

УДК 619:616.98:579.873.21:614.48

О.А. ТКАЧЕНКО, докт. вет. наук, професор

І.М. ШЕНДРИК, асистент

В.В. МІСКІВ, аспірант

А.В. КОВАЛЬОВ, здобувач

Дніпропетровський державний аграрний університет

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДИСОЦІАТИВНИХ L- ТА ІНШИХ ФОРМ *M. BOVIS*

У статті розглядаються *M. bovis*, відмінні за біологічними властивостями від патогенних штамів.

Усім мікобактеріям, у т. ч. *M. bovis*, властива генетично закладена здатність істотно змінюватись як фенотипом, так і генотипом – втрачаючи деякі антигени з одночасною появою інших, які для мікобактерій загалом не є новими [12]. Зміни можуть відбуватись як під дією факторів довкілля, так і незалежно від них, що підтверджує лабільність закладеного в мікробній клітині геному з генами дрімуючими, активними й такими, що активують оживлення (rpf) [13–17]. Саме вони визначають ту чи іншу здатність мікобактерій на певній стадії розвитку зберігати високу ймовірність реверсії у вихідну форму чи конверсії в наступну нову форму з чітко вираженими, постійними, генетично закріпленими або з тимчасовими (фенотиповими), ледь помітними властивостями: змінюється морфологія мікобактерій, культуральні, біохімічні й інші властивості, ліпідний склад [1–3, 5, 6, 8–11]. Отже, щодо мікобактерій, зокрема бичачого виду, потребують доповнення і роз'яснення питання, пов'язані передусім з морфологією мікробної клітини, її біологічною активністю, здатністю набувати властивостей атипичних мікобактерій.

Важливим у цьому напрямі є дослідження L- та інших форм *M. bovis* дисоціантів із втраченою (зниженою/втраченою) сенсibiliзуювальною здатністю, які розмножуються за $t\ 3^{\circ}\text{C}$ у динаміці пасажів через щільне середовище, оскільки робіт такого спрямування в доступній літературі ми не знайшли.

Мета роботи – з'ясувати біологічні властивості L- та інших форм дисоціантів *M. bovis*, культивованих за $t\ 3$ і 37°C .

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Роботу виконували в навчально-дослідній лабораторії кафедри епізоотології ДДАУ з використанням змінених форм одного штаму *M. bovis*, одержаних у 118-му пасажі через середовище Левенштейна – Йенсена (рН 7,1–7,2) за культивування при $t\ 37^{\circ}\text{C}$ і витриманих з початковим ростом поодиноких коло-

ній (118-та субкультура) в умовах $t\ 2\text{--}3^{\circ}\text{C}$ упродовж 20 місяців. Досліджували ізольовані колонії в динаміці наступних 60 пересівів, а саме: швидкість росту культури, пігментоутворення за зміни рН середовища, морфологічні ознаки, тинкторіальні властивості (мазки фарбували за методом Ціля – Нільсена) змінених форм мікроорганізмів, культивованих за $t\ 3$ і 37°C , ріст культури різних генерацій мікобактерій на простих живильних середовищах, на середовищі з вмістом 0,5 і 1 мг/см³ саліциловокислого натрію.

Загальновідомими методами досліджували дегідрогеназну й каталазну активність змінених мікобактерій вихідних культур і їх ревернантів, виділених з органів морських свинків, в організм яких було інокульовано досліджувані мікроорганізми.

Для з'ясування кількісного та якісного вмісту вільних жирних кислот ліпідів хроматографічним методом дослідили мікобактерії вихідних вірулентних культур (2; 59; 100), культивованих за $t\ 37^{\circ}\text{C}$, і дисоціативних форм, культивованих за $t\ 3$ і 37°C [4, 5].

Для встановлення в тривалому досліді сенсibiliзуювальної здатності з використанням симультанної проби (ППД – для ссавців та ААМ) й інших особливостей мікобактерій пасажовані мікроорганізми, накопичені на щільному середовищі за $t\ 3^{\circ}\text{C}$, інокульовали (разово в дозі 1 мг/см³) чотирьом морським свинкам, з яких двох евтаназували через три, а інших – через дев'ять місяців від початку досліду з наступним бактеріологічним дослідженням біологічного матеріалу від них та повторною інокуляцією виділеної культури (ревернант) дослідним тваринам (морським свинкам).

Можливість викликати інфекційний процес туберкульозу досліджуваними мікобактеріями вивчали шляхом дворазової інокуляції (1 мг/см³, з інтервалом через 1,5 міс.) зазначеним тваринам мікобактерій, культивованих за $t\ 3$ і 37°C . Реакцію макроорганізму на введені мікобактерії оцінювали кожні 10 діб – за масою тіла, строками формування виразки в ділянці введення зависі мікобактерій, розвитком підвищеної чутливості сповільненого типу (симультанна проба з ППД – для ссавців кожні 30 діб) та патолого-анатомічними змінами (через 3 місяці від початку другого введення зависі мікроорганізмів). Для контролю в досліді використовували *M. bovis* патогенного материнського штаму.

У дослідженнях застосовували методики, передбачені відповідними положеннями [4, 5].

© О.А. Ткаченко, І.М. Шендрік, В.В. Місків, А.В. Ковальов, 2013



РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час вивчення росту мікобактерій на щільному яєчно-му середовищі однієї пробірки за $t\ 3^{\circ}\text{C}$ після 118-разового пасажування через середовище з рН 7,1–7,2 було помічено, що за 20 місяців впливу зазначеного температурного режиму культивування характер культури й кількісний склад колоній істотно змінився: до поміщення культури в умови низької плюсової температури було зафіксовано 5 дрібних колоній, після – наліт, одна велика шорстка колонія й 10 дрібних. Мікроскопією мазків, приготовлених з окремих колоній, які сформувалися в умовах культивування за $t\ 37$ і 3°C , було виявлено скупчення кислотостійких коротких, товстих і тонких, прямих і вигнутих, із заокругленими кінцями й вираженою зернистістю паличок. Здійснивши посів на живильне середовище зависі мікобактерій, приготовленої з ізольованих колоній, і культивуючи їх за $t\ 3^{\circ}\text{C}$, на 12-ту добу було виявлено слабкий ріст поодиноких дрібних, правильної форми, гладеньких сіро-білого кольору колоній (визначених нами як друга генерація субкультури), які надалі формували суцільний ріст по лінії посіву (рис. 1).

Мікроскопією мазків, приготовлених з культури, встановлено неацитостійкі овали (L-форми) з різною оптичною щільністю поверхні й поодинокі кислотостійкі елементарні тільця (рис. 2).

У контролі *M. bovis* 100-ї субкультури за $t\ 3^{\circ}\text{C}$ росту патогенного штаму не виявили.

Висіявши на середовище шести пробірок зависі мікобактерій, приготовлену з одержаної культури другої генерації, й культивуючи її за $t\ 3$ і 37°C , відповідно на 11-ту й 25-ту добу спостереження виявили первинний ріст вологих кремкових колоній. Мікроскопією мазків, приготовлених з виявлених колоній (за $t\ 3$ і 37°C), встановлено як неацитостійкі овали з різною оптичною щільністю поверхні, тобто L-форми, так і кислотостійкі елементарні тільця.

Як свідчить більшість літературних даних, *M. bovis*, трансформовані в L-форми, як і інші види мікобактерій, не культивуються на щільних живильних середовищах – для цього використовують спеціальні напіврідкі середовища в присутності осмотичних факторів. Проте в окремих повідо-

мленнях [1] відзначено, що такі форми збудника розмножуються й на щільних середовищах, утворюючи колонії. Саме це й підтверджують наші дослідження.

Вивчення патогенних і сенсibiliзувальних властивостей одержаних культур на морських свинках за $t\ 3$ і 37°C засвідчило, що мікобактерії не викликають туберкульозних патолого-анатомічних змін і не сенсibiliзують організм тварин щодо ППД – для ссавців.

Провівши сім прямих пасажів досліджуваних мікроорганізмів через щільне живильне середовище й культивуючи їх за $t\ 3$ і 37°C , ріст культури за $t\ 3^{\circ}\text{C}$ відзначили на 5-ту добу, а за 37°C – на 4-ту. У першому випадку мікобактерії продукували помаранчевий пігмент, у другому – кремовий. Мікроскопією мазків, приготовлених з культур, виявила (рис. 3) неацитостійкі довгі й короткі, товсті й тонкі, вигнуті й прямі із заокругленими кінцями зернисті палички та кислотостійкі елементарні тільця й L-форми, культивовані за $t\ 3^{\circ}\text{C}$, та L-форми й інші утворення, культивовані за $t\ 37^{\circ}\text{C}$. Щодо останніх слід зазначити, що в материнській культурі на ранніх етапах морфогенезу ниткоподібні неацитостійкі мікобактерії вивільняли кислотостійкі зерна, з яких утворювалися типові клітини *M. bovis*, на що ми звертали увагу ще в 2008 р. [8]. З часом через 60–80 пасажів неацитостійких форм цього ж варіанта збудника ниткоподібні мікроорганізми, як видно з рис. 3 (2), вивільняють неацитостійкі структурні елементи – зерна, з яких формуються L-форми (спочатку видовжені) з різною оптичною щільністю поверхні.

Вивчення патогенних, сенсibiliзувальних властивостей досліджуваних субкультур мікобактерій 10-ї генерації, одержаних за різних температур культивування, засвідчило, що морські свинки залишаються живими, не реагуючи на ППД – для ссавців упродовж трьох місяців досліду.

Здійснивши ще десять пасажів мікобактерій досліджуваних субкультур через щільне живильне середовище, встановили істотне пришвидшення формування колоній порівняно з 10-ю генерацією (тільки при температурі культивування 37°C) – з 4 до 2 діб. Мікроскопією мазків, приготовлених з культур, засвідчила, що за культивування при $t\ 3^{\circ}\text{C}$ генеруються неацитостійкі, довгі й короткі, тонкі вигнуті й пря-



Рис. 1. Культура *M. bovis* другої генерації (3°C)

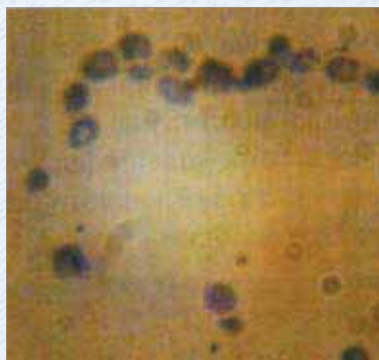


Рис. 2. L-форми *M. bovis* другої генерації. $\times 1500$

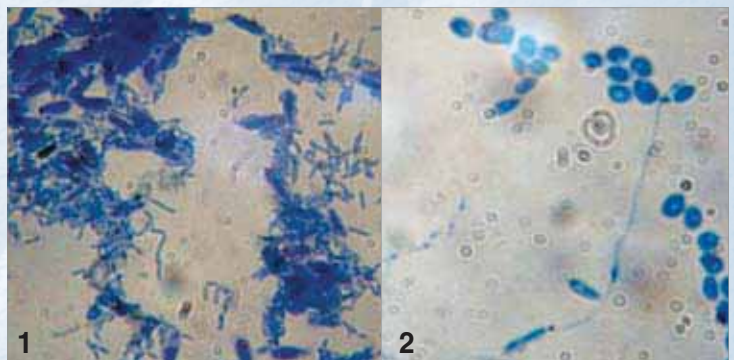


Рис. 3. L- та інші форми *M. bovis*, культивовані за $t\ 3^{\circ}\text{C}$ (1) і 37°C (2). $\times 1000$

мі із округленими кінцями зернисті палички, L-форми (овали) та ледь червонуваті поодинокі елементарні тільця, при $t\ 37^{\circ}\text{C}$ – некіслотостійкі, довгі, але переважно короткі зернисті вигнуті й прямі палички, L-форми та кіслотостійкі елементарні тільця.

Наступні дослідження мікобактерій, пасажованих за різних температур (15-ї генерації), провели на простих живильних середовищах – м'ясо-пептонному агарі (МПА) та м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ).

У контролі патогенні *M. bovis* (100-та субкультура досліджуваного варіанта) на середовищі Левенштейна – Йенсена за $t\ 37^{\circ}\text{C}$ росли на 23-тю добу, а за $t\ 3^{\circ}\text{C}$ росту культури впродовж тримісячного спостереження виявлено не було. На МПА та МПБ мікобактерії патогенного штаму не росли, а

змінені мікроорганізми проявляли ріст на 2–3-тю добу досліді. На агарі було відзначено суцільний ріст по лінії посіву світло-сірої культури, яка мала тенденцію до збільшення в часі. На початку росту культури в бульйоні було виявлено світло-сіру плівку на поверхні, слабке помутніння з наступним утворенням осаду. Через 3 тижні, за наявності плівки й помутніння, рівень осаду збільшився в 4–6 разів.

Мікроскопією мазків, приготовлених з тижневих культур за $t\ 3^{\circ}\text{C}$ на МПА, було виявлено некіслотостійкі короткі й довгі, товсті прямі й вигнуті із округленими кінцями зернисті палички, некіслотостійкі зерна та L-форми, за $t\ 37^{\circ}\text{C}$ – некіслотостійкі елементарні тільця та L-форми. У культурі МПБ за $t\ 3^{\circ}\text{C}$ – некіслотостійкі короткі й довгі товсті, прямі й вигнуті зернисті із заокругленими кінцями

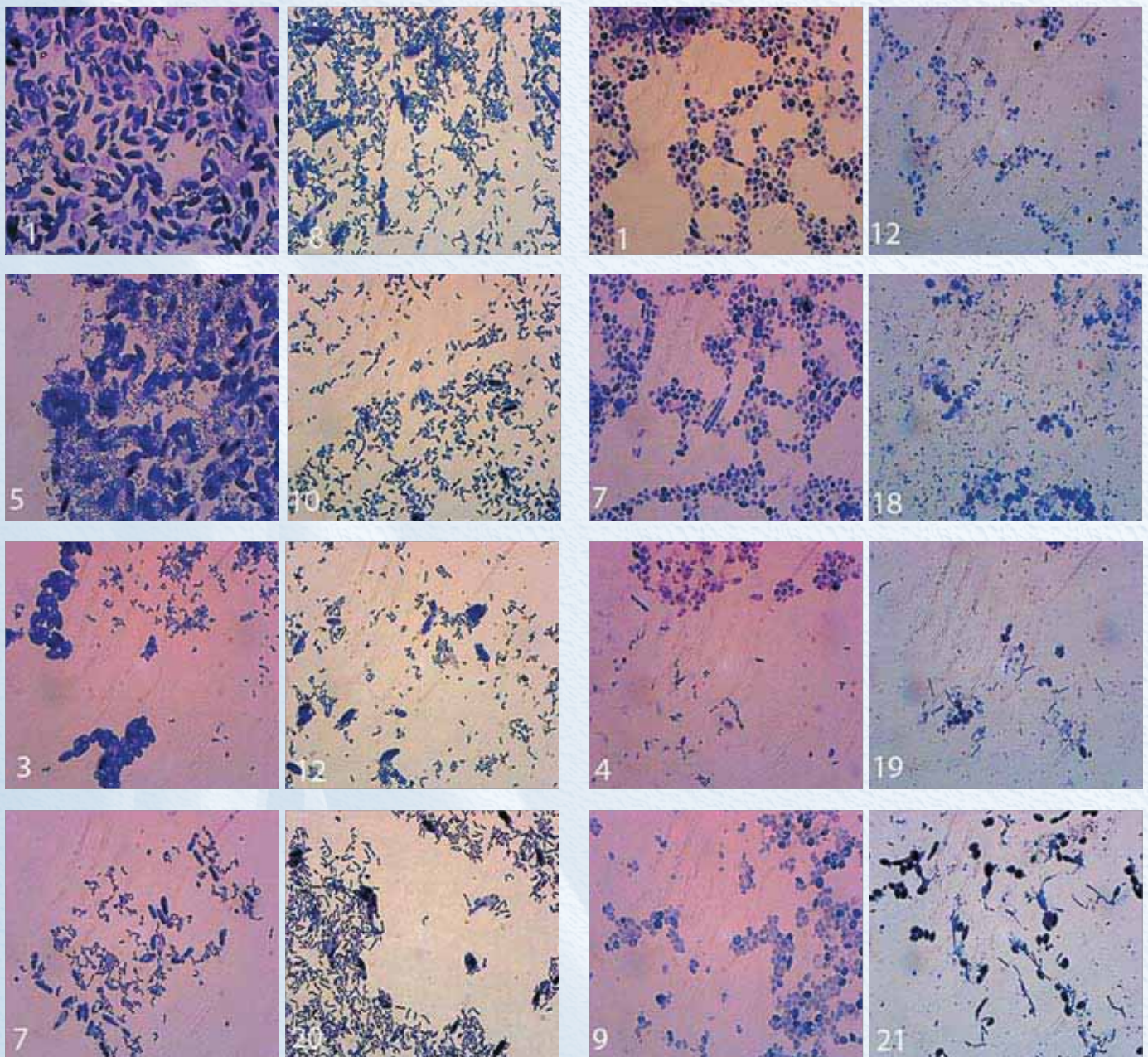


Рис. 4. L- та інші форми, пасажовані через щільне живильне середовище (зліва – за $t\ 3^{\circ}\text{C}$; справа – за $t\ 37^{\circ}\text{C}$).
× 1000



палички та некіслотостійкі зерна, за $t\ 37^{\circ}\text{C}$ – кіслото- та некіслотостійкі зерна й L-форми.

Через 3 тижні під час мікроскопії мазків, приготовлених з плівки й осаду МПБ, виявили в першому випадку (за $t\ 3$ і 37°C) практично однаковий (порівняно з тижневою культурою) за морфологією й тинкторіальними властивостями малюнок. Проте в осаді (за $t\ 3^{\circ}\text{C}$) палички різної форми й довжини виявилися некіслотостійкими, у плівці кіслото- та некіслотостійкими, а за $t\ 37^{\circ}\text{C}$ – тільки кіслотостійкими.

Важливі дані було одержано за паралельного пасажу L-форм через щільне середовище Левенштейна – Йенсена при різній температурі культивування.

Так, вивчаючи під імерсією мазки, приготовлені з помаранчевого відтінку субкультури першої генерації в умовах культивування за $t\ 3^{\circ}\text{C}$, відзначали (рис. 4) наявність L-форм (видовжені овали, з деяких виштовхуються зерна) та зернистих паличок (короткі й довгі); в умовах термостата (жовтуватої субкультури, що легко емульгувалася) – тільки L-форми з різною оптичною щільністю поверхні (практично округлої форми) та поодинокі зернисті палички. У третій генерації, в умовах холодильника, субкультуру формували L-форми (видовжені овали) та палички й зерна; у четвертій, в умовах термостата, – L-форми (круглі) та поодинокі паличкоподібні утворення.

П'ята субкультура, в умовах культивування за $t\ 3^{\circ}\text{C}$, характеризувалася видовженими L-формами та паличкоподібними й зернистими некіслотостійкими елементами. Сьома субкультура (термостат) формувалася практично L-формами (круглими) та поодинокими товстими зернистими короткими й довгими паличками.

У мазку сьомої субкультури, одержаної при культивуванні за $t\ 3^{\circ}\text{C}$, було виявлено видовжені L-форми, з яких вивільняються зернисті форми й коротенькі палички. У дев'ятій субкультурі (термостат) у полі зору мікроскопа було зафіксовано лише L-форми та поодинокі елементарні, злегка червонуваті тільця круглої форми.

Мазок з восьмої субкультури ($t\ 3^{\circ}\text{C}$) характеризувався наявністю тих самих форм мікобактерій, що й із сьомої.

У мазку, приготовленому з 12-ї субкультури, одержаної в термостаті, виявлено L-форми та елементарні тільця (зерна) ледь червонуватого відтінку.

У субкультурі 10-ї ($t\ 3^{\circ}\text{C}$) і 18-ї ($t\ 37^{\circ}\text{C}$) генерації суттєвих змін порівняно з попередніми дослідженнями мазків не виявлено. Хоча в мазку як першої, так і другої культури зафіксовано також наявність зернистих паличок.

У 12-й субкультурі ($t\ 3^{\circ}\text{C}$) виявлено видовжені L-форми, з яких вивільняються некіслотостійкі зерна й короткі та довгі палички й поодинокі ледь червонуваті елементарні тільця. У 19-й субкультурі (термостат) – L-форми, довгі, короткі зернисті палички й елементарні тільця червонуватого відтінку.

20-та ($t\ 3^{\circ}\text{C}$) і 21-ша ($t\ 37^{\circ}\text{C}$) генерації характеризувалися тими ж морфологічними формами мікобактерій, що й 12-та і 19-та.

Узагальнюючи динаміку морфологічних ознак, тинкторіальних властивостей і характер росту культур змінених форм *M. bovis* (у т. ч. L-форм), можна зробити висновок про те, що в умовах низької плюсової температури (3°C) з часом генеруються, на фоні стабільності культури, некіслотостійкі зерна, зернисті палички, зі зменшенням їх кількості в часі порівняно з вихідною культурою – L-форми; в умовах термостата на фоні зменшення кількості та зміни морфології L-форм з'являються некіслотостійкі зерна, короткі й ниткоподібні палички та поодинокі червонуваті елементарні тільця, які, напевно, змінюють характер росту культури. А саме: якщо за відсутності елементарних тілець культура у вигляді суцільного росту по лінії висіву зависі досліджуваних мікроорганізмів інтенсивно збільшувалася в часі, то з появою елементарних тілець (через 4–5 днів культивування) культура начебто провалювалася під її тиском в середовище: з часом суцільний ріст культури витончувався й через 2–4 тижні середовище «стікало», що свідчить про незвичайні, особливі властивості цих форм *M. bovis*.

Водночас наші попередні дослідження [1–3, 5, 6, 8] неодноразово засвідчували, що швидкість розмноження досліджуваного штаму мікобактерій, зниження ступеня вірулентності, зміна якісного й кількісного складу вільних жирних кіслот істотно залежать від рН середовища. Тому необхідним виявилось вивчення впливу вмісту кіслотних грамеквівалентів у середовищі на пігментоутворення та морфологію й тинкторіальні властивості форм мікобактерій за культивування при $t\ 3^{\circ}\text{C}$ (за $t\ 37^{\circ}\text{C}$ пасажовані мікобактерії на цьому етапі досліджень втратили здатність рости на середовищі).

Пересіявши мікроорганізми й оцінивши характер росту культур до 26-ї (середовище з рН 7,1–7,2) і наступних – з 27-ої по 37-му – генерацій, відзначили: культура помаранчевого відтінку (рис. 5) на середовищі з рН 6,5 через 2–3 тижні набувала більш інтенсивного забарвлення; на середовищі з рН 7,1–7,2 – залишалася такою самою (помаранчевого відтінку) впродовж трьох місяців культивування.

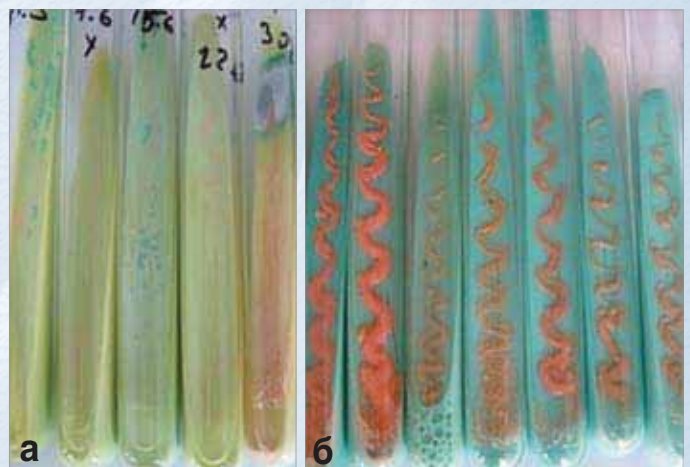


Рис. 5. Культура L- та інших форм *M. bovis*:
а – на середовищі з рН 7,1–7,2;
б – рН 6,5

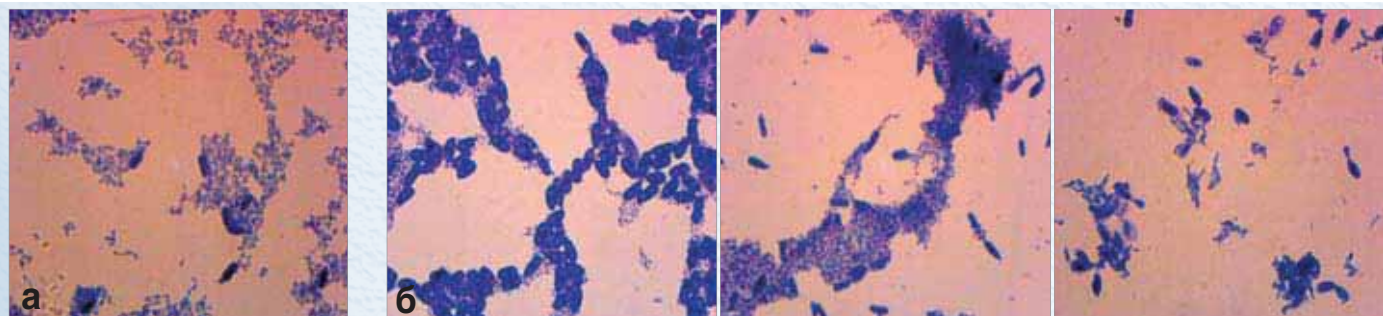


Рис. 6. L- та інші форми *M. bovis*:
а – 26-та генерація (рН середовища 7,1–7,2); б – 27-ма; 33-тя; 37-ма генерації (рН середовища 6,5). × 1000

Вивчивши під імерсією мазок, приготовлений з культури 26-ї генерації мікобактерій, встановили (рис. 6), що переважають здебільшого некіслотостійкі зернисті форми, інколи (рідко) кислотостійкі палички та, досить рідко, товсті (15–20 мкм) темно-сині палички з однією щільністю поверхні. Перший пересів таких різних форм з 26-ї генерації на середовище з рН 6,5 супроводжувався появою значної кількості синіх овалоподібних форм (з темними зернами в центрі) з різною оптичною щільністю поверхні, дрібних зерен червоного відтінку, які розташовуються тільки навколо й біля овалів (синіх). А це свідчить про «виштовхування» зерен з овалів. Подібне явище було виявлено в мазку, приготовленому з культури 33-ї та 37-ї генерації. Проте відзначено й незначну кількість синіх утворень, що набули форми товстих синіх овалоподібних зернистих паличок, на яких і біля яких (або з яких «виштовхуються») знаходяться дрібні некіслотостійкі (дуже рідко кислотостійкі) зернисті форми (0,1–0,2 мкм). Типових форм паличок збудника туберкульозу в цій і попередній генераціях (навіть некіслотостійких) не виявили.

Провівши ще 10 пересівів, встановили, що в перші п'ять з них (з 41-го по 45-й) ріст культури відзначали з 4-ї доби, як правило, у вигляді кремового нальоту по лінії посіву з наступним формуванням окремих великих сухих колоній помаранчевого кольору (рис. 7). У той же час 45-та субкультура

виявилася слизовою і в'язкою. У мазку, приготовленому з субкультури цього пересіву, під імерсією мікроскопа було виявлено некіслотостійкі зернисті й некіслотостійкі великі (у 12 разів більші за палички) видовжені овали з однією щільністю поверхні, з яких «виштовхуються» короткі палички (рис. 8).

У наступні п'ять пересівів культура залишалася слизовою, але її ріст зі зміною пігменту з помаранчевого на жовтуватий реєстрували через 1–6 діб (рис. 9).

У полі зору мазка, приготовленого з культури 50-го пересіву, було виявлено практично такі ж форми мікроорганізмів: на фоні некіслотостійких зернистих овалів (L-форми) – некіслотостійкі зерна, які вивільняються з них і розташовуються між ними (рис. 10). На 60-му пересіві було встановлено культуру й морфологічні форми мікобактерій, ідентичні 50-й субкультури.

Отже, культивування *M. bovis* дисоціативних форм в умовах низьких плюсових температур ($t\ 3^{\circ}\text{C}$) на середовищі з різним рН на фоні стабільності утворення інтенсивного пігменту за умов кислішого рН супроводжується стабільністю морфологічних форм мікобактерій.

Одержано 11.02.2013

(Закінчення в наступному номері).



Рис. 7. Культура змінених *M. bovis* (45-й пасаж за $t\ 3^{\circ}\text{C}$)



Рис. 8. L- та інші форми *M. bovis* (45-й пасаж за $t\ 3^{\circ}\text{C}$). × 1000



Рис. 9. Культура *M. bovis* дисоціативних форм 118 варіанта (50-й пасаж за $t\ 3^{\circ}\text{C}$)

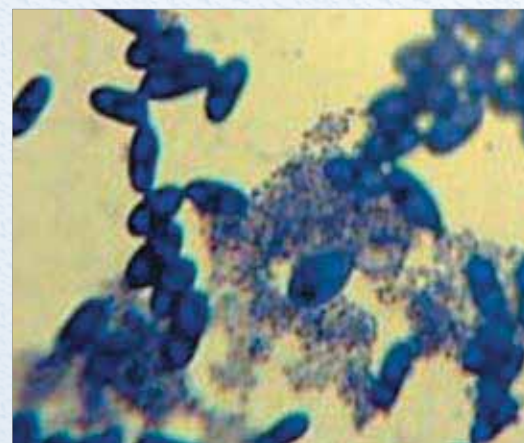


Рис. 10. *M. bovis* дисоціативних форм 118 варіанта (50-й пасаж за $t\ 3^{\circ}\text{C}$). × 1000