких є *M. scrofulaceum*, *M. goodii*, *M. aquae*.

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

ЛІТЕРАТУРА

1. Білан М. В. Морфологічні особливості реверсійної здатності *Mycobacterium bovis* / М. В. Білан, Л. О. Ковальова, О. А. Ткаченко, [та ін.] // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету . – 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»: Междун. Научно-практический журнал. – Минск. – 2013. – №2. – С. 24-31.
3. Вейсфелер Ю. К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулёза 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.] // Ветеринарна медицина України. – 2010. – №12. – С. 27-30.
5. Закономірності поліморфізму та мінливості *M. bovis* швидко- та повільно рослих штамів / О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Зажарський та ін. // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету . – 2009. – №1. – С. 94-99.
6. Поліморфізм та мінливість *M. bovis* швидко- та повільно рослих штамів / О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Зажарський та ін. // Ветеринарна 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.

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ, МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ ДИССОЦИАТИВНЫХ ФОРМ *Mycobacterium bovis* КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ПРИ 3 И 37° С

Кулишенко О.Н., Давыденко П.А., Гребенюк О.Г., Лысечко В.Г., Ростков С.А.

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, г. Днепропетровск

В статье приведены результаты исследований влияния разных температур культивирования 3 та 37° С на культуральные свойства, морфологические и тинкториальные признаки *M. bovis* диссоциативных форм субкультур 117а, 117б, 117в, 118.

Установлено, что при пассажировании *M. bovis* диссоциативных форм субкультур 117 а, 117 б, 117 в, 118, при разных температурах 3 та 37° С, они приобрели стойкие способности культивирования при низких плюсовых температурах (3° С) и утратили способность размножения при температуре термостата (37° С). В процессе культивирования, при температуре 3° С, *M. bovis* диссоциативных форм субкультур 117 а, 117 б, 117 в, 118 изменили свое морфологическое строение и приобрели способность иногда образовывать оранжевый пигмент при пассажировании, что характерно другой группы фотохромогенных атипических микобактерий, типичными представителями которых являются *M. scrofulaceum*, *M. goodii*, *M. goodii*.

Культуры с интенсивным оранжевым цветом имеют принципиально другие морфологические формы микобактерий: субкультуры с интенсивным оранжевым цветом имеют—некислотоустойчивые палочки и кокки, мелкие некислотоустойчивые кокки и большие синие овалы (L-формы), некислотоустойчивые палочки и кислотоустойчивые кокки, полупрозрачные (L-формы), а культуры из незначительным пигментообразованием—некислотоустойчивые палочки, кислотоустойчивые и элементарные тельца и большие некислотоустойчивые овалы (L-формы)

Микробная диссоциация, культуральные свойства *M. bovis*, кислотоустойчивость, тинкториальные и морфологические признаки микобактерий