

УДК 619:616.98:579.873.21:57.083.32:636.5

Ткаченко О.А., д. вет. н., професор**Зажарський В.В.**, к. вет. н., доцент**Алексєєва Н.В.**, к. вет. н. ©

Дніпропетровський державний аграрний університет

**БІОЛОГІЧНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ МОРФОЛОГІЧНИХ ОЗНАК ТА
ТИНКТОРІАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ *M. BOVIS* ДИСОЦІАТИВНИХ
ФОРМ ЗА ВПЛИВУ ТЕМПЕРАТУРИ**

Встановлено, що *M. bovis* дисоціативних форм в динаміці пересівів, за температури культивування 37 °С, динамічно змінюються через різні форми в елементарні тільця, а за культивування 3 °С трансформуються в некислотостійкі паличковидні й зернисті форми збудника туберкульозу.

Ключові слова: *M. bovis* дисоціативні форми, динаміка пересівів, елементарні тільця, паличковидні форми, зернисті форми, культивування за температури 3 °С та 37 °С

Вступ. Життєздатність мікобактерій на штучних живильних середовищах багато в чому визначається їх біохімічним складом і потенціальними можливостями, оскільки еволюційно сформовані та передані нащадкам генетичні властивості мікобактерій можуть суттєво змінюватися під впливом різних факторів, в тому числі і гомеостазу тварини. Відтворення цих явищ в експерименті дозволяє наблизити розуміння тривалості епізоотичного процесу туберкульозу та повторних спалахів хвороби тварин в окремих господарствах [1, 2, 3].

Тому метою роботи було визначення в динаміці пасажів зміну особливостей біологічних властивостей *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за температури 3 °С та 37 °С.

Матеріали та методи досліджень. В роботі використано музейні культури *M. bovis* третьої генерації 117 а, 117 б та 117 в варіантів. Досліджували вплив кількості пасажів на інтенсивність розмноження (характер формування колоній) *M. bovis* дисоціативних форм на живильному середовищі з рН 7,1. Облік проводили під імерсією мікроскопу за таких показників: характеру культурального росту, морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості *M. bovis* дисоціативних форм культивованих за температури 3 °С та 37 °С (контроль). Всього було проведено 20 пересівів.

Результати досліджень. На підставі проведених досліджень встановлено, що субкультура *M. bovis* 117 а варіанту 3 генерації за 3 °С формувалася некислотостійкими дрібними, зернистої форми мікроорганізмами, а за 37 °С – некислотостійкими короткими паличками (зернисті) та довгими ниткоподібними (начебто з дрібних зерен) формами, зустрічалися й поодинокі зерна; - 5-7 генерації за 3 °С субкультура формувалася мікроорганізмами такими ж, як і попередня, хоча

й зустрічалися типові форми *M. bovis*; - 7 генерація за 3 °С некіслотостійкі зернисті форми, а за 37 °С - овали з різною оптичною щільністю поверхні, причому значна кількість таких овалів (сьома генерація) з розрушеною клітинною стінкою (з них звільнялися дрібні зерна) та поодинокі некіслотостійкі, тонкі й довгі палички, зерна (дещо червонуваті); - 8 генерації за 3 °С - формувалася більш довгими зернистими паличками, хоча й зустрічалися типові форми *M. bovis*, за 37 °С домінували L - форми, проте рідко зустрічалися й зерна з дещо червонуватим відтінком; - 10 генерації за 3 °С не відмічено суттєвих змін в морфології мікобактерій - короткі палички й зернисті форми, за 37 °С відбулися суттєві зміни - зменшилася кількість L-форм, але на цьому фоні значно збільшилася кількість дрібних синіх, злегка червонуватих, зерен, з'явилися довгі й поодинокі сині зернисті палички; - 11 генерації - морфологічна картина мікроорганізмів обох субкультур практично залишалися подібною до попередньої за 3 °С – короткі й довгі палички, за 37 °С – L-форми та дрібні сині, злегка червонуваті елементарні тільця; - 13 генерації за 3 °С - у вигляді коротких й довгих синіх паличок; - 15 генерація за 3 °С - виявлено, в загальному, більш довші некіслотостійкі форми паличок; - 17 генерація за 37 °С - поряд з L-формами, елементарними червонуватими тільцями наявність довгих й коротких зернистих, як прямих так і зігнутих, некіслотостійких паличок; - 20 генерація за 37 °С домінуючими морфологічними елементами виявилися елементарні тільця з червонуватим відтінком, хоча й зустрічалися як L-форми, так і некіслотостійкі палички.

Необхідно зазначити, що з появою елементарних тілець принципово змінився зовнішній вигляд культури. Якщо за відсутності або їх незначної кількості, культура у вигляді суцільного росту по лінії висіву зависі досліджуваних мікроорганізмів інтенсивно збільшувалася в часі, то з появою елементарних тілець, через 4-5 діб культивування, культура начебто провалювалося під її тиском в середовище і знаходилася в жолобі; з часом плівка суцільного росту культури витончувалась й через 2-4 тижні середовище стікало, що свідчить, напевно, про нові, особливі властивості у елементарних тілець досліджуваних культур (таке явище виявлено і в інших, за таких умов культивування, досліджених і нижче описаних культур), що обумовлено незвичайними, відмінними від традиційних ферментами (здатних лізувати, розчиняти штучне живильне середовище).

Досліджуючи *M. bovis 117 б варіанту*: - 1 генерації за 3 °С виявлено, що мікроорганізми характеризувалися некіслотостійкими кокоподібними та паличкоподібними зернистими формами, поодинокими червоними елементарними тільцями, а за 37 °С – некіслотостійкими короткими й довгими тонкими зернистими паличками, з кислото- та некіслотостійкими елементарними тільцями, (палички, іноді, ниткоподібної форми); - 2 генерації за 3 °С субкультура формувалася більшою частиною, некіслотостійкими короткими й більш довгими зернистими паличками, а за 37 °С – переважно, ниткоподібними витонченими зернистими й короткими та поодинокими елементарними тільцями, окремі ниткоподібні форми вміщують колбоподібні темносині утворення, які в 3-4 рази більші за діаметр ниткоподібних форм; - 3 генерації за 3 °С – переважно некіслотостійкі й більш довгі зернисті палички та, інколи, елементарні тільця, за

37 °С короткі й більш довгі некіслотостійкі паличк; - 5 генерації за 3 °С - не кіслотостійкі, в основному, короткі паличк; - 7 генерації за 37 °С – практично тільки L-форми й, рідко, елементарні тільця, за 3 °С – переважно короткі й зернисті кіслото- й некіслотостійкими форми та незначна кількість елементарних тілець; - 8 генерації за 3 °С – некіслотостійкі, переважно короткі й більш довгі, зернисті палички й елементарні тільця; - 9 генерація в умовах термостату - L-формами та, рідко, некіслотостійкими паличками та зернами; - 10 генерації за 3 °С - не кіслотостійкі, в основному, короткі зернисті палички та поодинокі витончені зернисті ниткоподібні форми та елементарні тільця; - 12 генерації за 3 °С формувалися тільки некіслотостійкими в основному короткими паличками та, інколи, зернами, за 37 °С – L-формами, елементарними тільцями та, інколи, коротенькими паличками; - 14 генерації за 3 °С некіслотостійкі короткі й довгі зернисті паличками та, інколи, зернами; - 15 генерації за 37 °С виявлена значна кількість елементарних тілець (переважно некіслотостійких) та L-форми; - 18 генерації за 37 °С - L-форми, некіслотостійкі довгі й короткі зернисті палички та елементарні тільця (окремі L-форми розрушені з яких виходять зерна); - 20 генерації за 37 °С - переважно елементарні тільця, L-форми та інколи зернисті некіслотостійкі палички.

Вивчаючи *M. bovis 117 в варіанту*: - 1 генерації культивованих за 3 °С й 37 °С відмічено, що вони характеризувалися, практично, однаковими ознаками - некіслотостійкі, зернисті, короткі й довгі палички, зі значно більшою наявністю елементарних тілець в субкультури, яка культивувалася в умовах термостату; - 3 генерації за 3 °С – некіслотостійкі палички, в той час, як за 37 °С 4 генерації поміж елементарних тілець і незначної кількості паличок (коротких і більш довгих), відмічені й ниткоподібні некіслотостійкі зернисті форми; - 5 генерації – продовжували генерувати палички, а 6 генерації за 37 °С – на фоні таких паличок, поодинокі L-форми. Елементарних тілець, як в першій, так і в другій субкультури, практично, не виявлено; - 7 генерації за 3 °С – генерація некіслотостійких паличок як коротких, так і більш довгих; - 8 генерації встановлені суттєві відмінності за 37 °С - L-форми та поодинокі, з червонуватим відтінком, елементарні тільця; - 9 генерації за 37 °С - L-форми, ниткоподібні та короткі зернисті палички й елементарні, з червонуватим відтінком, тільця, за 3 °С – елементарні тільцям, з червонуватим відтінком, та паличками (короткими та більш довгими) з зернами; - 11 генерації за 3 °С не виявлено суттєвих змін; - 12 генерації за 37 °С - зникли довгі ниткоподібні мікроорганізми, з появою (з більш вираженою кіслотостійкістю) елементарних тілець; - 15 генерації за 3 °С та 18 генерації за 37 °С субкультура характеризувалася, відповідно, попередньо описаними формами мікроорганізмів.

Підсумовуючи та обмірковуючи дані досліджень дисоціативних форм *M. bovis 117 а*, *M. bovis 117 б варіанту*, можна відмітити певну закономірність морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей мікроорганізмів в залежності від температурних умов культивування: - за температури 3 °С – морфологічні форми й їх тинкторіальні властивості практично стабільні впродовж 20 разових пересівів; - за температури 37 °С – динамічно змінюється морфологія та

тинкторіальні властивості й характер росту культури з часу появи в популяції досліджуваних мікроорганізмів елементарних тілець, з появою яких ріст культури змінювався - через 2-4 тижні від початку росту, вона, начебто, провалювалася в середовище й практично зникала. В умовах холодильника цього не спостерігалось – хоча інтенсивність росту культури з часом збільшувалася. *M. bovis 117 в варіанту* маючи практично однакову з двома першими варіантами динаміку морфо-тинкторіальних змін в цілому в умовах холодильника розмножуються тільки палички та поодинокі елементарні тільця, а термостата – палички, L-форми, елементарні тільця.

Узагальнюючи динаміку морфологічних ознак, тинкторіальних властивостей та характер росту культур L-форм, незаперечним є те, що й в цьому випадку вона подібна до такої, яка прослідковувалася з мікроорганізмом *M. bovis 117 а, 117 б та 117 в* варіантів: в умовах холодильника в часі генерували, на фоні стабільності культури, некислотостійкі зернисті палички зі зменшенням кількості, в порівнянні з вихідною культурою, L-форм; в умовах термостату на фоні L-форм та паличок з'являються червонуваті елементарні тільця, що змінюють характер росту культури. Розглянувши тільки ці аспекти з різномайття біологічних властивостей *M. bovis* можна відмітити, що одержані результати свідчать про значні відмінності дисоціативних форм *M. bovis* від материнського варіанту, а відтак про їх особливий вплив на макроорганізм.

Вочевидь тільки пасажі (пересіви) можуть виявити нові закономірності біологічних властивостей мікроорганізму (зокрема *M. bovis*), хоча існують повідомлення що свідчать про зміни в певній популяції мікобактерій за старіння культури, дії температури, хімічних речовин й інших чинників.

В той же час такого спрямування робота з *M. bovis* дисоціативних форм проведена вперше і її результати свідчать про значний вплив температури на біологію *M. bovis*, їх досить швидко конверсію (трансформацію) впродовж двадцяти пересівів. При цьому температура, екстраполюючи на макроорганізм (в цілому), може визначати динамічні зміни морфології, тинкторіальних показників: від типових кислотостійких паличок до елементарних тілець, які є кінцевим варіантом біологічного циклу розвитку *M. bovis* зі збереженням геному, що дає початок відомій формі збудника туберкульозу. За цього не тільки палички трансформуються в елементарні тільця але й L-форми. Більш висока температура (37 °C), визначена попередниками як оптимальна для культивування *M. bovis*, стимулює трансформацію мікобактерій в елементарні тільця, діагностувати які в теперішній час не можливо, особливо диференціювати їх від інших, що утворилися з багатьох відомих видів грампозитивних бактеріальних форм. Водночас низькі плюсові температури (3 °C) стабілізують морфологічні форми та тинкторіальні властивості і, що важливо, L-форми трансформуються в палички різної форми й довжини, що не утримують фуксин.

Виходячи зі знань патогенезу туберкульозу, необхідно враховувати одержані результати досліджень і зокрема, що стосується клітинного імунітету, тобто, фагоцитозу. Традиційно відомо, що фагоцитуються бактеріальні клітини розміром 300 нм, а клітини менших розмірів не помічаються й не захоплюються мікро-

макрофагами. Враховуючи, що елементарні тільця менші за мікобактерії, стає очевидним, що вони не захоплюються фагоцитами персистуючи в кров'яному потоці, проникаючи в еритроцити та осідаючи в клітинах різних тканин.

Висновки. Вперше доведено, що *M. bovis* дисоціативних форм в динаміці пересівів, за температури культивування 37 °С, динамічно змінюються через різні форми в елементарні тільця, натомість за 3 °С досліджувані форми мікобактерій трансформуються в некислотостійкі паличковидні й зернисті форми збудника туберкульозу.

Утворення елементарних тілець в популяції форм мікобактерій на штучному живильному середовищі супроводжується поступовим зникненням сформованої у вигляді суцільного росту культури (через два тижні) та провалюванням середовища по смузі її формування з 2-ї до 10-ї доби інкубації, що може свідчити про відмінні від традиційно відомих форм збудника хвороби властивості.

Література

1. Ткаченко О. Швидкоростучі *M. bovis* у проблемі туберкульозу // Ветеринарна медицина України. – 2004. – № 7. – С. 14–17.
2. Білан М.В. Швидкоростучі *M. bovis* / М.В. Білан, О.А. Ткаченко // V Міжнародний конгрес спеціалістів ветеринарної медицини, 3–5 жовтня 2007 р. – К. : Вид-во НАУ, 2007. – С. 71–72.
3. Лабораторна діагностика туберкульозу тварин: практичний посібник / [Ткаченко О.А., Білан М.В., Зажарський В.В., Ковальова Л.О.]. – Дніпропетровськ : Вид-во “Свідлер А.Л.”, 2010. – 208 с.

Summary

Tkachenko A.A., Zazharskiy V.V., Alekseeva N.V.

Dnepropetrovsk State Agrarian University

BIOLOGICAL PATTERNS AND MORPHOLOGICAL FEATURES TYNKTORIALNYH *M. BOVIS* DISSOCIATIVE FORMS FOR EXPOSURE TEMPERATURE

*Dissociative forms *M. bovis* dynamically change during several cultivation at the temperature 37 °C, through various forms into elementary cells. Also they transformed into baculiform and granular forms of tuberculosis which are don't tolerant to the acid in the conditions of cultivation of 3 °C.*

Key words: *M. bovis* dissociative form, dynamics peresiviv, elementary cells, baculiform forms, granular forms of cultivation at a temperature under 37 °C and 3 °C

Рецензент – д.вет.н., проф. Гуфрій Д.Ф.