



Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC

Biological activity dissociative forms of *Mycobacterium bovis* in dependence on durability storing cultures and temperature modes cultivation

M.V. Bilan

Dnipropetrovsk State Agrarian and Economics University, Dnepr, Ukraine

*Dnipropetrovs'k State
Agrarian and Economic
University, 49600, Dnepr,
Mandrykivska st., 276
+38(0562)361714
E-mail:
bmvx7@i.ua*

Conducted studies have been found that long-term storing (7 months) at 3°C changed the biological activity of dissociative forms of *M. bovis* generation 240 (117a, 117b, 117c and 118) options as when cultured at 3°C and 37°C. Dissociative forms of *M. bovis* 117c version in a nutrient medium at 37°C formed a crater colony, which had bright orange colour and dryish texture. Under the microscope discovered grainy non-acid stable sticks of different lengths and grains, granular acid stable bent sticks and grains, which have noted in previous studies.

After breeding and inoculation 118 variant forms of dissociative mycobacterial nutrient medium for growth under the conditions found growth under conditions of thermostat (at 37°C) for seven days earlier than at 3°C. Cultures were different by their cultural properties: at 37°C there matte orange large colony with dryish texture which had a large number of "dwarf" colonies on it's surface and edges. At 3°C found a growth of gray-yellow colonies S-shape which had smooth shiny surface with flat edges and oily texture. Later on the nutrient medium of these test tubes (both at 3 and 37°C) near the condensate appeared colony growth which were interflowing into each other (after 24 and 30 days respectively), which were similar to those colonies that appeared first by their properties.

By their morphology mycobacterium of this options which were cultivated under different temperature conditions almost did not differ among themselves and were similar to the original. By microscopy showed thick straight and curved non-acid stable sticks of different lengths and non-acid stable grains.

Conducted studies have been found that only 117c (at 37°C) and 118 (at 3°C and 37°C) variant forms retained cell viability after first colonies appeared from original culture at 240 and 360 days.

On nutrient medium were found one-two colonies starting from 2–35 days of cultivation. Variant 117c formed convex shaped yellowish colony, variant 118 formed at 3°C convex shaped gray and white shiny colony and at 37°C formed gray and white matte colony. By their morphology they did not differ from original forms. Under the microscope discovered non-acid stable granular sticks which had different length and grains. Variant 117c also had acid stable solitary grains. But morphological features of mycobacterium cultures had differences after cultivating at different temperature modes. At 37°C were ground more granular sticks than at 3°C.

Key words: *micobacteria; dissociative forms; morphology; biological activity; tinctorial and cultural properties.*

Биологическая активность *Mycobacterium bovis* диссоциативных форм в зависимости от длительности хранения культуры и температурных режимов культивирования

М.В. Билан

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, г. Днепр, Украина

Citation:

Bilan M. (2017). Biological activity dissociative forms of *M. bovis* in dependence on durability storing cultures and temperature modes cultivation. *Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC*, 5(1), 48-53.

Показано, что после длительного хранения только два варианта (117в и 118), из четырёх исследуемых диссоциативных форм микобактерий бычьего вида, обладают способностью длительно сохранять свойства адаптироваться на искусственной питательной среде, размножаясь формировать колонии как при 3, так и при 37°C. На 360 сутки хранения микобактерий 117в вариант формировал единичные колонии при 37°C на 28 сутки культивирования, 118 вариант – единичные колонии как при 3°C (на 21 сутки), так и при 37°C (на 28 сутки). В розведении 10–9 роста колоний не наблюдалось. Таким образом, исследуемые варианты обладают особенностями отдельных штаммов *M. bovis* диссоциативных форм.

Ключевые слова: микобактерии; диссоциативные формы; биологическая активность; морфология; тинкториальные и культуральные свойства.

УДК 619:616.98:579.873.21:57.083.32:636.5

Біологічна активність *Mycobacterium bovis* дисоціативних форм залежно від тривалості зберігання культури та температурних режимів культивування

М.В. Білан

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпро, Україна

Показано, що після тривалого зберігання лише два варіанти (117в та 118), з чотирьох дисоціативних форм микобактерій бичачого виду, володіють здатністю тривало зберігати властивість адаптуватися на штучному живильному середовищі, розмножуючись утворювати колонії як за 3, так і за 37°C. На 360 добу зберігання микобактерії 117в варіант утворював поодинокі колонії за 37°C на 28 добу культивування, 118 варіант – поодинокі колонії як за 3°C (на 21 добу), так і за 37°C (на 28 добу). В розведенні 10–9 росту колоній не спостерігалось. Отже, досліджувані варіанти володіють особливостями окремих штамів *M. bovis* дисоціативних форм.

Ключові слова: микобактерії; дисоціативні форми; морфологія; біологічна активність; тинкторіальні та культуральні властивості.

Вступ.

Дисоціація мікроорганізмів може виникнути в будь-якій популяції, за сприятливих для її розвитку умов, і микобактерій туберкульозу не є виключенням [7, 8, 14, 15, 19]. Вивчення біологічних властивостей у мікроорганізмів з набутими новими ознаками, не властивими для материнської культури конкретного виду, є достатньо актуальним питанням і вказує на можливість створення на їх основі нових біологічних препаратів [4, 6, 10] і зокрема для конструювання протитуберкульозної вакцини. Проведеними дослідженнями науковцями нашої кафедри з вивчення біологічних властивостей дисоціативних форм микобактерій бичачого виду, встановлено: здатність останніх до формування окремо видимих колоній за низьких плюсових температур на середовищі з різним рН, до продукування пігменту, до зміни морфології, ліпідного складу, культуральних та тинкторіальних властивостей, вірулентності, а також до зміни біологічної активності [1–3, 5, 9, 11–13, 17, 18]. І, як зазначалося раніше [11], отримані результати розширяють розуміння біології дисоціантів та зможуть зорієнтувати у підборі штаму та дози микобактерій за конструювання вакцини.

Мета – з'ясувати біологічну активність *M. bovis* дисоціативних форм в залежності від тривалості зберігання культури та температурних режимів (3 та 37°C).

Матеріал і методи дослідження.

Роботу проводили в навчальній лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин ДДАЕУ. Для дослідження застосували дисоціативні форми *M. bovis* 240 генерації (120 пересів з часу дисоціації микобактерій). У роботі застосували метод розведення культур микобактерій в ізотонічному розчині. Завис микобактерій розводили до 10–9 й останні розведення 10–7, 10–8 та 10–9 висівали на середовище Левенштейна-Йенсена і культивували за 3 та 37°C [16].

Після розведення та висіву завису досліджували колонії сформовані на максимальному розведенні. В подальшому відбирали частку колонії в перші декілька діб її появи, готували мазки та досліджували їх під імерсійною системою. Порівнювали морфологію микобактерій, тинкторіальні та культуральні властивості з такими до посіву та із попередніми даними досліджуваної колонії. З цією ж колонією проводили аналогічні маніпуляції через 210; 240 та 360 діб зберігання за низької плюсової температури.

Результати дослідження.

Проведеними дослідженнями встановили, що тривале зберігання (7 місяців) за 3°C змінило біологічну активність дисоціативних форм *M. bovis* 240 генерації дослідних (117а, 117б, 117в та 118) варіантів, як при культивуванні за 3, так і 37°C. Після розведення, пересівання та культивування останніх на живильному середовищі за 37°C

виявляли ріст двох варіантів дисоціативних форм *M. bovis*: 117в у 10–8 розведенні на 5 добу культивування та 118 у 10–7 розведенні на 14 добу; за 3°C – одного варіанту: 118 у 10–9 розведенні – на 7 добу (табл. 1). У пробірках виявляли поодинокі ізольовані колонії, а у 118 варіанту біля

конденсату – ще й злиті між собою колонії. Колір всіх культур був від світло бурого до яскраво помаранчевого. Проте, як зазначалося раніше [11], за температури культивування 37°C виявлено ріст лише 117б варіанту.

Таблиця 1. Біологічна активність *M. bovis* штамів дисоціативних форм на середовищі Левенштейна-Йенсена після 210-добового перебування культури за 3°C

<i>M. bovis</i> , штамі	t °C	В розведенні кількість колоній, на добу																		
		10 ⁻⁷				10 ⁻⁸				10 ⁻⁹										
		7	14	21	28	35	42	7	14	21	28	35	42	7	14	21	28	35	42	
117 а	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117 б	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117 в	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
118	3	-	1	1	1/сп	1/сп	1/сп	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1/сп	1/сп	-

Примітка: сп – суцільний ріст колоній мікобактерій

Дисоціативні форми *M. bovis* 117в варіанту на живильному середовищі за 37°C утворили одну кратероподібну колонію, яка мала яскраво помаранчевий колір та сухувату консистенцію. Під мікроскопом спостерігали некіслотостійкі зернисті палички різної довжини та зерна, кислотостійкі зігнуті зернисті палички та зерна, які відмічали і в попередніх дослідженнях (рис. 1).

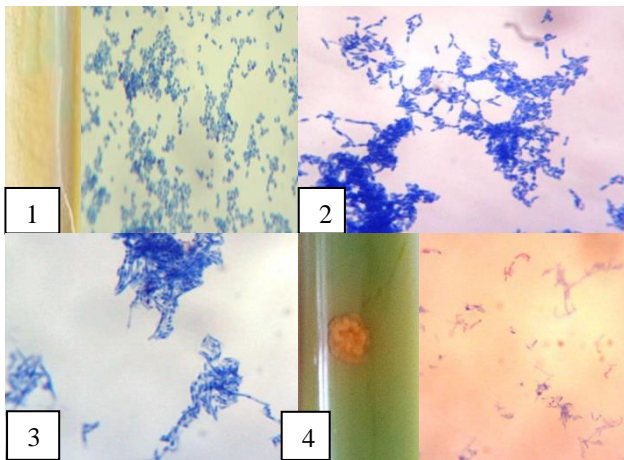


Рис. 1. Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія (×1600) *M. bovis* 117в варіанту, які культивувалися за 37°C: культура і мікобактерії 1 – вихідні; 2 – вихідні через 7 місяців зберігання; 3 – на 14 добу після появи колоній; 4 – на 90 добу після появи колоній

Після розведення та посіву 118 варіанту дисоціативних форм мікобактерій на живильне середовище виявили ріст за умов термостату (37°C) на сім діб раніше, ніж за 3°C. Культури різнилися своїми культуральними властивостями: за 37°C відмічали помаранчеву матову колонію великого розміру сухуватої консистенції, на поверхні та краях якої вироста велика кількість

“карликових” колоній. За 3°C відмічали ріст однієї сіро-жовтої колонії S-форми, яка мала гладку блискучу поверхню з рівними краями та маслянисту консистенцію. Пізніше на середовищі цих пробірок (як за 3, так і за 37°C) біля конденсату з’явився ріст злитих між собою колоній (на 24 та 30 добу відповідно), якій за властивостями були подібними до колоній, що з’явилися першими.

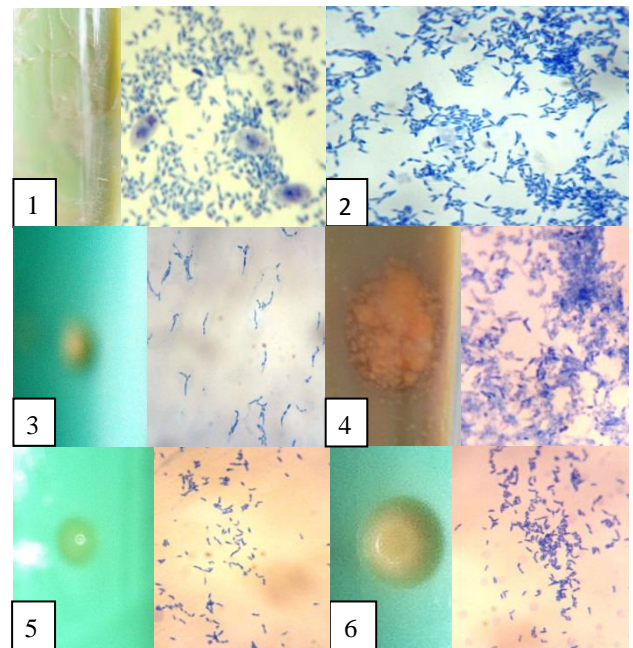


Рис. 2. Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія (×1600) *M. bovis* 118 варіанту, які культивувалися за 3 та 37°C: культура і мікобактерії 1 – вихідні; 2 – вихідні через 7 місяців зберігання; 3 – за 37°C на 14 добу від появи колоній; 4 – за 37°C на 90 добу від появи колоній; 5 – за 3°C на 14 добу від появи колоній; 6 – за 3°C на 90 добу від появи колоній.

За морфологією мікобактерії цього варіанту, культивованих за різних температурних режимів, майже не відрізнялися між собою і були подібними до вихідних (рис. 2). Мікроскопією виявляли товсті прямі та вигнуті некіслотостійкі палички різної довжини та некіслотостійкі зерна.

Проведеними дослідженнями, через 240 та 360 діб після появи перших колоній у вихідних культур, встановили, що лише 117в (за 37°C) та 118 (за 3 та 37°C) варіанти зберегли життєздатність клітин (табл. 2, 3).

Таблиця 2. Біологічна активність *M. bovis* штамів дисоціативних форм на середовищі Левенштейна-Йенсена після 240-добового перебування культури за 3°C

<i>M. bovis</i> , штам	t °C	В розведенні кількість колоній, на добу																	
		10 ⁻⁷						10 ⁻⁸						10 ⁻⁹					
		7	14	21	28	35	42	7	14	21	28	35	42	7	14	21	28	35	42
117 а	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117 б	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117 в	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
118	3	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблиця 3. Біологічна активність *M. bovis* штамів дисоціативних форм на середовищі Левенштейна-Йенсена після 360-добового перебування культури за 3°C

<i>M. bovis</i> , штам	t °C	В розведенні кількість колоній, на добу																	
		10 ⁻⁷						10 ⁻⁸						10 ⁻⁹					
		7	14	21	28	35	42	7	14	21	28	35	42	7	14	21	28	35	42
117 а	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117 б	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117 в	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
118	3	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	-	-	-	-	-	-

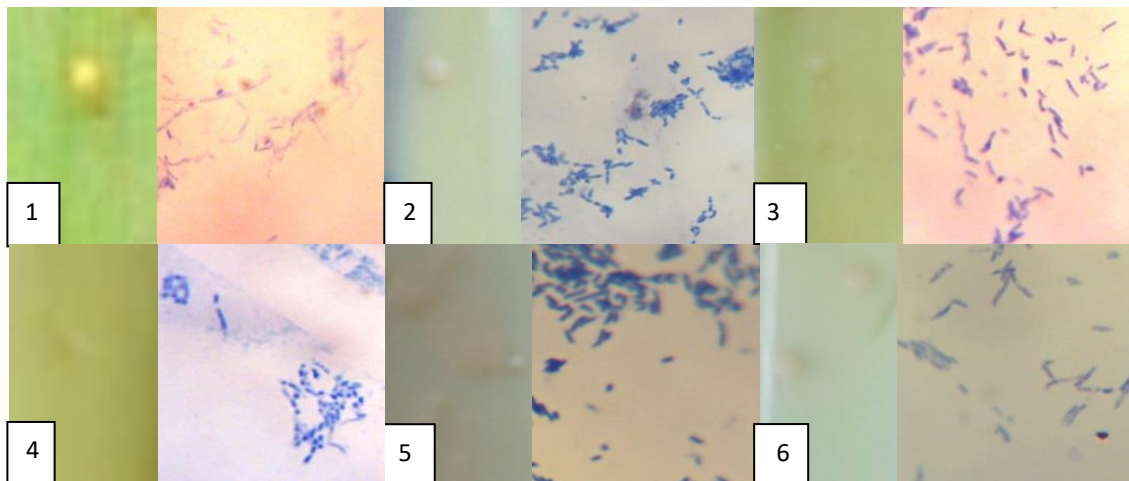


Рис. 3. Тинкторіальні властивості та морфологія (×1600) *M. bovis* 117в та 118 варіантів, які культивувалися за 3 та 37°C: культура і мікобактерії1 – 117в варіант через 240 діб після появи перших колоній за 37°C; 2 – 117в варіант через 360 діб після появи перших колоній за 37°C; 3 – 118 варіант через 240 діб після появи перших колоній за 3°C; 4 – 118 варіант через 240 діб після появи перших колоній за 37°C; 5 – 118 варіант через 240 діб після появи перших колоній за 3°C; 6 – 118 варіант через 360 діб після появи перших колоній за 37°C.

На живильних середовищах, починаючи з 21–35 доби культивування, виявляли по одній-дві колонії (рис. 3). 117в варіант формував випуклу, з жовтуватим відтінком колонію; 118 варіант – за 3°C – випуклу сіро-білу блискучу, а за 37°C – сіро-білу матову колонію. За морфологією мікобактерії не

відрізнялися від вихідних. Мікроскопією виявляли некіслотостійкі зернисті палички різної довжини та зерна. У 117в варіанту і кислотостійкі поодинокі зерна. Проте, морфологічні ознаки культур мікобактерій різнилися між собою після культивування за різних температурних режимів:

за 37°C спостерігали більш зернисті палички, ніж за 3°C.

Як зазначалося вище, встановлено, що 117а та 117б варіанти дисоціативних форм *M. bovis* через 7 місяців (210 діб) витримування культур та подальшого дослідження (розведення, пересіву і культивування), не давали видимого росту при культивуванні на живильних середовищах як за 3°C, так і 37°C. Хоча за мікроскопії витриманої культури 117а варіанту відмічали в основному некіслотостійкі середньої довжини палички та некіслотостійкі зерна, на відміну від вихідної культури, де переважали некіслотостійкі короткі палички (рис. 4).

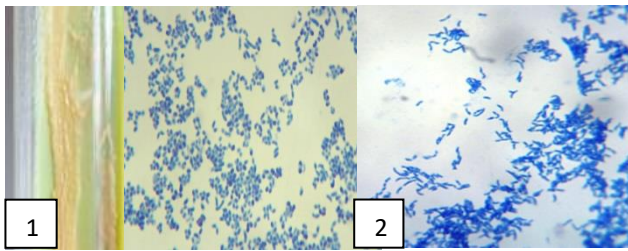


Рис. 4. Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія ($\times 1600$) *M. bovis* 117а варіанту: культура і мікобактерії 1 – вихідні; 2 – вихідна через 7 міс після витримування культури.

Мікроскопією мікобактерій 117б варіанту виявляли також подібні до вихідних некіслотостійкі переважно середньої довжини та короткі зернисті, а також поодинокі довгі зернисті палички та некіслотостійкі зерна (рис. 5).

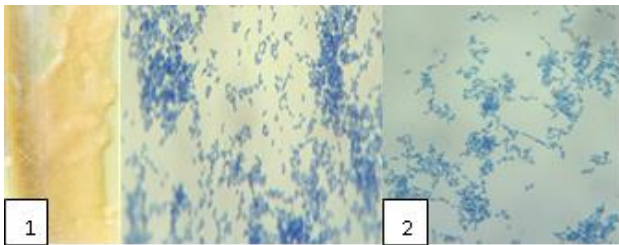


Рис. 5. Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія ($\times 1600$) *M. bovis* 117б варіанту: культура і мікобактерії 1 – вихідні; 2 – вихідні через 7 міс після витримування культури.

Обговорення. Вивчення біологічної активності мікобактерій бичачого виду дисоціативних форм чотирьох варіантів засвідчило, що тільки два з них 117в та 118 володіють здатністю тривало зберігати властивість адаптуватися на штучному живильному середовищі, розмножуючись, утворювати колонії як за 3, так і за 37°C. На 360 добу зберігання мікобактерії 117в варіант утворював поодинокі колонії за 37°C на 28 добу культивування, 118 варіант – поодинокі колонії як за 3°C (на 21 добу), так і за 37°C (на 28 добу). За цього в розведенні 10–9 росту колоній не спостерігалося. Можна

стверджувати, що досліджувані варіанти володіють особливостями окремих відмінних один від одного штамів *M. bovis* дисоціативних форм.

Висновки.

1. Два варіанти (117в та 118) з чотирьох дисоціативних форм мікобактерій бичачого виду володіють здатністю тривало зберігати властивість адаптуватися на штучному живильному середовищі, розмножуючись утворювати колонії як за 3, так і за 37°C.

2. На 360 добу зберігання мікобактерії 117в варіант утворював поодинокі колонії за 37°C на 28 добу культивування, 118 варіант – поодинокі колонії як за 3°C (на 21 добу), так і за 37°C (на 28 добу). За цього в розведенні 10–9 росту колоній не спостерігалося.

3. Досліджувані варіанти володіють особливостями окремих штамів *M. bovis* дисоціативних форм.

Література

1. Біологічна активність епізоотичних та музейних штамів *M. bovis* / О.А. Ткаченко, Н.Г. Усеева, В.В. Глебенюк, О.М. Кулішенко // Науковий вісник Львівського НУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького. – 2007. – Т. 9, № 3 (34), Ч. 1. – С. 218–224.
2. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: культуральні особливості за температур 3 і 37 °C / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Місків [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 3 – С. 33–35.
3. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості за температур 3 та 37 °C / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Зажарський [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 12 – С. 27–30.
4. Биологические свойства лабораторных штаммов и клинических изолятов микобактерий, полирезистентных к противотуберкулезным препаратам / А.А. Корнеев, В.И. Гольшевская, Э.В. Севастьянова и др. // Проблемы туберкулеза. – 1999. – № 2 – С. 44–47.
5. Биологические свойства *M. bovis* диссоциативных L- и других форм при различных температурах культивирования / А.А. Ткаченко, И.Н. Шендрик, В.В. Мискив, М.В. Білан // Междун. научно-практич. журнал. – Минск. – 2013. – № 2. – С. 24–31.
6. Борисов С.Е. Диагностика туберкулеза: возможности и пределы // Проблемы туберкулеза. – 2001. – № 3 – С. 5–9.
7. Вейсфейлер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичных микобактерий / Ю.К. Вейсфейлер – Будапешт: Изд-во АН Венгрии, 1975. – 336 с.
8. Ветеринарная энциклопедия / [под ред. К. И. Скрябина]. – М.: Советская энциклопедия. – Т. 6. – 1976. – 1030 с.
9. Влияние температур культивирования *M. bovis* диссоциативных форм на морфологические признаки и тинкториальные свойства / Ткаченко О.А., Зажарский В.В., Алексеева Н.В. // Мат. Международной научно-практической конференции “Аграрная наука – основа успешного развития АПК и сохранения экосистем”. – Волгоград, 2012. – Т. 2. – С. 205–208.
10. Зависимость биологической активности бактерий *Bacillus SP.* из многолетнемерзлых пород от температуры / Л.Ф. Каленова, А.М. Субботин, А.С. Бажин, М.А. Новикова // Вестник новых медицинских технологий. – 2014. – Т. 21, № 4. – С. 124–147.

11. З'ясування біологічної активності та «чистоти» культури дисоціативних форм *M. bovis* / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, О.Г. Глебенюк та ін. // Вісник Дніпропетровського ДАЕУ. – 2016. – № 2 (40). – С. 66–69.
12. Культуральні властивості та морфологічні і тинкторіальні ознаки дисоціативних форм *Mycobacterium bovis* культивованих за 3 та 37 °С / О.М. Кулішенко, П.О. Давиденко, О.Г. Глебенюк [та ін.] // Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. – 2015. – Т. 3. – № 1. – С. 9. Режим доступу: <http://www.biosafety-centr.dp.ua/>
13. Лабораторна діагностика туберкульозу тварин: [Практичний посібник] / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Зажарський, Л.О. Ковальова. – Дніпропетровськ: видавництво “Свідлер А.Л.”, 2010. – 208с.
14. Милько Е. С. Нестабильность синтеза практически ценных веществ бактериями и процесс диссоциации / Е. С. Милько // Прикладная биохимия и микробиология. – 1990. – Т. 26, № 6. – С. 732–742.
15. Космодамианский В.Н. Бактериология и патогенез туберкулёза [Текст] / В.Н. Космодамианский. – М.: Медгиз, 1950. – 198 с.
16. Палій А.П. Епізоотологічний моніторинг туберкульозу великої рогатої худоби та науково-експериментальне обґрунтування розробки і застосування засобів дезінфекції: автореф. дис. ... док. вет. наук: 16.00.03. / Палій Анастолій Павлович; Нац. акад. аграр. наук України, Нац. наук. центр “Інст. експерим. і клініч. вет. медицини”. – Харків, 2013. – 40с.
17. Ткаченко О.А. Вплив температури культивування на вірулентність мікобактерій / О.А. Ткаченко, В.В. Глебенюк // Вісник Дніпропетровського ДАУ. – 2008. – №2. – С. 112–114.
18. Ткаченко О.А. Оцінка вірулентності *M. bovis* патогенних та дисоціативних форм в асоціації зі стонгілоїдесами / О.А. Ткаченко, І.М. Шендрік // Вісник Житомирського національного агроекологічного університету. – 2012. – № 1 (32). – Т. 3, 41. – С. 228–232.
19. Чернушенко Е.Ф. Микробиологическая и иммунологическая диагностика туберкулёза в современных условиях / Е.Ф. Чернушенко // Журн. АМН України. – 1998. – Т. 4. – № 1. – С. 118–132.
- Korneev, A.A., Golyishevskaya, V.I., Sevastyanova, E.V. et al. (1999). Biologicheskie svoystva laboratornykh shtammov i klinicheskikh izolyatov mikobakteriy, polirezistentnykh k protivotuberkulyoznyim preparatam. *Problemy tuberkulyoza*. 2. 44–47.
- Tkachenko, A.A., Shendrik, I.N., Miskiv, V.V., Bilan, M.V. (2013). Biologicheskie svoystva *M. bovis* dissotsiativnykh L- i drugih form pri razlichnykh temperaturah kultivirovaniya. *Mezhdun. nauchno-praktich. zhurnal*. Minsk. 2. 24–31.
- Borisov, S.E. (2001). Diagnostika tuberkulyoza: vozmozhnosti i predelyi. *Problemy tuberkulyoza*. 3. 5–9.
- Veysfeyler, Yu.K. (1975). *Biologiya i izmenchivost mikobakteriy tuberkulyoza i atipichnykh mikobakteriy*. Budapesht: Izd-vo AN Vengrii.
- Skryabin, K. I. (Ed) *Veterinarnaya entsiklopediya* (1976). (Vol. 6). – Moskva.: Sovetskaya entsiklopediya.
- Tkachenko, O.A., Zazharskiy, V.V., Alekseeva, N.V. (2012). *Vliyanie temperatur kultivirovaniya M. bovis dissotsiativnykh form na morfologicheskie priznaki i tinktorialnyye svoystva*. Volgograd.
- Kalenova, L.F., Subbotin A.M., Bazhin A.S., Novikova M.A. (2014). Zavisimost biologicheskoy aktivnosti bakteriy *Bacillus SP. iz mnogoletnemertzlykh porod ot temperatury*. *Vestnik novykh meditsinskih tehnologiy*. 21, 4. 124–147.
- Tkachenko, O.A., Bilan, M.V., Glebenyuk, O.G. et al. (2016). Z'yasuvannya biologichnoyi aktivnosti ta “chistoti” kulturi disotsiativnykh form *M. bovis*. *Visnik Dnipropetrovskogo DAEU*. 2 (40). 66–69.
- Kulishenko, O.M., Davidenko, P.O., Glebenyuk, O.G. et al. (2015). Kulturalni vlastivosti ta morfologichni i tinktorialni oznaki disotsiativnykh form *Mycobacterium bovis* kultivovanih za 3 ta 37 °H. *Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC*. 3 (1). 9. Retrieved from <http://www.biosafety-centr.com/>
- Tkachenko, O.A., Bilan, M.V., Zazharskiy, V.V., Kovalova, L.O. (2010). *Laboratorna diagnostika tuberkulozu tvarin*. Dnipropetrovsk: vidavnitstvo “Svidler A.L.”.
- Milko, E. S. (1990). Nestabilnost sinteza prakticheski tsennykh veschestv bakteriyami i protsess dissotsiatsii. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 26. 6. 732–742.
- Kosmodamianskiy, V.N. (1950) *Bakteriologiya i patogenez tuberkulyoza*. Moskva: Medgiz.
- Paliy, A.P. (2013). Epizootologichniy monitoring tuberkulozu velikoyi rogotoyi hudobi ta naukovno-eksperimentalne obgruntuvannya rozrobki i zastosuvannya zasobiv dezinfektsiyi. *Extended abstract of Doktor's thesis*. Harkiv.
- Tkachenko, O.A., Glebenyuk, V.V. (2008). Vpliv temperaturi kultivuvannya na virulentnist mikobakteriy. *Visnik Dnipropetrovskogo DAU*. 2, 112–114.
- Tkachenko, O.A. Shendrik, I.M. (2012). Otsinka virulentnosti *M. bovis* patogennih ta disotsiativnykh form v asotsiatsiyi zi stongiloyidesami. *Visnik Zhitomirskogo natsionalnogo agroekologichnogo universitetu*. 1 (32). 3, 41, 228–232.
- Chernushenko, E.F. (1998). Mikrobiologicheskaya i immunologicheskaya diagnostika tuberkulyoza v sovremennykh usloviyah. *Zhurn. AMN Ukraini*. 4, (1) 118–132.

References

Tkachenko, O.A., Useeva, N.G., Glebenyuk, V.V. & Kulishenko, O.M. (2007) Biologichna aktivnist epizootichnih ta muzeynih shtamiv *M. bovis*. *Naukoviy visnik Lvivskogo NUVM ta BT im. S.Z. Gzhitskogo*. Lviv, 9, 3 (34), 1. 218–224.

Tkachenko, O.A., Bilan, M.V., Miskiv, V.V. et al. (2010). Biologichni vlastivosti disotsiativnykh form *M. bovis*: kulturalni osoblivosti za temperatur 3 i 37 °H *Veterinarna meditsina Ukraini*. 3. 33–35.

Tkachenko, O.A., Bilan, M.V., Zazharskiy, V.V. et al. (2010). Biologichni vlastivosti disotsiativnykh form *M. bovis*: morfologichni oznaki ta tinktorialni vlastivosti za temperatur 3 ta 37 °H. *Veterinarna meditsina Ukraini*. 12. 27–30.