

УДК 619:616.93:579.673.21  
© 2010

**М.В. БІЛАН,**  
кандидат ветеринарних наук

**Л.О. КОВАЛЬОВА,**  
здобувач

**О.А. ТКАЧЕНКО,  
О.Є. ГАЛАТЮК,**  
доктори ветеринарних наук

Дніпропетровський державний  
аграрний університет–  
Житомирський державний  
національний агроекологічний  
університет

*Встановлено морфологічні аспекти реверсії в часі некіслотостійких форм *M. bovis* в кіслотостійкі залежно від кількості пересівів та строків утворення некіслотостійких мікобактерій.*

Багато десятиріч тому бактерії характеризувались як морфологічно стабільні форми в класичному розумінні. Однак, за повідомленнями деяких авторів, наприклад Н.Ф. Гамалея (1894), уже в той період пізнання етіологічного фактора з'являлася інформація про існування відмінних від традиційних інших форм мікроорганізмів. Нові технології мікробіологічної діагностики відкрили й продовжують відкривати мікроорганізми, які постійно змінюються. До одних з таких належить і збудник туберкульозу [1–7]. Проте й дотепер остаточно не з'ясовано: це результат впливу індукуючих факторів чи це спонтанний процес, передбачений генетичним набором мікроорганізму відповідного штаму.

Нашими попередніми дослідженнями встановлено, що мікобактерії (нитко- та паличкоподібні), тинкторіально та морфологічно змінені в субкультурі, з'являються незалежно від тривалості пасажів через штучне живильне середовище, але на трансформацію типових кіслотостійких мікроорганізмів у некіслотостійкі досить суттєво впливає вміст кіслотно-лужних грам-еквівалентів.

Однак нам не вдалося в доступній літературі знайти даних щодо подальшого біо-

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ  
РЕВЕРСІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ  
МУСОВАCTЕРІУМ BOVIS

логічного циклу морфологічних структур некіслотостійких ниткоподібних мікобактерій.

Саме це й було **метою** подальших досліджень морфологічних аспектів реверсії некіслотостійких ниткоподібних *M. bovis* у бактеріальну кіслотостійку форму.

**Матеріал та методи досліджень.** Для виконання цього обсягу роботи використано три клони *M. bovis* одного варіанта швидко-рослого штаму, які одержано в результаті селекції росинчастої культури під час тривалих пасажів через штучне яєчне середовище з рН 6,7: 1 – некіслотостійкі ниткоподібні форми мікобактерій; 2 – некіслотостійкі ниткоподібні та кіслотостійкі різної форми й величини палички; 3 – кіслотостійкі традиційної морфології палички.

З метою вивчення реверсії некіслотостійких мікобактерій у кіслотостійкі чи подальшої трансформації кіслотостійких провели 10 пересівів усіх трьох варіантів збудника через щільне середовище (рН 6,7). Прямий пересів мікобактерій проводили бактеріологічною петлею на середовище двох пробірок у першу–другу добу появи росинчастих колоній по лінії висіву. У динаміці пересівів, строків культивування мікобактерій, про-

1. Строки реверсії (трансформації) форм мікобактерій за пересівів одно-триденної культури\*

Культура, форма мікобактерій	Пасаж, доба появи інших форм мікобактерій									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Кислото- та некислотостійка	–	–	–	–	некислотостійкі	некислотостійкі	некислотостійкі	некислотостійкі	некислотостійкі	некислотостійкі
Кислотостійка	–	–	–	–	–	–	–	–	–	кислото- та некислотостійка
Некислотостійка	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

\*“–” – змін не виявлено.

водили мікроскопію мазків, фарбованих за Ціль-Нільсеном [8], та досліджували морфологічні аспекти реверсії в часі некислотостійких ниткоподібних форм у кислотостійкі, традиційні бактеріальні клітини. Тому росинчасту “чисту” культуру некислотостійких мікобактерій усіх 10 пасажив витримували в термостаті п’ять місяців, переглядаючи один раз на тиждень та проводячи мікроскопію культивованих культур. У цих дослідженнях для закупорювання пробірок використовували гумові пробки [9, 10].

У результаті проведеної роботи встановлено, що в десятій субкультурі кислотостійких мікобактерій відбулося генерування некислотостійких форм збудника, які виявилися морфологічно ідентичними першому варіанту клону мікобактерій (табл. 1).

Пасажі мікобактерій варіанта змішаного клону супроводжувалися на п’ятому пересіві повним зникненням кислотостійких форм, а клон некислотостійких – генерував, ниткоподібні форми були в усіх 10 субкультурах.

Досліджувані клони мікобактерій формували росинчасту культуру на 3–10 добу, яка практично зникала через два–чотири тижні культивування (за винятком окремих субкультур, коли росинчаста культура (“наліт”)

залишалася в одному стані протягом п’яти місяців досліду).

Одержані результати свідчать про певні закономірності біологічної властивості досліджуваних *M. bovis*. Вони зводяться до циклу стадій розвитку збудника, оскільки в усіх дослідженнях спостерігається трансформація кислотостійких у некислотостійкі форми.

Водночас культивування некислотостійких мікобактерій усіх 10 культур протягом п’яти місяців в умовах термостату (+37 °C) засвідчило, що реверсія збудника в кислотостійкі форми та строки формування колоній, хоча й тільки поодиноких, тісно пов’язані між собою (табл. 2).

Так, перші генерації некислотостійких мікобактерій значно раніше і тільки частково реверсують у кислотостійкі форми (з третього–четвертого тижня), ніж решта (восьма–десята генерації) – тільки з сьомого тижня. Паралельно цій тенденції тільки в значно віддалені строки утворюються типові поодинокі колонії.

При цьому мікобактерії субкультури за номером 10 (табл. 1) протягом п’яти місяців так і не сформували макроскопічно видимих колоній. Мікроскопія мікобактерій,

**2. Строки реверсії некислотостійких мікобактерій росинчастої культури в кислотостійкі форми\***

№ штаму, пересіву	Утворення кислотостійких форм та формування колоній, тиждень																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	=	=	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	=	=	=	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	=	=	=	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	=	=	=	=	=	=	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	=	=	=	=	=	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\* Чисельник – кислотостійкі форми мікобактерій, знаменник – колонії.

які сформували колонії дев'яти субкультур, засвідчила наявність як некислотостійких поліморфних, так і кислотостійких форм. Поміж останніх зустрічалися надзвичайно довгі палички з великою кількістю зерен (тілець) – до дев'яти–дванадцяти.

На рисунку видно чітку динаміку реверсії некислотостійких мікобактерій в кислотостійкі.

Динаміка реверсії зводиться до трьох способів:

1 – частина ниткоподібної форми з тільцями (зернами), набуваючи кислотостійкості, фрагментується (одне тільце) на окремі клітини;

2 – окремі некислотостійкі тільця, набуваючи кислотостійкості (у різних частинах ниткоподібної форми), звільняються з материнської клітини, набуваючи форми кислотостійкої палички різної морфології;

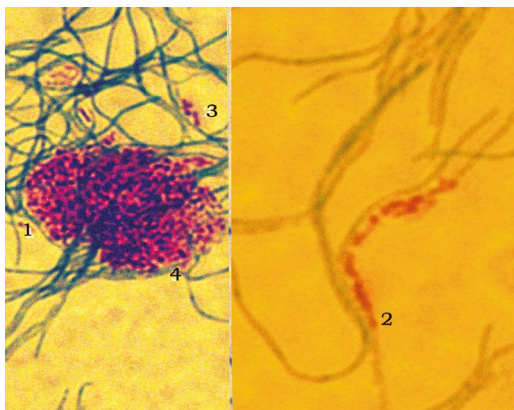
3 – некислотостійкі тільця в материнській клітині, перетворюючись на кислотостійкі,

без фази звільнення генерують традиційні форми збудника.

Такі окремі форми є центральним елементом у репродуктивному циклі і здатні самостійно розвиватися в різних напрямках, залежно від отриманого стимулу. Вони можуть зберігати здатність дозрівати всередині материнської клітини, оскільки вміщують бактеріальний геном і мають мінімальну метаболічну активність (тобто ферменти та кофактор), достатні, щоб ініціювати вироблення енергії та біосинтез.

Досліджуючи мікроскопічно мікобактерії п'ятимісячних субкультур, відзначимо що далеко не всі некислотостійкі ниткоподібні форми мікобактерій (тільця) реверсують у типові кислотостійкі форми. Некислотостійкі в полі зору мікроскопа значно домінують над кислотостійкими, хоча вони виглядають на перших пасажах досить блідими, без чітких контурів.

Отже, формування кислотостійких міко-



**Реверсія некислотостійких ниткоподібних *M. bovis* у кислотостійкі бактеріальні форми:** 1 – перетворення некислотостійких зерен (тілець) у материнській клітині в кислотостійкі; 2 – перетворення окремої частини (кінця) некислотостійкої форми в кислотостійку; 3 – вихід перетворених тілець з материнської клітини та генерація кислотостійких бактерій; 4 – початок формування колонії внаслідок генерації та накопичення кислотостійких паличок ×1500

бактерій з некислотостійких ниткоподібних відбувається із тілець (зерен), які наповнюють (розміщуються одне за одним) ниткоподібні форми збудника. Реверсують в кислотостійкі тільки окремі з них. Переважна більшість тілець, так само, як і самі материнські некислотостійкі ниткоподібні форми, з часом (чотири-

п'ять місяців), напевно, втрачають репродуктивність та життєздатність. Крім цього, із збільшенням кількості пересівів мікобактерій знижується реверсійна здатність некислотостійких у кислотостійкі. Хоча для остаточного висновку з цього питання необхідні, на наш погляд, більш триваліші дослідження.

### Висновки

Некислотостійкі *M. bovis* нитко- та паличкоподібної форми здатні реверсувати на одному і тому ж щільному середовищі без пересіву, у вихідну бактеріальну кислотостійку форму. Період поновлення вихідної

форми та властивості залежать від строку трансформації кислотостійких у некислотостійкі форми: чим триваліший період, тим пізніше та повільніше відбувається реверсія мікобактерій.

### Бібліографія

1. Domingue G.J. Bacterial persistence and expression of disease / G.J. Domingue, H.B. Woody // Clinical Microbiol. Rev. – 1997. – Vol. 10. – № 2. – P. 320–344.
2. Прозоровский С.В. L-форм бактерий / Прозоровский С.В., Кац Л.Н., Каган Г.Я. – М. : Медицина, 1981. – 239 с.
3. Тимаков В.Д. L-формы бактерий и семейство Mycoplasmataceae в патологии / В.Д. Тимаков, Г.Я. Каган. – М. : Медицина, 1973. – 392 с.
4. Калина Г.П. Фильтрующиеся формы бактерий. Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней / Калина Г.П. – М. : Медгиз, 1962. – С. 432–473.
5. Калина Г.П. L-трансформации бактерий. Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней / Калина Г.П. – М. : Медгиз, 1962. – С. 574–595.
6. Udou T. Spheroplast formation of *Mycobacterium smegmatis* and morphological aspects of their reversion to the bacillary form / T. Udou, M. Ogawa, Y. Mizuguchi // J. Bacteriol. – 1982. – Vol. 151 (2). – P. 1035–1039.
7. Изучение термической устойчивости микобактерий туберкулеза / А.П. Лысенко, А.П. Лемиш, Е.Л. Красникова [и др.] // Проблемы туберкулеза. – 2007. – № 7. – С. 42–45.
8. Настанова по діагностиці туберкульозу / [В.М. Манченко, З.Р. Троценко, М.С. Павленко та ін.] – К., 1994. – 39 с.
9. Румачик И.И. Применение резиновых пробок при посевах микобактерий / И.И. Румачик // Ветеринарная наука – производству: межведомственный сборник. – Минск, 1986. – Вып. 24. – С. 17–20.
10. Румачик И.И. Сравнительное испытание различных пробок при культивировании микобактерий / И.И. Румачик // Ветеринария. – 1989. – № 1. – С. 62–63.