

ВЕТЕРИНАРНІ НАУКИ

УДК 619:636.22/.28:616.98
© 2018

О.А. ТКАЧЕНКО,
доктор ветеринарних наук

Дніпровський державний
аграрно-економічний університет
E-mail: epizooddae@gmail.com
вул. Сергія Єфремова, 25, м. Дніпро

ТУБЕРКУЛЬОЗ –
НАПРЯМИ ПІЗНАННЯ
І ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМИ

*Наведено результати багаторічної роботи з вивчення біологічних властивостей одного високовірulentного швидкорослого штаму *M. bovis*. Встановлено, що мікобактерії активно змінюються за пасажів (240 пересівів) через штучне живильне середовище без умісту індукуючих чинників, набуваючи невластивих для них ознак та можливість розмножуватися за температури 3 °С. З'ясовано, що, пройшовши ряд стадій, остання морфологічна форма біологічного циклу розвитку – елементарні тільця – генерує кислотостійкі паличкоподібні варіанти збудника туберкульозу. Отримані дані є підставою для перегляду окремих положень інструктивно-нормативних документів, що сприятиме підвищенню ефективності заходів профілактики та викоріненню туберкульозу тварин.*

Ключові слова: *M. bovis*, живильні середовища, дисоціація, біологічні властивості, ферментативна активність, корд-фактор, вірулентність, ліпіди, біологічний цикл розвитку.

Постановка проблеми. У біологічному світі існують інфекційні хвороби, збудники яких протягом сотень років, незважаючи на наполегливі зусилля вчених та практиків, залишаються таємничими мікроорганізмами, що позначається через відсутність ефективних специфічних засобів профілактики, діагностики, лікування та боротьби на епізоотичному благополуччі. Причини цього різні: від генетичних можливостей збудника змінюватися залежно від стадії розвитку до постійної адаптації збудника хвороби в межах широкого застосування у тваринництві лікарських препаратів, вакцин, які, без сумніву, опосередковано впливають на біологічні властивості мікробних клітин. До них з упевненістю можна віднести і туберкульоз. Тривала персистенція мікобактерій в організмі видів тварин, й зокрема великої рогатої

худоби, за багаторічного епізоотичного процесу не може не впливати на їх біологічні властивості. Це може супроводжуватися зміною метаболізму мікробної клітини, вмісту ліпідів та інших хімічних складових клітинної стінки й відповідно різноманітними мутаціями та модифікаціями, дисоціативними явищами в тій чи іншій популяції мікобактерій. Один із таких штамів (зокрема швидкорослих) мікобактерій виділено нами у 2004 році [18].

Без сумніву, відсутність глибоких, ґрунтовних знань про мінливість мікобактерій, біологічний цикл їх розвитку позначається на ефективності профілактики й викорінення інфекції. Тому й **метою роботи** стало дослідити в динаміці численних пасажів через щільне живильне середовище біологічні властивості *M. bovis* швидкорослого штаму.

Матеріал та методи. Дослідження проводили в навчальній лабораторії кафедри епізоотології Дніпровського державного аграрно-економічного університету в 2002–2017 рр. за безпосередньої участі канд. вет. наук, доцентів М.В. Білан, О.М. Кулішенка, В.В. Глебенюк, П.О. Давиденка, І.М. Шендрик, Л.О. Ковальнової, А.В. Ковальова, Н.В. Алексеевої.

Для роботи виділили з лімфатичних вузликів корови, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців (без патологоанатомічних туберкульозних змін) *M. bovis*, та використали штамп *Vallee*, ВСG, агипові мікобактерії.

З метою з'ясування швидкості росту колоній на живильному середовищі з різним рН провели 240 пасажів мікобактерій, у тому числі останні 123 пасажі в умовах низьких плісових температур (2–3 °С).

Періодично готували мазки за методом Ціля–Нільсена з ізольованих культур й вивчали під імерсією тинкторіальні властивості, морфологію мікобактерій. Оцінювали біохімічну активність мікобактерій різних пасажів [13].

З'ясування конверсії (трансформації) пасажованих мікобактерій та їх реверсії у вихідні морфологічні форми вивчали шляхом витримання культур за температур 3 та 37 °С та зараження морських свинок.

Для встановлення вірулентності мікобактерій використали морських свинок, яких заражали різними дозами збудника, у тому числі й супервисокою (10 мг/см³). Паралельно оцінювали ступінь вірулентності мікобактерій з їх здатністю утворювати корд-фактор та вмістом у клітинній стінці загальних ліпідів, фракцій ліпідів та вільних жирних кислот [12].

Ступінь атенуації пасажованих мікобактерій оцінювали на морських свинках (триразові прямі пасажі) [29].

З метою встановлення здатності проникання мікобактерій через фільтри використали дисоціативні мікобактерії та їх L-форми.

Сенсibilізувальні та імуногенні властивості вивчали в патогенних та дисоціативних формах досліджуваного штаму *M. bovis*. Результати оцінювали за алергічними реакціями, патологоанатомічними

та гістологічними змінами в органах морських свинок [30].

Результати дослідження. Вивчаючи швидкість розмноження *M. bovis* на щільному живильному середовищі епізоотичних штамів, ізольованих від великої рогатої худоби, встановлено, що одні з них мають підвищений, інші більш помірковий обмін речовин, що призводить до більш швидкого чи повільного росту культур (колоній) [1, 11, 16, 17]. Вочевидь, співвідношення та частота персистенції й циркуляції таких мікобактерій бичачого виду можуть бути різними в тому чи іншому стадії тварин та суттєво впливати на інтенсивність й тривалість перебігу інфекційного та епізоотичного процесів.

З'ясовуючи особливості адаптивної здатності та мінливості *M. bovis* швидкорослого штаму на штучному щільному середовищі за численних пасажів (180 пересівів) з різним рН (6,5; 6,7 та 7,1–7,2), визначено [19, 25], що інтенсивність росту мікобактерій суттєво залежить від умісту кислотного-лужних грамеквівалентів у живильному середовищі: чим він вищий, тим швидкість росту колоній вища. На такому середовищі мікобактерії швидко розмножуються протягом 120 пасажів, тоді як на середовищі з рН 7,1–7,2 до 19-го пасажу спостерігається зниження строків формування колоній. За досить тривалий період спостереження форми колоній змінювалися від дрібних, сухуватих, поодиноких до більш великих і вологих, зі суцільним ростом за тривалого культивування до незначного “димчастого” (“наліт”), суцільного росту в останніх 20-ти генераціях по лінії посіву завису мікобактерій за стабільності кольору культури.

Морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості мікобактерій, залежно від середовища, змінювалися зі збільшенням кількості пересівів. Розпочиналося з 90-ої генерації, у полі зору мікроскопа відмічалися товсті й тонкі, зернисті, короткі й довгі сегментовані палички, червоного кольору та ледь помітні поодинокі ниткоподібні невисокостійкі з нечіткою зернистістю форми. В останніх генераціях, розпочинаючи з 160-ої, на середовищі рН 6,7 почали з'являтися й поодинокі ниткоподібні кислотостійкі сегменто-

вані, з великою кількістю зерен форми мікобактерій [3, 9, 10].

Досліджуючи культури 170-ої і подальших генерацій, у полі зору мікроскопа виявили як кислотостійкі палички, так і некислотостійкі паличко- та ниткоподібні форми мікобактерій.

Поява некислотостійких форм у популяції мікобактерій супроводжувалася зміною зовнішнього вигляду, форм колоній та строків їх формування. Якщо до виникнення поліморфних форм кислотостійкі мікобактерії формували на середовищі окремі колонії з подальшим суцільним ростом по лінії посіву, то мішані (кислото- та некислотостійкі) стимулювали “димчастий” ріст культури по лінії посіву й після затримки росту (з 109–120 по 157–168 пересіви), проявляючи зі 169–180 пасажу майже попередню швидкість розмноження (5–7 діб).

Вивчаючи морфологічний аспект реверсії багаторазово пасажованих некислотостійких ниткоподібних *M. bovis* у бактеріальну кислотостійку форму, встановили: 1 – перетворення некислотостійких зерен (тілець) у материнській клітині в кислотостійкі; 2 – вихід перетворених тілець з материнської клітини та генерацію кислотостійких бактерій; 3 – набуття кислотостійкості кінцевої частини ниткоподібної некислотостійкої форми [9].

Натепер можна зробити висновок: формування кислотостійких бактерій з некислотостійких ниткоподібних відбувається з тілець (зерен), які наповнюють ниткоподібні форми збудника, що підтверджує один з варіантів розмноження.

Водночас на 117 пересіви на живильне середовище з рН 7,1–7,2 в окремих пробірках протягом 3-місячного культивування виявлено поодинокий ріст дрібних гладких, кольору слонової кістки колоній. Пробірки були перенесені для зберігання в умовах холодильника (2–3 °С).

Огляд пробірок через 20 місяців показав наявність на живильному середовищі в 117 пересіви багато дрібних гладких колоній (117а), 1 великої жорсткої (117б) та 1 великої гладкої (117а). Приготували мазки з трьох різних за величиною та формою колоній під мікроскопом виявлено: 117а – сині та червоні

палички та зерна; 117б – сині (некислотостійкі) зерна; 117в – кислотостійкі палички типових варіантів. У другій генерації зареєстровано практично тільки некислотостійкі палички. Проте в субкультури 117б траплялися поодинокі довгі некислотостійкі палички та кислотостійкі паличкоподібні форми (117а) [9, 10, 12].

Отже, за тривалого зберігання в умовах низьких плюсових температур відбувається перелаштування генетичного апарату мікобактерій, що призводить до пригнічення одних і активізацію інших генів, забезпечуючи виживання мікроорганізму в довкіллі. Такі пристосовані форми, змінюючись морфологічно, набувають інших властивостей на тлі зниження вірулентності. Дослідження показали, що за парентерального введення завису таких мікобактерій в дозі 1 мг/см³ морським свинкам не відбувається розвитку інфекційного туберкульозного процесу (принаймні макроскопічно такого не виявлено).

Необхідно акцентувати увагу на тому, що відщеплені (дисоціативні) від патогенної популяції мікобактерій в 117 пересіви відрізнялися від таких пасажованих за 37 °С постійною наявністю ниткоподібних некислотостійких форм та збереженням патогенності (при пасажах через середовище з рН 7,1–7,2 така властивість виявлена й у 120 пересіви) [4, 6, 7, 25].

Окрім цього встановлено, що інтенсивність розмноження *M. bovis* та їх конверсійних форм за низької плюсової температури й за традиційної залежить від рН 6,5 та 7,1–7,2 – на тлі збільшення генерацій (пересівів) мікобактерій зменшується кількість колоній, а з рН 6,7 – збільшується. За 37 °С колонії формуються значно пізніше, ніж за температури 3 °С [5].

Досліджуючи особливості культуральних, тинкторіальних властивостей і морфологічних ознак *M. bovis* дисоціативних L- та інших форм у динаміці пасажів через щільне середовище за температур 3 і 37 °С, встановили певну закономірність морфологічних аспектів мікроорганізмів, яка залежить від температури культивування: 1) за низької плюсової температури в динаміці пересівів, як правило, генеруються (за винятком

117a і б варіантів) некіслотостійкі *M. bovis*; 2) елементарні тільця утворюються за 37 °С культивування (за винятком 117в варіанта мікобактерій, де тільця генеруються і за 3 °С; 3) L-форми більш стабільно генеруються за 37 °С з одночасним утворенням елементарних кислотостійких тілець, за 3 °С на тлі певної зміни морфологічних ознак L-форм генеруються некіслотостійкі короткі й довгі палички (елементарні тільця відсутні) [2].

Аналізуючи біохімічну активність *M. bovis* дисоціативних форм, з'ясували, що дисоціативні форми володіють вищою ферментативною активністю, ніж мікроорганізми материнського штаму *M. bovis*, та стверджують про набуття ними ферментативних властивостей, які непритаманні патогенним мікобактеріям, а характерні атипичним. Утім такі змінені мікобактерії не редукують нітрати, що доводить стабільність та незмінність цієї властивості в досліджених дисоціативних форм збудника туберкульозу.

За культивування на простих живильних середовищах (МПА, МПБ) при 37 °С дисоціативні форми *M. bovis* 5-ої генерації мають вигляд переважно L-форм, тоді як за 3 °С – паличок різних форм та зерен (хоча трапляються й L-форми) [28].

У той же час на простих живильних середовищах дисоціативні форми *M. bovis* 50-ої субкультури проявляють ріст тільки за 3 °С на другу добу культивування з таким збільшенням інтенсивності росту: 1) на МПА – світло-сіра культура по лінії посіву; у МПБ – осад та слабке помутніння з утворенням плівки на сьому добу; 2) морфогенез дисоціативних форм *M. bovis* залежить від середовища: на МПА генеруються переважно некіслотостійкі зерна; у МПБ – некіслотостійкі паличкоподібні елементи [15].

Досліджуючи вплив температури культивування в динаміці пересівів через середовище Левенштейна-Йенсена та морфогенезу *M. bovis* дисоціативних L- та інших форм, встановили [25]: за температури 3 °С – характер культури, морфологічні форми, їх тинкторіальні властивості практично стабільні протягом 20 разових пересівів; за 37 °С – змінюється морфологія, тинкторіальні властивості й характер росту з появою

в популяції досліджуваних мікроорганізмів елементарних тілець. Того ж часу з появою в культурі останніх, через 4–5 діб культивування, культура начебто провалювалася під її тиском у середовище і знаходилася в жолобі, згодом плівка суцільного росту культури стоншується, й через 2–4 тижні середовище стікає, що свідчить, напевно, про нові, особливі властивості в елементарних тілець досліджуваних культур.

Розглядаючи наявність фільтривних форм у субкультурах дисоціантів *M. Bovis*, визначили беззаперечну динаміку змін біологічних властивостей, які показують, що за численних пасажів через штучне живильне середовище підвищується частота утворення ультрадрібних форм та їх адаптація до середовища. Однак це не супроводжується (частіше всього) генерацією таких самих форм мікобактерій у подальших субкультурах, тобто з елементарних тілець (тільки поодиноких) у віддалені строки утворюються паличкоподібні некіслотостійкі форми. Це стверджує закономірну участь ультрадрібних форм у біологічному циклі розвитку мікобактерій, оскільки вони генерують паличкоподібні форми збудника туберкульозу.

Водночас фільтривні некіслотостійкі форми за висіву на елективне середовище для культивування мікобактерій, розмножуючись, утворюють культури у вигляді поодиноких колоній та суцільного росту в декілька разів повільніше, ніж контрольні [27].

Досліджуючи біологічну активність та наявність корд-фактора *M. bovis*, у тому числі їх дисоціантів, відмічено відсутність прямого зв'язку між цими показниками, оскільки окремі штами мікобактерій бичачого виду з утраченою патогенністю утворюють інтенсивний корд-фактор, й навпаки.

Таким чином, наявність або відсутність косоутворення (корд-фактора) у того чи іншого виду мікобактерій не може свідчити про патогенність або апатогенність досліджуваних мікобактерій [26].

Численні пересіви мікобактерій швидко-рослого штаму *M. bovis* засвідчили поступову втрату патогенності, що особливо характерно для мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 6,5–6,7. У мікобактерій, які

пасажувалися через середовище з рН 7,1–7,2, така властивість зберігається більш тривало.

Узагальнюючи та обмірковуючи результати значної роботи з вивчення ліпідного складу мікобактерій, у тому числі й дисоціативних форм, багаторазово пасажованих через живильне середовище з різним рН, можна відзначити ідентичність їх фракцій, якісного складу вільних жирних кислот штаму *Vallee*, BCG, окремих видів атипових мікобактерій [4, 6, 8, 11, 14, 20–25].

Поряд з цим з'ясувалося, що зі збільшенням кількості пересівів, зміною морфологічних ознак, тинкторіальних властивостей на тлі швидкості розмноження змінюються ліпідний склад мікобактерій, структура якості й вмісту вільних жирних кислот: збільшується кількість коротколанцюгових й знижується вміст чи повне зникнення (звичайно, на діагностичному рівні) довголанцюгових жирних кислот.

На тлі таких змін метаболічних процесів мікробної клітини скелетні вільні жирні кислоти (пальмітинова, олеїнова, стерінова) залишаються стабільними в кількісному та якісному відношенні, навіть у дисоціативних форм, які культивуються за низьких плюсових температур й мають властивості атипових мікобактерій.

Наяву тривалі, з багаторазовими пересівами дослідження субкультур одного материнського штаму, що дали можливість дещо по-новому розглянути та оцінити повідомлення ряду дослідників попередніх років, які вивчали ліпідний склад мікобактерій з різною вірулентністю, швидкістю росту, морфологічною ознакою й ін. Стверджуючи закономірні дані, які характерні для того чи іншого штаму мікобактерій, наші дослідження засвідчили, що практично не змінюється склад фракцій та вільних жирних кислот, хоча вміст загальних ліпідів тенденційно знижується зі зниженням ступеня вірулентності. Водночас таке явище супроводжується збільшенням вмісту коротколанцюгових та зниженням довголанцюгових вільних жирних кислот.

Акцентуючи увагу на цьому положенні, яке узгоджується з повідомленнями дослідників минулих років, наголосимо й на

факті, що кислотостійкість не пов'язана з вмістом загальних ліпідів мікобактерій, їх вірулентністю. Так, у мікобактерій штаму BCG, дисоціативних форм *M. bovis* перших генерацій вміст загальних ліпідів, за нашими дослідженнями, становив $1,74 \pm 0,28$ та $2,2 \pm 0,31$ – $2,6 \pm 0,32$ % на наважку відповідно з втраченою вірулентністю, а в таких патогенних штамів *Vallee* та нашого вірулентного швидкорослого (повільнорослого) – $8,82 \pm 0,79$ та $11,8 \pm 1,60$ %. Між тим здатність утримувати фуксин зберігають як авірулентні, так і вірулентні мікобактерії. За цього фракційний склад загальних ліпідів ідентичний за якістю та кількісним вмістом. Проте в авірулентних мікобактерій не тільки знижується вміст довголанцюгових вільних жирних кислот, але й припиняється синтез узагалі деяких з них.

Повертаючись до скелетних вільних жирних кислот, які ми досліджували в різні періоди роботи, можна засвідчити (таблиця), звичайно з певною обережністю, що незалежно від біологічної активності мікобактерій вміст аналізованих кислот практично не відрізняється. Хоча є в цьому узагальнюючому попередньому висновку й досить суттєва відмінність між двома вірулентними штамми мікобактерій: вміст пальмітинової та стеаринової кислот у мікобактерій швидкорослого штаму був в 1,5 та 1,28 раза відповідно вищим, ніж у штаму *Vallee*. У той же час олеїнова кислота за вмістом виявилася реально ідентичною.

Подібна картина спостірагалася й у штамів авірулентних мікобактерій. Однак у таких мікобактерій штаму BCG всі три кислоти мали нижчий вміст, ніж у трьох штамів авірулентних дисоціативних форм.

Найнижчий сумарний вміст скелетних кислот відмічається у мікобактерій вакцинного штаму та дисоціативних форм, а найвищий – у вірулентного швидкорослого штаму та одного з варіантів його дисоціативних форм. Олеїнової кислоти в останніх вміщується у 2,34–4,6 раза менше, ніж в інших досліджених варіантах мікобактерій.

Підсумовуючи вміст скелетних кислот у досліджених мікобактерій, можна з високим ступенем вірогідності стверджувати: їх

Вміст скелетних вільних жирних кислот у вірулентних й авірулентних *M. bovis*, % на наважку

№ п/п	ВЖК	Vallee	Швидкорослі	BCG	Дисоціативні форми (117a, б, в)
1.	Пальмітинова	18,87±0,98	28,49±1,43	21,12±0,07	25,22±0,39–45,59±0,58
2.	Олеїнова	27,18±1,43	28,39±1,34	14,57±0,4	6,15±0,44–22,2±0,62
3.	Стеаринова	11,75±0,59	15,09±0,56	11,48±0,23	25,98±0,57–31,39±0,32
Σ		19,26±0,1	23,99±1,1	15,72±0,23	19,11±0,46–33,06±0,5

рівень не може певною мірою свідчити про ступінь вірулентності.

Очевидно, це твердження не припустимо повністю спростувати, особливо у відриві від динаміки вмісту інших коротко- й довголанцюгових вільних жирних кислот, вміст яких динамічно змінювався, зокрема у швидкорослого штаму та його дисоціативних форм. Але швидкорослі мікобактерії (не відносячи дисоціативні форми) мають суттєві відмінності.

Так, за систематичних послідовних численних пасажів через штучне яєчне живильне середовище з рН 6,5 на 150-му пересіві з 19 вільних жирних кислот вихідних мікобактерій виявилось на діагностичному рівні тільки 10 на тлі вмісту пальмітинової, олеїнової, стеаринової кислот: 28,97±0,91; 27,16±0,55; 13,58±0,52 % відповідно. Співвідношення насичених і ненасичених, а також коротко- та довголанцюгових вільних жирних кислот становило 36,2 та 63,8 % й 80,79 та 19,21 % відповідно.

Водночас у мікобактерій дисоціативних форм вміщується 16–17 кислот й вміст скелетних кислот зменшився, як і в таких швидкорослого штаму, з одночасним синтезом (до діагностичного рівня) до цього не ідентифікованої коротколанцюгової вільної жирної кислоти – ундеканової.

Отримані результати дають змогу висловити думку про те, що інтенсивність синтезу вільних жирних кислот, як коротко-, так

і довголанцюгових, відбувається за рахунок скелетної групи. Скелетна група кислот, незалежно від умов розмноження мікобактерій, практично є стабільною, забезпечуючи компенсаторну функцію та, залежно від вірулентності, відповідний вміст і коротко-, і довголанцюгових вільних жирних кислот.

Підтвердженням повідомлень авторів попередніх десятиліть виявилися результати досліджень кислот. В умовах культивування мікобактерій, не зовсім благоприємних для розмноження, збільшується вміст у клітинній стінці досліджуваних мікроорганізмів ненасичених кислот, що свідчить про мобілізацію й активізацію адаптивних процесів.

Досліджуючи один штаб мікобактерій, культивованих на середовищі з різним рН, достовірно доведено позитивний вплив на ріст мікобактерій кислотності 6,5 в умовах як швидкого, так і повільного розмноження: вміст ненасичених вільних жирних кислот становив 72,61±0,5 та 67,63±1,78 % відповідно. Натомість за рН середовища 7,1–7,2 аналізовані показники виявилися в позначці 42,02±0,23 % [14, 25].

Проте оптимальний вміст кислотно-лужних грам-еквівалентів (рН 6,5) у живильному середовищі, забезпечуючи активний метаболізм мікробної клітини, сприяє більш швидкій втраті кислотостійкості, зміні морфології, росту культури та зниженню вірулентності.

Зниження рівня вмісту або ж повне зникнення окремих, як правило, довголан-

цюгових вільних жирних кислот мікробної клітини може свідчити про взаємопов'язані між собою явища. Того ж часу мікобактерії штаму VCG, маючи досить виражену кислотостійкість, авірулентні, зазвичай типової форми палички (інколи наявні й інші морфологічні варіанти), низький вміст загальних ліпідів, вміщують весь діагностований нами набір вільних жирних кислот з атомами вуглецю від $C_{12:0}$ до $C_{27:0}$, з яких майже 80 % насичених.

Отже, результати досліджень ліпідного складу *M. bovis* та їх дисоціативних форм, окремих видів атипичних мікобактерій та стислий їх аналіз не стільки вирішили, скільки виявили чимало нез'ясованих питань. Це зумовлено, на наш погляд, лабільністю та подібністю генетичного коду у видів мікобактерій та більш глибокими механізмами їх прояву (взаємодією). І важливо, що вміст загальних ліпідів жодною мірою не може слугувати показником вірулентності. І VCG, і дисоціативні форми *M. bovis*, маючи практично однаковий рівень ліпідів, суттєво відрізняються за вірулентністю: перші – кислотостійкі, як правило, позбавлені залишкової вірулентності; дисоціативні форми перших генерацій – (зазвичай, не кислотостійкі) – ні.

Водночас, провівши триразові прямі пасажі мікобактерій дисоціантів 240-ої генерації через організм морських свинок, накопичених за $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ культивування, встановлено в поодиноких тварин доброякісний інфекційний процес та алергічні реакції на ППД-туберкулін для ссавців, що свідчить про можливе використання досліджених мікобактерій для конструювання протитуберкульозної вакцини.

Між тим, за введення в організм морських свинок L-форм (округлих утворень) в суміші з не кислотостійкими зернами (118 генерація 240 субкультура), які звільняються з них, через два прямих пасажі з біологічного матеріалу тварин (суспензії з нього), висіяного на щільне живильне середовище, на 69 добу утворюються поодинокі помаранчеві колонії за $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ культивування, які формуються (на 10 добу росту колонії) тільки овалоподібними формами, не вміщують зерен та елементарних тілець навколо них. Через сім діб за по-

вторної мікроскопії сферопласти (L-форми) набувають різної оптичної густини поверхні з чітко видимими зернами всередині, значну кількість елементарних тілець біля і навколо них. Ще через сім діб інтенсивність відмивання ядерної речовини у сферопластах (зерен, елементарних тілець) суттєво підвищується. Це свідчить про персистенцію в макроорганізмі поодиноких мікобактерій у формі сферопластів, які здатні культивуватися (розмножуватися) на щільному живильному середовищі за $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ з відмішуванням ядерної речовини (елементарних тілець).

Проведені подальші дослідження морфології трансформованих *M. bovis* цієї ж колонії протягом 14 діб виявили закономірні динамічні зміни, які характеризуються, поряд зі згаданими раніше морфологічними формами, збільшенням кількості елементарних тілець, утворенням ниткоподібних варіантів, у яких чітко спостерігаються зерна великі й дрібні та овалоподібні утворення з однаковою оптичною густиною поверхні, що звільнюються з них. У дослідях морфології мікобактерій цієї ж колонії на 42 добу культивування встановлено пухкість ниток з умістом зерен, які виштовхуються та трансформуються в L-форми (овальні утворення з різною оптичною густиною поверхні), й різке збільшення кількості субмікроскопічних й мікроскопічних, як і в попередні дослідження, не кислотостійких елементарних тілець.

Ще через 300 діб у полі зору мікроскопа виявили домінування не кислотостійких зерен (паличкоподібні зерна), поодинокі L-форми, короткі ниткоподібні варіанти (з нечіткими контурами) та кислотостійкі класичні форми палички-збудника туберкульозу. Ці дані ще раз підтверджують (за умови дослідження в динаміці росту однієї колонії, яка сформувалася з однієї L-форми сферопластного типу), що утворення сферопластів відбувається саме з ниткоподібних варіантів *M. Bovis*, хоча поряд з цим у таких структурах відмішуються й зерна (елементарні тільця). Того ж часу наші дослідження не виявили чіткого механізму формування ниткоподібних форм, тобто морфологічних варіантів, з яких вони утворюються. Швидше за все, можна тільки припустити: оскільки

ки інших утворень в досліджуваній колонії не виявлялося, а елементарні тільця (ядерна речовина) відмішувалися в сферопластах, то ниткоподібні форми до появи елементарних тілець в колонії не спостерігалися.

Як свідчить викладене, морфогенез *M. bovis* за різних умов довкілля (без індукуючих чинників на штучних живильних середовищах у макроорганізмі тварини) характеризується різноманіттям. Проте можна беззаперечно стверджувати, що кінцевим етапом біологічного циклу розвитку вірулентного збудника туберкульозу є елементарні тільця, які дають початок розвитку кислотостійких форм мікобактерій.

Таким чином, аналізуючи результати багаторічних експериментів з вивчення біоло-

гічних властивостей одного швидкорослого високовірулентного штаму *M. bovis*, можна з упевненістю стверджувати про замкнений біологічний цикл розвитку досліджених мікроорганізмів, який визначає нескінченність існування в природі: кислотостійкі палички туберкульозу → адаптивні та класичні L-форми (овали з різною оптичною густиною поверхні) → звільнені з L-форм відмішані зерна (елементарні тільця) → кислотостійкі палички туберкульозу. І якщо останні достатньо пізнані, що визначило розробку профілактичних і оздоровчих заходів, то інші форми ще необхідно досліджувати як етіологічного чинника інфекційного, епізоотичного процесів та їх ролі в механізмі специфічного імунітету.

Висновки

*За численних пасажів через щільне живильне середовище швидкорослий високовірулентний штаму *M. bovis* динамічно мутує, набуваючи відповідних морфологічних форм, які визначають біологічний цикл розвитку збудника туберкульозу. Остання форма (елементарні тільця) циклу розвит-*

ку in vitro дають початок паличкоподібним варіантам кислотостійкого збудника інфекції. Саме це обґрунтовує перегляд окремих положень інструктивно-нормативних документів, що сприятиме підвищенню ефективності заходів профілактики та викоріненню туберкульозу тварин.

Бібліографія

1. Адаптивна здатність *M. bovis* на щільних яєчних живильних середовищах з різним рН / О.А. Ткаченко, Г.І. Хільченко, М.В. Зеленська [та ін.] // Вет. медицина України. – 2004. – № 7. – С. 18–21.
2. Аспекти морфогенезу та біологічні властивості *M. bovis* дисоціативних форм за різних температур культивування / О.А. Ткаченко, І.М. Шендрик, В.В. Місків [та ін.] // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. – 2013. – № 1(31). – С. 77–83.
3. Аспекти морфогенезу та культуральні й тинкторіальні властивості *M. bovis* дисоціативних форм за різних температур культивування / О.А. Ткаченко, І.М. Шендрик, В.В. Місків [та ін.] // Ветеринарна медицина, міжвідомчий тематичний науковий збірник. – 2013. – № 97 – С. 143–144.
4. Білан М.В. Порівняльна характеристика вільних жирних кислот *M. bovis* / М.В. Білан, О.А. Ткаченко, Л.О. Ковальова // Проблеми зооінж. та вет. медицини: зб. наук. праць ХДЗВА, присвячений 100-річчю ювілею кафедри мікробіології та біотехнології ХДЗВА. – Харків: РВВ ХДЗВА, 2007. – Вип. 15 (40), т. 1, ч. 2. – С. 85–90.
5. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: культуральні особливості за температур 3 і 37 °С / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Місків [та ін.] // Вет. медицина України. – 2010. – № 3. – С. 33–35.
6. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості за температур 3 та 37 °С / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Зажарський [та ін.] // Вет. медицина України. – 2010. – № 12. – С. 27–30.
7. Біологічні властивості дисоціативних L- та інших форм *Mycobacterium bovis* / О. Ткаченко, П. Давиденко, В. Зажарський [та ін.] // Вісник Дніпропетровського університету. – 2016. – № 24(2). – С. 338–346. – (Серія: Біологія, екологія).
8. Біохімічний склад швидкорослого штаму *M. bovis* в залежності від тривалості пасажування / О. Ткаченко, В. Бусол, М. Зеленська [та ін.] // Вет. медицина України. – 2006. – № 2. – С. 20–22.
9. Деякі морфологічні особливості реверсійної здатності *M. bovis* / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Зажарський [та ін.] // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. – 2009. – № 2. – С. 130–135.

10. Дослідження швидкоростучого штаму *M. bovis* / О.А. Ткаченко, Г.І. Хільченко, М.В. Зеленська [та ін.] // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. – 2004. – № 1. – С. 85–90.
11. Залежність біохімічного складу швидкоростучого штаму *M. bovis* від рН штучного живильного середовища / О.А. Ткаченко, Л.О. Ковальова, Л.В. Кравцова [та ін.] // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. – 2005. – № 1. – С. 77–81.
12. Кейтс М. Техника липидології. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. – М.: Мир, 1975. – 322 с.
13. Лабораторна діагностика туберкульозу тварин: практичний посібник / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Зажарський, Л.О. Ковальова. – Дніпропетровськ: Вид-во “Свідлер А.Л.”, 2010. – 208 с.
14. Ліпідний склад *M. bovis* за тривалого пасажу швидкорослого штаму на щільному живильному середовищі з рН 6,5 / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, Л.О. Ковальова [та ін.] // Вет. медицина України. – 2009. – № 4. – С. 34–36.
15. Особливості культуральних, тинкторіальних та морфологічних ознак *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих на простих живильних середовищах / О.А. Ткаченко, О.М. Кулішенко, А.В. Ковальов, О.С. Галатюк // Вісник Житомирського національного агроєкологічного університету. – 2012. – № 1(32). – Т. 3, ч. 1. – С. 222–228.
16. Ткаченко О. Епізоотологічне обґрунтування механізму адаптації атипичних мікобактерій до організму великої рогатої худоби / О. Ткаченко // Вет. медицина України. – 1997. – № 7. – С. 22–24.
17. Ткаченко О.А. Тропізм мікобактерій та його обумовленість фактором Х5 живильного середовища / О.А. Ткаченко // Вет. медицина України. – 1997. – № 12. – С. 16–17.
18. Ткаченко О.А. Швидкоростучі *M. bovis* у проблемі туберкульозу / О.А. Ткаченко // Вет. медицина України. – 2004. – № 8. – С. 15–17.
19. Ткаченко О.А. Вплив рН штучного живильного середовища на біохімічний склад швидкорослого штаму *M. bovis* / О.А. Ткаченко // Вет. медицина України. – 2005. – № 9. – С. 15–17.
20. Біохімічний склад швидкорослого штаму *M. bovis* в залежності від тривалості пасажування / О.А. Ткаченко, В.О. Бусол, М.В. Зеленська [та ін.] // Вет. медицина України. – 2006. – № 2. – С. 20–22.
21. Ткаченко О.А. Вільні жирні кислоти – фактори патогенності *M. bovis* / О.А. Ткаченко, М.В. Зеленська, Л.О. Ковальова // Збірник наук. праць Луган. нац. ун-ту. – Луганськ: Вид-во ЛНАУ, 2007. – № 78/101. – С. 613–620.
22. Ткаченко О.А. Динаміка ліпідів *M. bovis* авірулентного штаму / О.А. Ткаченко, П.О. Давиденко, М.В. Білан // Наук.-техн. бюлетень Ін-ту біології тварин і Держ. наук.-дослідн. контрольного ін-ту ветпрепаратів та корм. добавок. – Львів, 2009. – Вип. 10, № 4. – С. 206–211.
23. Ткаченко О.А. Ліпідний склад *M. bovis* тривало пасажованого швидкорослого штаму / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Глебенюк // Наук. вісник Львів. нац. ун-ту вет. медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького. – Львів, 2008. – № 2(37), т. 10, ч. 1. – С. 353–357.
24. Ткаченко О.А. Ліпідний склад, сенсibiliзуючі та вірулентні властивості *M. bovis* швидкорослого штаму за багаторазового пасажування на щільному живильному середовищі з рН 7,1 / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, П.О. Давиденко // Наук.-техн. бюлетень ін-ту біології тварин і держ. наук.-дослідн. контрольного ін-ту ветпрепаратів та корм. добавок. – Львів, 2009. – Вип. 10, № 4. – С. 124–130.
25. Ткаченко О.А. Вплив температури культивування на ліпідний склад *M. bovis* дисоціативних форм, пасажованих через середовище з рН 7,1 / О.А. Ткаченко, П.О. Давиденко // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. – 2011. – № 1. – С. 139–143.
26. Ткаченко О.А. Корд-фактор та вірулентність *Mycobacterium bovis* швидкорослого штаму та атипичних мікобактерій / О.А. Ткаченко, В.В. Зажарський, В.В. Глебенюк // Ветеринарна медицина України. – 2012. – № 10. – С. 10–13.
27. Ткаченко О.А. Фільтривні форми у біологічному циклі розвитку дисоціативних *Mycobacterium bovis* / О.А. Ткаченко, Н.В. Алексеева, В.В. Зажарський // Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. – Дніпропетровськ, 2015. – Т. 3, № 2. – С. 78–84.
28. Ткаченко О.А. Мінливість *Mycobacterium bovis*: монографія / О.А. Ткаченко. – Житомир: Полісся, 2017. – Т. 1. – 396 с.
29. Туберкулез животных и меры борьбы с ним / Под ред. Ю.А. Кассича. – К.: Урожай, 1990. – 304 с.
30. Туберкулез сельскохозяйственных животных / Под ред. В.П. Шишкова, В.П. Урбана. – М.: Агропромиздат, 1991. – 255 с.