

УДК 619:616.98:579.873.21  
© 2018

**Н.І. КОЗАК,**  
аспірантка

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

КУЛЬТУРАЛЬНІ,  
ТИНКТОРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ  
ТА МОРФОЛОГІЯ *M. BOVIS*  
РІЗНИХ МОРФОЛОГІЧНИХ ФОРМ  
ЗА ТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ  
ТА НИЗЬКИХ  
ПЛЮСОВИХ ТЕМПЕРАТУР

*Установлено, що мікобактерії, які зберігали на живильному середовищі протягом 9–12 років, проявляють свою життєздатність і за пересієу на свіже живильне середовище здатні утворювати субкультури. З'ясовано, що така здатність на 28 % вища в культур, які зберігалися на середовищі з рН 6,5. Виявлено також здатність мікобактерій субкультур швидкорослого штаму *M. bovis* зростати за температури 3 °С, чого раніше не спостерігали. За цього в одній субкультурі спостерігався ріст тільки за 37 °С, у трьох – за 3 °С, шість субкультур виростили за обох температур культивування, а п'ять – росту не виявили за жодного температурного режиму, що може свідчити про втрату здібності розмножуватися після тривалого зберігання за 3 °С. Зафіксовано суттєві відмінності морфологічних форм мікобактерій вихідних культур та їх субкультур. Перші формувалися різноманітними морфологічними варіантами, як правило, некислотостійкими паличками, зернами, ниткоподібними та L-формами, другі – великою кількістю некислотостійких варіантів, ниткоподібних та L-форм. Деякі субкультури виявилися пігментуютьвальними та здатними змінювати характер поверхні переважно на гладку (S-форма). Присутня значна варіація в отриманих результатах, вірогідно, може бути обумовлена тим, що мікобактерії досліджуваних культур зберігали на середовищі з відмінним значенням рН, що й визначало різний метаболізм та біологічну активність.*

**Ключові слова:** мікобактерії, морфологія, кислотостійкість, характер поверхні, пігмент.

**Постановка проблеми.** Захворювання туберкульоз супроводжує люدتво повсякчас. Причини цьому найрізноманітніші. Але найвірогідніша – надзвичайно складна будова мікробної клітини, та особливо, що стосується генетичного коду, який запрограмований на швидку (відносно) активізацію одних і пригнічення інших генів залежно від етапів біологічного циклу розвитку [6, 9, 17] Це визначає неймовірно високу адаптивну здатність мікроорганізму виживати в довкіллі, персистувати в макроорганізмі, не викликаючи відповідних реакцій, а тому й не діагностуються [4, 7, 8, 14]. Проте за певних умов окремі морфологічні форми мікобак-

терій на тому чи іншому етапі біологічного циклу розвитку реверсують в агресивну кислотостійку класичну паличку, викликають інфекційний процес тієї чи іншої складності з відповідними реакціями макроорганізму, які можуть діагностуватися існуючими методами [1, 3, 5, 18]. Якщо ці питання дещо з'ясовані окремими авторами [2, 10–12], то інші, пов'язані зі стійкістю в довкіллі, потребують деталізації.

**Мета роботи:** встановити вплив низьких температур й часу зберігання на швидкість росту, зовнішній вигляд культур, кислотостійкість мікобактерій та їх морфологічні форми.

**Матеріал та методи дослідження.** Дослідження проводили в навчальній лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб ДДАЕУ протягом 2017–2018 рр. У роботі використано музейний швидкорослий високовірулентний штам *M. bovis*, який пасажували [13, 15, 16] через щільне живильне яєчне середовище з різним рН (6,5; 6,7; 7,1). Окремі культури в пробірках, закритих гумовими пробками, після культивування в термостаті за 37 °С зберігали в умовах 3 °С без пересіву на підтримуюче живильне середовище протягом 9–12 років. Проте проводили зовнішній огляд пробірок досліджуваних культур.

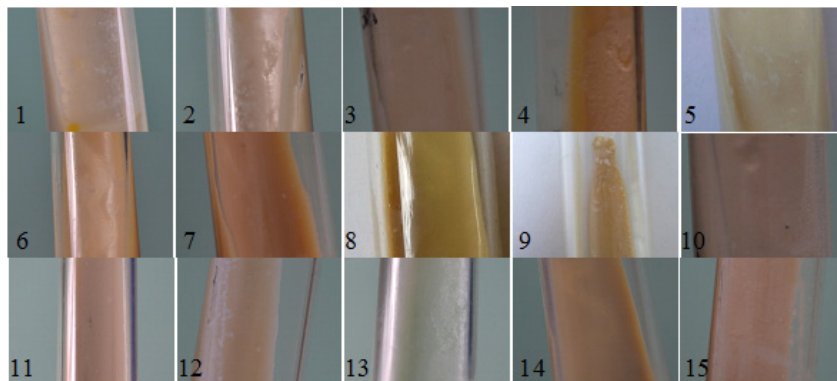
Через 12–9 років готували мазки з досліджуваних культур, проводили мікроскопію, вивчаючи тинкторіальні властивості та морфологію, пересів культур на відповідне живильне середовище з рН 6,7 для культивування за 37 °С та 3 °С. Одержували субкультури, з'ясовували швидкість росту колоній, пігментоутворення, характеризували зовнішній вигляд культури.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Вивченням культур, які тривалий час зберігалися в музеї лабораторії кафедри, не встановлено зростання сторонньої мікрофлори. Вихідні культури характеризувалися слабкою інтенсивністю росту (переважно), мали колір слонової кістки за винятком паса-

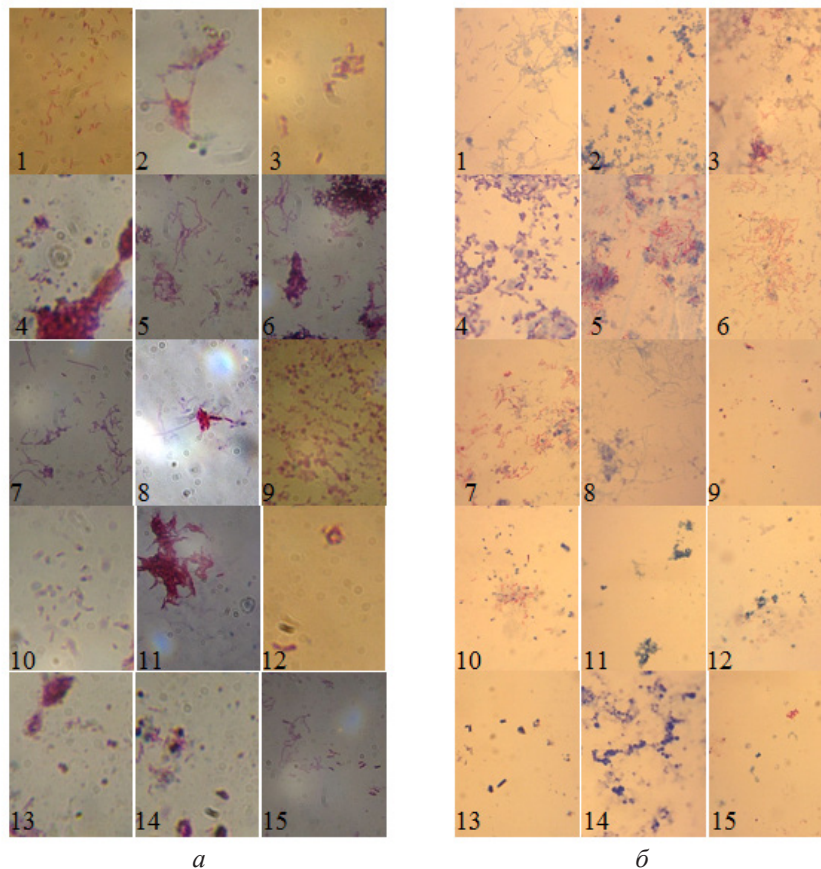
жу 54, де виявляли також окремі помаранчеві колонії (рис. 1.1). Культури, як правило, росли у вигляді нальоту по лінії посіву, хоча в деяких виявляли ріст окремих колоній (рис. 1.9 та 1.11). Поверхня була шорстка (R) у 10-ти культур, гладка (S) – у 5-ти.

Вивчення тинкторіальних властивостей та морфології досліджуваних мікобактерій засвідчило суттєві відмінності між вихідними та багаторічно витриманими (за 2–3 °С) мікроорганізмами. 8 років потому культури були представлені в основному кислотостійкими паличками, ниткоподібними формами, овалами, зернами (рис. 2). Поряд з цим у деяких культурах фіксували поодинокі некислотостійкі морфологічні форми збудника, зокрема, палички, зерна та овали. Проспективними дослідженнями на початку досліді встановлено й велике різноманіття морфологічних форм *M. bovis* (палички, ниткоподібні форми, зерна, овали). У багатьох культурах виявили значну кількість зерен, в основному некислотостійких, і поодинокі L-форми (у деяких культур – пасажі 115, 143, 148). Змінилися й тинкторіальні властивості – з'явилося багато некислотостійких елементів в окремих культурах, деякі мікобактерії культур взагалі втратили кислотостійкість.

Із 15-ти пересіяних культур ріст спостерігали в 10-ти, з яких 6 культур дали ріст за обох температурних режимів культивування,



**Рис. 1. Культуральні властивості вихідних культур:**  
**рН 6,5:** 1 – пасаж 54; 2 – пасаж 115; 3 – пасаж 135; 4 – пасаж 148; 5 – пасаж 171;  
 6 – пасаж 172; 7 – пасаж 173; 8 – пасаж 190; 9 – пасаж 193;  
**рН 6,7:** 10 – пасаж 126; 11 – пасаж 192;  
**рН 7,1:** 12 – пасаж 141; 13 – пасаж 142; 14 – пасаж 143; 15 – пасаж 174



**Рис. 2. Морфологія мікобактерій вихідних культур:** а – 2008 рік; б – 2017 рік;  
**pH 6,5:** 1 – пасаж 54; 2 – пасаж 115; 3 – пасаж 135; 4 – пасаж 148;  
 5 – пасаж 171; 6 – пасаж 172; 7 – пасаж 173; 8 – пасаж 190; 9 – пасаж 193;  
**pH 6,7:** 10 – пасаж 126; 11 – пасаж 192; **pH 7,1:** 12 – пасаж 141; 13 – пасаж 142;  
 14 – пасаж 143; 15 – пасаж 174.  
 Фарбування за Циль-Нільсеном, ×1500

одна культура – тільки за 37 °С та три культури – за 3 °С. Серед культур, які зберігали на середовищі з рН 6,5, при пересіві ріст відмічали в 78 %, а з рН 6,7 та 7,1 – у 50 %. За культуральними характеристиками більшість одержаних субкультур мали відмінності порівняно з вихідним (рис. 3).

За температури культивування 37 °С ріст відмічали на 4-ту добу (4 культури), 5-ту (2 культури) та 20-ту (1 культура). Інтенсивність росту в усіх культурах за 37 °С була пишна та помірна У 4-х культур відзначали

ріст у вигляді маслянистого нальоту жовтого та помаранчевого кольорів, 3 культури формували синьо-зелені, помаранчеві та кольору слонової кістки колонії, які розташовувалися скупченнями. Поверхня на початку розміщення майже в усіх культур, окрім однієї (пасаж 148), мала S-форму. Через 1,5 місяця в 143 пасажу поверхня змінилася з S-форми на R-форму, а за 3 місяці з'явився синьо-зелений пігмент.

Швидкість росту за 3 °С рееструвалася дещо повільнішою: на 6-ту добу (4 куль-

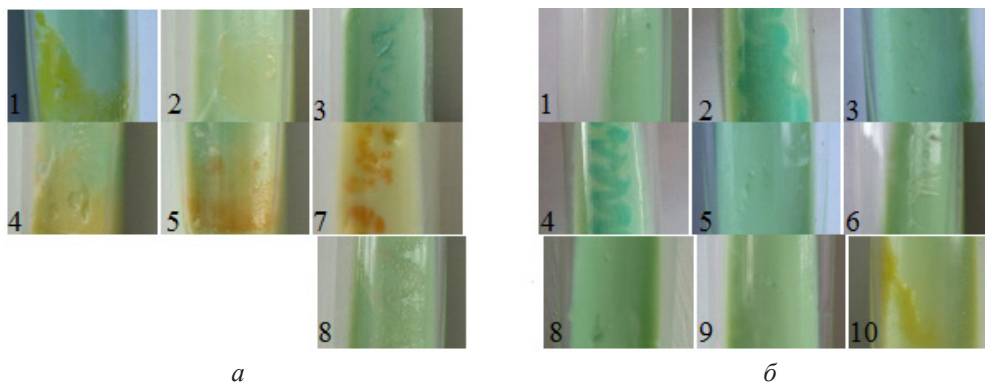


Рис. 3. Культуральні властивості субкультур за температур: а – 37 °С; б – 3 °С:  
 1 – пасааж 54; 2 – пасааж 115; 3 – пасааж 148; 4 – пасааж 171; 5 – пасааж 193;  
 6 – пасааж 172; 7 – пасааж 126; 8 – пасааж 143; 9 – пасааж 142; 10 – пасааж 135

тури), на 47-му (3 культури) та по одній культурі на 55 та 85-ту доби. Інтенсивність росту також була помітно слабшою, ніж за 37 °С: у 6-ти з 9-ти культур спостерігався дуже слабкий ріст у вигляді окремих колоній-росинок неправильної форми з шорсткою поверхнею кольору слонової кістки та тільки в 3-х культур відмічали пишній ріст у вигляді слизуватого тягучого нальоту синьо-зеленого та жовтого кольорів з гладкою поверхнею. Проаналізувавши отримані дані, виявили відсутність залежності швидкості росту від кількості пасаажів вихідних культур та рН середовища, на якому їх зберігали.

Провівши мікроскопію мазків із молодих культур у 1-шу, 4-ту, 6-ту та 30-ту доби росту та зіставивши результати між собою, встановили, що всі субкультури, які культивувалися за 37 °С, повністю втратили кислотостійкість. Проте в субкультурі 54 пасаажу через 30 діб від початку росту з'являлися сині товсті ниткоподібні форми з червоною зернистістю. Таку ж саму картину спостерігали і в субкультурі 171 пасаажу на 6-ту добу, але вже за наступної мікроскопії на 30-ту добу росту така зернистість зникла. У субкультурі 143 пасаажу, яка була представлена тільки L-формами, через 3 місяці від початку росту за мікроскопії також виявляли поодинокі кислотостійкі палички. За температури культивування 3 °С усі культури повністю втратили кислотостійкість. Проте в субкуль-

турах 54-го та 142-го пасаажів відмічали кислотостійкі зерна, а 172-го – велику кількість кислотостійких паличок, ідентичних тим, які були у вихідній культурі. Зазначимо, що це саме ті субкультури, які за температури 3 °С утворювали колонії у досить віддалені строки – на 47-му добу.

Морфологія мікобактерій була досить різноманітною. За мікроскопії виявляли короткі та довгі, прямі та зігнуті, тонкі та товсті палички із заокругленими кінцями, кокоподібні та ниткоподібні форми, зерна, L-форми. Цікавим стало те, що за 37 °С у більшості культур реестрували багато L-форм, згодом у багатьох із них спостерігали зменшення їх кількості до повного зникнення в деяких субкультурах. За температури культивування 3 °С L-форми спостерігали в меншій кількості субкультур, згодом вони зникали швидше, ніж за вищої температури культивування. Ниткоподібні форми відмічали в більшості культур (4 з 7-ми) за 37 °С; за 3 °С таких форм у мазках не спостерігали взагалі, натомість часто виявляли не кислотостійкі зерна.

Отже, якщо отримані нами в досліді дані зіставити з результатами досліджень морфології та тинкторіальних властивостей попередніх років, то можна простежити тенденцію до появи в культурах не кислотостійких елементів і L-форм. Мікобактерії усіх досліджуваних культур змінили морфологію та тинкторіальні властивості.

Мікобактерії, що зберігалися на живильному середовищі протягом 9–12 років, проявляють життєздатність і за пересіву на свіже живильне середовище здатні утворювати субкультури. Така здатність вища на 28 % в культур, які зберігалися на середовищі з рН 6,5.

Результати можуть свідчити про те, що за роки зберігання мікобактерії швидкорос-

лого штаму певним чином адаптувалися до умов низьких плюсових температур. Присутня значна варіація в отриманих результатах може бути обумовлена тим, що мікобактерії досліджуваних культур, маючи різну кількість пасажів через середовище з відмінним значенням рН, володіють різним ступенем біологічної активності. Саме це й обґрунтовує необхідність подальших досліджень.

### Висновки

1. Культуральні властивості швидкорослого штаму *M. bovis*, який тривало зберігали в умовах низьких плюсових температур (2–3 °С), змінювалися. Здатність мікобактерій субкультур даного штаму зростати за температури 3 °С раніше не спостерігали. Отримані субкультури відрізнялися від вихідних у 85,7 % за 37 °С та у 28,6 % за 3 °С. Серед змін відзначали утворення жовтого, помаранчевого та синьо-зеленого пігментів, зміну характеру поверхні переважно на гладку (*S*-форма).

2. Із часом зберігання культур фіксується тенденція до втрати мікобактеріями кислотостійкості.

3. Морфологія *M. bovis* згодом змінювалася. Вихідні культури були представлені досить різноманітними морфологічними формами: паличками, зернами, ниткоподібними та *L*-формами. За зберігання у вихідних культурах підвищилася кількість *L*-форм та зерен. У першій генерації субкультури, культивовані за 37 °С, відрізнялися наявністю ниткоподібних форм, тоді як за 3 °С, навпаки, у культурах ниткоподібних форм не виявляли, натомість вони частіше були представлені зернами та овалами; *L*-форми частіше виявляли в субкультурах, культивованих за 37 °С, їх кількість із часом знижувалася.

### Бібліографія

1. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review / V. Beran, M. Havelkova, J. Kautova [et al.] // Veterinarni Medicina. – 2006. – № 7(51). – P. 365–389.
2. Cardona P. On the nature of Mycobacterium tuberculosis – latent bacilli / P. Cardona, J. Ruiz-Manzano // Europ. Respir. J. – 2004. – Vol. 24, № 6. – P. 1044–1051.
3. Chandrasekhar S. Studies on cell-wall deficient non-acid fast variants of Mycobacterium tuberculosis / S. Chandrasekhar, S. Ratnam // Tub. Lung Diseases. – 1992. – Vol. 73, № 5. – P. 273–279.
4. L-форми мікобактерій туберкулеза / Под ред. З.Н. Кочемасовой. – М.: Медицина, 1980. – 165 с.
5. Spontaneous reversion of Mycobacterium abscessus from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipids and reacquisition of an invasive phenotype / S.T. Howard, E. Rhoades, J. Recht [et al.] // Microbiology. – 2006. – Vol. 152. – P. 1581–1590.
6. Вейсфейлер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичные микобактерии / Ю.К. Вейсфейлер. – Будапешт: Изд-во АН Венгрии, 1975. – 366 с.
7. Глебенюк В.В. Мікроструктурні зміни органів морських свинок, заражених дисоціативними варіантами *Mycobacterium bovis* швидкорослого штаму / В.В. Глебенюк, О.Г. Глебенюк, Ю.В. Верчено // Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету. – 2016. – № 2. – С. 112–114.
8. Глебенюк В.В. Особливості культивування *M. bovis* швидкорослого штаму за різних температур / В.В. Глебенюк // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини: зб. наук. праць Харківської ДЗВА, присвячений 100-річному ювілею кафедри мікробіології та біотехнології ХДЗВА. – 2007.

- Вип. 15(40), ч. 2, т. 1. Ветеринарні науки. – С. 53–57.
9. *Прозоровский С.В.* L-форм бактерий / *С.В. Прозоровский, Л.Н. Кац, Г.Я. Каган.* – М.: Медицина, 1981. – 239 с.
10. *Ткаченко О.А.* Швидкоростучі *M. bovis* у проблемі туберкульозу / *О.А. Ткаченко* // Ветеринарна медицина України. – 2004. – № 7. – С. 14–17.
11. *Ткаченко О.А.* Мінливість *Mycobacterium bovis*: монографія / *О.А. Ткаченко.* – Житомир: Полісся, 2017. – Т. I. – 396 с.
12. *Ткаченко О.А.* Біологічний цикл розвитку *Mycobacterium bovis* / *О.А. Ткаченко* // Ветеринарна медицина України. – 2014. – № 10. – С. 15–20.
13. Елементарні тільця у біологічному циклі *M. bovis* / *О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Зажарський, Л.О. Ковальова* // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів, 2009. – Вип. 10, № 4. – С. 212–216.
14. *Ткаченко О.А.* Ефективність полімерної ланцюгової реакції за детекції дисоціативних варіантів *Mycobacterium bovis* швидкоростлого штаму / *О.А. Ткаченко, В.В. Глебенюк, О.Г. Глебенюк* // Науковий вісник Львівського НУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького – Львів, 2008. – Т. 18, № 1(65), ч. 1. – С. 185–188.
15. Морфологічні аспекти реверсії некіслотостійких ниткоподібних *M. bovis* в бактеріальну кислотостійку форму / *О.А. Ткаченко, О.Є. Галатюк, М.В. Білан* [та ін.] // Сучасні проблеми туберкульозу в Україні: причини та шляхи їх подолання: зб. наук. праць наук.-практ. конф. (27–28 листопада 2008 р.). – К., 2008. – С. 149–153.
16. 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.
17. *Цинзерлинг В.А.* Современные подходы к морфологической диагностике туберкулеза / *В.А. Цинзерлинг, М.М. Агапов* // Туберкулез и болезни лёгких. – Санкт-Петербург, 2017. – № 2. – С. 7–12.
18. *Шлеева М.О.* Покоящиеся формы микобактерий: обзор / *М.О. Шлеева, Е.Г. Салина, А.С. Капрельяну* // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 1. – С. 3–15.