

ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ЗЕЛЕНСЬКА МАРИНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 619:616.98:579.873.21:57.083.32:636.5

**ЛІПІДНИЙ СКЛАД ТА ВІРУЛЕНТНІСТЬ МЫСОВАСТЕРІУМ BOVIS, ВИДІЛЕНИХ ВІД
ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ СТЕПОВОЇ ЗОНИ УКРАЇНИ**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата ветеринарних наук

Одеса – 2006

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Дніпропетровському державному аграрному університеті Міністерства аграрної політики України.

Науковий керівник: доктор ветеринарних наук, професор

Ткаченко Олексій Андрійович,

Дніпропетровський державний аграрний університет,

завідувач кафедри епізоотології та інфекційних хвороб.

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, професор,

член-кореспондент УААН

Мандигра Микола Станіславович,

директор Інституту епізоотології УААН, м. Рівне;

доктор ветеринарних наук, професор

Кочмарський Віктор Андрійович,

Харківська державна зооветеринарна академія,

кафедра епізоотології та ветеринарного менеджменту.

Провідна установа: Інститут ветеринарної медицини Української академії аграрних наук,
м. Київ.

Захист дисертації відбудеться "6" жовтня 2006 р. о 13 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 41.372.01 в Одеському державному аграрному університеті Міністерства аграрної політики України за адресою: 65039, м. Одеса, вул. Канатна, 99.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеського державного аграрного університету за адресою: 65039, м. Одеса, вул. Канатна, 99.

Автореферат розісланий "28" серпня 2006 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
кандидат ветеринарних наук, доцент

С.І. Масленікова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Туберкульоз великої рогатої худоби – це одне з найбільш розповсюджених захворювань бактеріальної етіології. Боротьба з цією інфекцією полягає в ефективній дії на всі ланки епізоотичного ланцюга – джерело збудника інфекції, фактори його передачі та сприйнятливих тварин. Оскільки при туберкульозі великої рогатої худоби не розроблено ефективних засобів специфічної профілактики, провідного значення набувають виявлення і ліквідація джерела збудника інфекції та проведення ветеринарно-санітарних заходів.

Виявлення джерела збудника інфекції – інфікованих мікобактеріями та хворих на туберкульоз тварин, проводиться за результатами алергічної діагностики. Основним методом прижиттєвої масової специфічної діагностики туберкульозу великої рогатої худоби є внутрішньошкірна туберкулінова проба. Через явища параалергії до туберкуліну алергічна реакція не є критерієм первинної постановки діагнозу. Діагноз вважають встановленим за наявності характерних для туберкульозу уражень внутрішніх органів, а за їх відсутності – за результатами біологічної проби, виділення культур *M. bovis* чи *M. tuberculosis*.

Вивчення морфологічних, тінкторіальних, культуральних, біохімічних, антигенних властивостей мікобактерій є передумовою визначення їх виду. Основною ознакою мікобактерій є наявність в їх клітинах високого вмісту ліпідів – від 10 до 60 %, які представляють велику групу біокомпонентів і виконують багато важливих біологічних функцій. До їх складу входять полярні та нейтральні ліпіди, вміст яких може визначати вірулентність збудника (Петровская В.Г., 1967; Bloch H., 1950) та змінюватися в залежності від низки факторів (Коронелли Т.В., 1977, 1986; Пинчук Л.М., Лазовская А.Л., 1989; Tsukamura M., 1984 й ін.).

Обмеженість даних щодо ліпідного складу мікобактерій вказує на необхідність вивчення цього питання на фоні впливу деяких факторів зовнішнього середовища.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є розділом теми науково-дослідної роботи кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпропетровського державного аграрного університету „Вивчення епізоотології та інфекційного процесу туберкульозу, мікобактеріозної інфекції великої рогатої худоби та вдосконалення методів діагностики”.

Мета і завдання роботи. Метою досліджень було визначення ліпідного складу та вірулентності *M. bovis*, виділених від великої рогатої худоби степової зони України.

Для досягнення мети поставлені завдання, до яких входило вивчення:

- видової належності мікобактерій, виділених з організму великої рогатої худоби;

- ліпідного складу штамів мікобактерій: еталонного Vallee, BCG, епізоотичних патогенних та атипових;
- ліпідного складу мікобактерій бичачого виду:
 - культивованих на середовищах різних за складом та рН;
 - за багаторазового пасажування через штучне живильне середовище з різним рН;
 - після тривалого перебування в ґрунті;
 - виділених від морських свинок, заражених різновіковою швидкорослою культурою *M. bovis*.

Об'єкт дослідження: епізоотичні, музейні штами *M. bovis* та атипові мікобактерії.

Предмет дослідження: культуральні, морфологічні, біохімічні, вірулентні, сенсibiliзуючі властивості, ліпідний склад *M. bovis* та атипових мікобактерій.

Методи дослідження: алергічні, патологоанатомічні, мікроскопічні, культуральні, біохімічні, біологічні (для виділення, визначення видової належності мікобактерій та їх накопичення); тонкошарова та газорідина хроматографія (для вивчення ліпідного складу мікобактерій); статистичні (для обчислення та статистичної обробки результатів досліджень).

Наукова новизна одержаних результатів. Від великої рогатої худоби виділені та ідентифіковані як повільнорослі, так і швидкорослі штами *M. bovis*. Частота персистенції в організмі тварин швидкорослих штамів (37,50 %) може стимулювати значне розповсюдження туберкульозу: в трьох досліджуваних неблагополучних щодо туберкульозу пунктах при кожному дослідженні виділялось біля 10 % тварин, що реагували на ППД-туберкулін для ссавців. Встановлено, що швидкорослий штам *M. bovis* інтенсивно росте на штучних середовищах, утворюючи колонії вже на 2-гу добу культивування, має високу вірулентність та здатність рости на яєчному живильному середовищі з 0,5 мг/см³ саліцилату натрію.

Уперше досліджено ліпідний склад швидкорослого штаму мікобактерій бичачого виду, у якого, на відміну від повільнорослого, переважала кількість фосфоліпідів, триацилгліцеролів та насичених жирних кислот.

Уперше досліджені зміни ліпідного складу швидкорослого штаму *M. bovis*, культивованого на середовищах різних за складом та рН. Показано, що склад середовища впливає на синтез загальних ліпідів, їх фракцій, насичених, ненасичених жирних кислот і кислот з непарним числом атомів вуглецю. Окрім цього, при культивуванні мікобактерій на живильних середовищах з різним рН виявлені відмінності у співвідношенні ненасичених та насичених, коротколанцюгових та довголанцюгових жирних кислот.

Уперше в умовах багаторазового пасажування на штучному живильному середовищі з різним

pH досліджено динаміку змін ліпідного складу *M. bovis*. Відзначено, що зі збільшенням кількості пасажів у мікобактерій знижувався вміст загальних ліпідів, фосфоліпідів, триацилгліцеролів, ефірів стеринів, окремих жирних кислот та ступінь вірулентності.

Уперше досліджено зміни ліпідного складу мікобактерій швидкорослого штаму бичачого виду після тривалого перебування у ґрунті. Виявлено, що умови зовнішнього середовища впливають на синтез загальних ліпідів, фосфоліпідів, триацилгліцеролів, ефірів стеринів та окремих жирних кислот. Зменшення їх кількості супроводжувалося зниженням вірулентності *M. bovis*.

Доведено, що 9- та 30-добові культури швидкорослого штаму *M. bovis*, пасажовані через організм морських свинок, не відрізняються між собою за ліпідним складом і вірулентністю.

Практичне значення одержаних результатів. Швидкорослий штам *M. bovis* може бути використаний у біологічній промисловості, в науково-дослідних установах ветеринарної та гуманної медицини.

Результати дисертації увійшли в „Методичні рекомендації щодо строків знезараження ґрунту неблагополучних по туберкульозу господарств степової зони України” (Дніпропетровськ, 2006, 7 с.), затверджені колегією управління ветеринарної медицини в Дніпропетровській області.

Матеріали дисертації використовуються викладачами кафедри епізоотології та інфекційних хвороб на лекціях та лабораторно-практичних заняттях у Дніпропетровському державному аграрному університеті.

Особистий внесок здобувача. Експериментальні дослідження виконані дисертанткою особисто та при участі співробітників навчально-дослідної лабораторії кафедри епізоотології Дніпропетровського державного аграрного університету та НДІ біології Дніпропетровського національного університету.

Виділення штамів мікобактерій з біологічного матеріалу тварин, що реагували на ППД-туберкулін для ссавців, та об'єктів зовнішнього середовища, вивчення їх сенсibiliзуючих та вірулентних властивостей проведено спільно з доктором ветеринарних наук, професором О.А. Ткаченком, аспірантом кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Г.І. Хільченком.

Дослідження ліпідного складу мікобактерій проведено у співпраці з кандидатами біологічних наук І.О. Філоник, Л.В. Кравцовою.

Вивчення впливу перебування у ґрунті на вірулентні властивості швидкорослого штаму *M. bovis* проведено разом з доктором ветеринарних наук, професором О.А. Ткаченком, аспірантом Г.І. Хільченком.

Апробація результатів дисертації. Основні матеріали дисертації обговорювались на засі-

даннях кафедри епізоотології та інфекційних хвороб (2001–2005 рр.); Міжнародній науковій конференції „Шляхи підвищення резистентності та продуктивності тварин” (м. Дніпропетровськ, 17–18 травня 2001 р.); Міжнародній науково-практичній конференції „Досягнення та перспективи розвитку ветеринарної науки” (м. Полтава, 19–20 вересня 2002 р.); Міжнародній науково-практичній конференції „Забезпечення ветеринарно-санітарного благополуччя тваринництва, якості і безпеки продукції” (м. Одеса, 27–29 жовтня 2004 р.); Міжнародній науково-практичній конференції „Ветеринарна медицина–2005: сучасний стан та актуальні проблеми забезпечення ветеринарного благополуччя тваринництва” (м. Ялта, АР Крим, 30 травня–4 червня 2005 р.); Міжнародній науково-практичній конференції „Сучасні проблеми біохімії, фізіології та функціональної морфології продуктивних тварин” (м. Дніпропетровськ, 24–25 листопада 2005 р.); Міжнародній науково-практичній конференції „Епізоотологія і профілактика інфекційних хвороб великої рогатої худоби” (м. Київ, 14–16 березня 2006 р.).

Публікації. Оpubліковано 13 наукових праць у фахових виданнях, затверджених ВАК України, у тому числі 10 – за матеріалами дисертації.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 164 сторінках комп’ютерного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, рекомендацій виробництву, списку використаних джерел та додатків. Робота містить 57 таблиць, 20 рисунків, 2 додатки. Список використаних джерел включає 268 найменувань, з них 75 – іноземних.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Робота виконана в період з 2001 по 2005 рік у навчально-дослідній лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпропетровського державного аграрного університету.

Уточнення епізоотичної ситуації у трьох господарствах Дніпропетровської області, неблагополучних щодо туберкульозу, проводили з використанням традиційних у ветеринарній медицині методів.

Встановлення частоти персистенції мікобактерій в організмі сприйнятливих тварин та їх видової належності здійснювали шляхом бактеріологічного дослідження патологічного матеріалу від тварин, що реагували на ППД-туберкулін для ссавців.

Передпосівну обробку проб патологічного матеріалу виконували за методикою В.А. Матузенка зі співавт. (1993), проб з молока та ґрунту – за загальноприйнятою методикою.

Для дослідження було використано одинадцять епізоотичних штамів мікобактерій, виділених із патологічного матеріалу (штами № 1, 2, 6 – швидкорослі *M. bovis*, № 3–5, 7, 8 – повільнорослі *M. bovis*, № 9, 10 – швидкорослі атипові) та об'єктів зовнішнього середовища (молока), штам Vallee та вакцинний штам BCG.

У виділених культур мікобактерій вивчали основні властивості: час появи колоній та інтенсивність росту на щільному яєчному середовищі за температури 25, 37, 45 °C; морфологію колоній (розміри, форма, край колоній, прозорість і блиск, колір, характер поверхні, консистенція); каталазну активність за методикою А.Е. Зими́на (1965); активність каталази при нагріванні за методом Н.М. Макаревич (1968); нітратредуктазну активність за М. Tsukamura et al. (1966); ріст на середовищі зі саліцилатом натрію за методом М. Tsukamura (1962).

Визначення патогенних властивостей виділених штамів мікобактерій проводили на морських свинках. У деяких випадках заражали кролів та курей за загальноприйнятою методикою. Всього для дослідження було використано 50 морських свинок, 10 кролів і 6 курей.

Вплив тривалого пасажування на ліпідний склад швидкорослого штаму *M. bovis* вивчали використовуючи культуру пасажовану 2, 40 та 80 разів на яєчному середовищі з рН 6,5 та пасажовану 2, 40 і 59 разів на яєчному середовищі з рН 7,1.

Для накопичення біомаси досліджуваних штамів застосовували традиційні й удосконалені середовища.

Виділення загальних ліпідів із досліджуваних зразків проводили за методикою Фолча в модифікації Блайя-Дайєра для мікробіологічних проб (Кейтс М., 1975).

Фракційний склад ліпідів вивчали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на силікагелевих пластинах Silufol (Чехія), попередньо знежирених перегоненим ацетоном і активованих за температури 100 °C протягом 1 год, у системі розчинників – гексан:диетиловий ефір:метанол:льодяна оцтова кислота як за 9:2:0,2:0,3 (Кейтс М., 1975).

Визначення компонентного складу фракцій вільних жирних кислот (ВЖК) у зразках проводили методом газорідинної хроматографії (ГРХ) на газовому хроматографі Chrom-5 (“Laboratorni Pstroje”, Чехія), після попереднього метилювання. Аналіз зразків метилових ефірів жирних кислот робили за таких умов: колонка L = 1 м Ч 4 мм, на сорбенті Хроматон N-Super з 5 % SP 2100 (0,16–0,20 мм). Температуру колонки програмували від 180 до 270 °C зі швидкістю нагрівання 5 °C/хв; температура випаровувача становила 200 °C, детектора – 230°C, газ-носіє – азот (осч), полуменево-іонізаційний детектор (Кейтс М., 1975).

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою персонального комп'ютера в електронних таблицях Excel програмного пакету Office XP Professional.

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Видова належність мікобактерій, виділених від великої рогатої худоби, що реагувала на ППД-туберкулін для ссавців, неблагополучних щодо туберкульозу господарств степової зони України. Дослідженнями встановлено, що штами мікобактерій за номерами 1, 2, 6 на середовищі для культивування мікобактерій формували колонії на 17-ту добу від моменту посіву у вигляді R-форм. Мікроскопією виявили червоні прямі зернисті палички розміром $1\text{--}3{,}40{,}3\text{--}0{,}5$ мкм.

Подібними до попередніх за морфологією та культуральними властивостями виявлено штами за номерами 3–5, 7, 8, але мікобактерії росли на 22–27-му добу від часу посіву.

Швидкорослі штами (№ 1, 2, 6) і повільнорослі (№ 3–5, 7, 8) росли за температури $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, не редукували нітрати, мали слабку каталазу, яка інактивувалася при прогріванні культур за $68\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Швидкорослі штами за номерами 1, 2, 6, росли на живильному середовищі, яке містило саліцилат натрію в концентрації $0{,}5\text{ мг/см}^3$.

Штам мікобактерій за номером 10 на яєчному середовищі інтенсивно формував колонії на 10-ту добу після посіву у вигляді S-форм. Штам за номером 9 ріс на 8-му добу після посіву у вигляді двох видів колоній: S-форми та R-форми. Ці штами мікобактерій (№ 9 та 10) росли на живильних середовищах за температури 22, 37 та $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, утворювали колонії на живильному середовищі зі саліцилатом натрію в концентрації 0,5 та $1{,}0\text{ мг/см}^3$, мали каталазну та нітратредуктазну (крім штаму 9) активності. Прогрівання протягом 30 хв за температури $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ не інактивувало каталазу.

Повільнорослі та швидкорослі штами мікобактерій (№ 1–8) у морських свинок стимулювали алергію протягом дослідження й викликали їх загибель, на відміну від штамів за номерами 9, 10. На розтині тварин виявляли ураження внутрішніх органів, характерні для туберкульозу.

Отже, в організмі тварин неблагополучних господарств персистують як *M. bovis*, так і атипові мікобактерії. *M. bovis* нашими дослідженнями поділені на дві групи: 1) повільнорослі (традиційно відомі); 2) швидкорослі.

Біологічні властивості швидкорослих штамів *M. bovis*. Швидкорослі штами *M. bovis* (№ 1, 2, 6), подібно до повільнорослого (№ 5), мали однакові морфологічні ознаки та культуральні властивості, які характерні для мікобактерій бичачого виду, не редукували нітрати, не мали каталази, не росли за температури 22 та $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Швидкорослі штами *M. bovis*, як і повільнорослий, стимулювали розвиток алергічної реакції в морських свинок і викликали їх загибель через 30–40 діб після зараження.

Швидкорослі штами *M. bovis*, виділені із патологічного матеріалу експериментально зараже-

них морських свинок, росли на 7-му добу, а повільнорослий – на 14-ту добу інкубації. У другій та наступних генераціях на живильному середовищі швидкорослі штами *M. bovis* формували колонії на 2-гу добу, а мікобактерії повільнорослого штаму – на 8–14-ту добу культивування.

Досліджувані штами *M. bovis*, викликали загибель кролів в однакові строки досліду (27–35-ту та 29–31-шу добу). На розтині загинув тварин було виявлено зміни, характерні для генералізованої форми туберкульозу.

До атипових мікобактерій швидкорослі штами *M. bovis* були подібні за часом формування колоній на щільних середовищах – росли на 2-гу добу після посіву та за здатністю рости на яєчному середовищі зі саліцилатом натрію в концентрації 0,5 мг/см³.

У разі зараження морських свинок атиповими мікобактеріями загибель їх не наступала.

Швидкорослі патогенні штами *M. bovis* росли на середовищі зі саліцилатом натрію у концентрації 0,5 мг/см³ та утворювали колонії на середовищі без саліцилату натрію на 2-гу добу, що характерно для атипових мікобактерій.

Вивчення ліпідного складу штамів мікобактерій. Максимальний вміст загальних ліпідів зареєстровано в епізоотичного повільнорослого штаму *M. bovis*, дещо нижчий – у штаму Vallee та атипових мікобактерій, найнижчий – у вакцинного BCG.

У штамів мікобактерій більша частина загальних ліпідів була представлена полярними ліпідами – фосфоліпідами (22,70–24,80 %). Серед нейтральних ліпідів ідентифіковані діацилгліцероли, стерини, вільні жирні кислоти, триацилгліцероли та ефіри стеринів. Встановлено однаковий якісний склад ліпідів, але різний кількісний вміст їх окремих сполук.

Методом ГРХ були виявлені вільні жирні кислоти, майже ідентичні для усіх штамів, які відрізнялися кількістю. В основному переважали насичені жирні кислоти, що зазвичай характерно для мікобактерій. Серед окремих насичених жирних кислот домінувала пальмітинова (18,87–28,49 %). Відзначено високий вміст арахінової кислоти – у повільнорослого штаму *M. bovis* (17,47±0,54 %), бегенової – у атипових мікобактерій, виділених з молока (АТ-1 – 19,21±0,66 %). Встановлено, що тільки штами атипових мікобактерій, виділених з молока (АТ-1) та лімфатичних вузлів (АТ-2) великої рогатої худоби, що реагувала на туберкулін, містили суттєву кількість арахідонової кислоти (7,67±0,23 та 1,94±0,04 % відповідно), на відміну від інших штамів, де виділяли її лише сліди або взагалі не виділяли.

Серед ненасичених жирних кислот домінувала олеїнова кислота у всіх досліджуваних штамів.

Результати досліджень показали пряму залежність патогенних властивостей мікобактерій від вмісту загальних ліпідів та окремих фракцій.

Ліпідний склад епізоотичних штамів *M. bovis* – повільнорослого та швидкорослого.

Встановлено, що на яєчному живильному середовищі з рН 6,5 повільнорослий штам *M. bovis* синтезував більшу кількість загальних ліпідів (у 1,5 раза), а також діацилгліцеролів (у 1,4 раза), стеринів (у 1,6 раза) та вільних жирних кислот (у 1,1 раза). У швидкорослого штаму *M. bovis* кількість фосфоліпідів переважала в 1,2 раза, а триацилгліцеролів – у 1,8 раза.

В обох штамів виявлено великий вміст пальмітинової кислоти, особливо у повільнорослого штаму *M. bovis*, у якого також відзначали перевагу стеаринової, арахінової кислот (у 2,03 та 3,34 раза відповідно) та ненасичених жирних кислот за рахунок виділення більшої кількості пальмітолеїнової та олеїнової кислот. У швидкорослого штаму *M. bovis* встановлено перевагу насичених жирних кислот за рахунок суттєвого вмісту довголанцюгових кислот ($C_{21:0}$ – $C_{27:0}$ – $35,56 \pm 1,09$ %).

Результати проведених досліджень свідчать, що епізоотичні повільнорослий та швидкорослий штами *M. bovis* відрізняються за кількістю загальних ліпідів, фракцій ліпідів та спектрами жирних кислот.

Ліпідний склад швидкорослого штаму *M. bovis*, культивованого на різних живильних середовищах. Встановлено, що мікобактерії швидкорослого штаму *M. bovis* на рідкому синтетичному середовищі Сотона та на щільному яєчному середовищі (рН 7,1) синтезували велику кількість загальних ліпідів (відповідно на наважку $11,56 \pm 0,86$ та $15,13 \pm 0,30$ %, а на суху речовину $16,51 \pm 0,76$ та $21,61 \pm 0,64$ %), хоча на яєчному середовищі їх вміст був у 1,3 раза вищим. На синтетичному середовищі виявили більше фракцій діацилгліцеролів (у 1,3 раза), стеринів (у 1,3 раза), насичених (у 4,75 раза) та довголанцюгових (у 12 разів) жирних кислот, через великий вміст бегенової, пальмітинової та тетракозаної кислот, які становили майже 70 %, а на яєчному – фосфоліпідів (у 1,63 раза), також ненасичених (у 1,37 раза) та коротколанцюгових (у 20,4 раза) жирних кислот.

На яєчному живильному середовищі виявилось більше насичених жирних кислот: пальмітинової, нонадеканої, арахінової, генейкозаної, пентакозаної, гексакозаної, а також ненасичених – олеїнової, лінолевої з ліноленовою кислот, а на синтетичному – тільки насичених жирних кислот – тридеканої, пентадеканої, маргаринової, стеаринової, бегенової та тетракозаної кислот.

Синтетичне та яєчне живильні середовища (рН 7,1) стимулюють однакову невелику кількість кислот з непарним числом атомів вуглецю.

Швидкорослий штам *M. bovis* на яєчному та синтетичному середовищах з рН 7,1 здатний синтезувати велику кількість загальних ліпідів, проте їх вміст був вірогідно вищим на яєчному се-

редовищі за рахунок фосфоліпідів. Швидкорослий штам *M. bovis* на синтетичному середовищі утворював більше насичених жирних кислот, а на яєчному – ненасичених.

Залежність ліпідного складу мікобактерій від рН яєчного живильного середовища. Швидкорослий штам *M. bovis* при культивуванні на яєчному живильному середовищі з рН 7,1 синтезував у 1,87 раза більше загальних ліпідів, ніж на такому ж з рН 6,5.

У досліджуваних мікобактерій виявлено велику кількість фосфоліпідів і перевищування їх при вирощуванні культури на середовищі з рН 6,5. На яєчному середовищі з рН 6,5 також було більше триацилгліцеролів, вільних жирних кислот та ефірів стеринів. На середовищі з рН 7,1, переважали фракції діацилгліцеролів та стеринів.

При культивуванні мікобактерій на середовищі з рН 6,5 спостерігали велику кількість насичених жирних кислот, сума яких становила $72,61 \pm 0,50$ проти $42,02 \pm 0,23$ % на середовищі з рН 7,1.

У складі насичених жирних кислот досліджуваних мікобактерій домінуючою була пальмітинова кислота, але переважала вона у мікобактерій, які культивувалися на середовищі з рН 7,1 ($30,52 \pm 0,45$ проти $19,62 \pm 0,53$ %). У мікобактерій, накопичених на середовищі з рН 7,1, виявляли на мінімальному рівні (сліди) стеаринової, маргаринової та трикозанової кислот, а з рН 6,5 – в значній кількості.

У мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 7,1, кількість ненасичених жирних кислот переважала над насиченими через значний вміст олеїнової кислоти, якої було майже в 2,37 раза більше, ніж у мікобактерій, накопичених на середовищі з рН 6,5; у 13,3 раза більше відзначено коротколанцюгових жирних кислот ($C_{12:0}$ – $C_{20:0}$ – $93,01 \pm 0,70$ %), ніж довголанцюгових ($C_{21:0}$ – $C_{27:0}$ – $6,99 \pm 0,63$ %).

На середовищі з рН 6,5 мікобактерії синтезували також більше коротколанцюгових жирних кислот, проте лише в 1,8 раза, ніж довголанцюгових ($64,44 \pm 0,41$ проти $35,56 \pm 0,63$ %), та кислот з непарним числом атомів вуглецю ($C_{13:0}$, $C_{15:0}$ й ін. – $26,15 \pm 0,70$ проти $7,05 \pm 0,66$ % на середовищі з рН 7,1).

Порівняльним вивченням ліпідного складу швидкорослого штаму *M. bovis* на яєчному середовищі з рН 7,1 та 6,5 відзначено, що на середовищі з рН 6,5 кількість фосфоліпідів, триацилгліцеролів, насичених та довголанцюгових жирних кислот була вірогідно вищою, ніж при вирощуванні на середовищі з рН 7,1, де вірогідно домінувала кількість загальних ліпідів, діацилгліцеролів, стеринів та ненасичених жирних кислот.

Ліпідний склад мікобактерій швидкорослого штаму *M. bovis*, накопичених на синтетичному живильному середовищі з різним рН. При культивуванні швидкорослого штаму

M. bovis на середовищі з рН 7,1 вміст загальних ліпідів був у 1,5 раза вищим, ніж на середовищі з рН 6,5, на якому вірогідно переважала кількість триацилгліцеролів ($P < 0,05$).

У швидкорослого штаму, накопиченого на обох середовищах, кількість насичених жирних кислот перевищувала кількість ненасичених, хоча при культивуванні мікобактерій на середовищі з рН 7,1, вміст насичених жирних кислот був у 1,1 раза вищим, ніж при культивуванні на середовищі з рН 6,5.

У складі насичених жирних кислот перевищувала пальмітинова кислота, особливо у мікобактерій на середовищі з рН 6,5 ($21,71 \pm 1,11$ проти $16,72 \pm 0,69$ %), бегенова ($38,46 \pm 1,16$ та $32,41 \pm 1,05$ %) – у всіх досліджуваних мікобактерій, а також тетракозанова – на середовищі з рН 7,1 ($13,08 \pm 0,70$ проти $4,01 \pm 0,58$ %). Виявлено лише сліди нонадеканової, арахінової і генейкозанової кислот у мікобактерій на середовищі з рН 7,1 та 6,5.

Вміст ненасичених жирних кислот у культурі, одержаній на середовищі з рН 6,5, ніж на середовищі з рН 7,1, збільшився у 1,5 рази, коротколанцюгових – у 1,6 раза за рахунок олеїнової кислоти, кількість якої становила відповідно $24,72 \pm 1,15$ і $16,57 \pm 0,58$ %, та збільшенням кількості лінолевої та ліноленової кислот відповідно $0,89 \pm 0,27$ проти $0,03 \pm 0,02$ %.

Вміст довголанцюгових жирних кислот у мікобактерій, одержаних на середовищі з рН 7,1, був вищим, ніж коротколанцюгових, і складав $54,30 \pm 0,51$ проти $45,70 \pm 0,80$ % за рахунок великої кількості бегенової та тетракозанової кислот.

Культура швидкорослого штаму *M. bovis* на синтетичному середовищі, незалежно від його рН, синтезувала малу кількість кислот з непарним числом атомів вуглецю ($C_{13:0}$, $C_{15:0}$ й ін.).

Встановлено, що швидкорослий штам *M. bovis* на синтетичному середовищі з рН 7,1 синтезує більше загальних ліпідів, насичених та довголанцюгових жирних кислот, тоді як на середовищі з рН 6,5 у нього домінують триацилгліцероли, ненасичені та коротколанцюгові жирні кислоти.

Вплив тривалого пасажування епізоотичного швидкорослого штаму *M. bovis* через щільне живильне середовище з рН 6,5 на ліпідний склад, сенсibiliзуючі та вірулентні властивості. Дослідженнями ліпідного складу швидкорослого штаму *M. bovis* встановлено, що на 80-му пасажі кількість загальних ліпідів знизилася в порівнянні з 2 та 40-им пасажами в 1,26 та 1,37 раза відповідно.

У динаміці пасажування відзначено тенденцію до зниження кількості фракцій триацилгліцеролів та ефірів стеринів. Також спостерігалось зменшення вмісту і фосфоліпідів. Але встановлено збільшення кількості діацилгліцеролів. Загальна тенденція до збільшення спостерігалась і у фракцій стеринів та вільних жирних кислот.

ГРХ-аналізом фракції вільних жирних кислот виявлено велику кількість насичених жирних кислот, зростання яких спостерігалось зі збільшенням кількості пасажів і, в основному, за рахунок пальмітинової кислоти.

Встановлено збільшення кількості стеаринової кислоти майже в 4 рази на 40 та 80-му пасажах, а пальмітинової кислоти в 1,5 раза – на 80-му пасажі. Зі збільшенням кількості пасажів спостерігали зниження вмісту нонадеканової, арахінової, генейкозанової, бегенової, трикозанової, тетракозанової, гексакозанової та гептакозанової кислот.

У динаміці пасажів спостерігалось зниження кількості ненасичених жирних кислот та збільшення коротколанцюгових.

Отже, за багаторазового пасажування спостерігалось зниження кількості загальних ліпідів, фракцій фосфоліпідів, триацилгліцеролів та ефірів стеринів. Виявлено тенденцію до зниження кількості ненасичених жирних кислот та підвищення насичених. Такі зміни ліпідного складу призвели до зниження вірулентності мікобактерій, що й підтверджують результати біологічних досліджень.

Культура *M. bovis* на всіх етапах пасажування через яєчне живильне середовище з рН 6,5 викликала сенсibiliзацію організму морських свинок до туберкуліну. На розтині у всіх піддослідних тварин у внутрішніх органах виявляли характерні для туберкульозу ураження, але при цьому спостерігалось зниження вірулентності культури на 40–80-му пасажах у 1,5–2 рази.

Зниження загального вмісту ліпідів, фосфоліпідів, триацилгліцеролів, ефірів стеринів у разі багаторазового пасажування через щільне живильне середовище з рН 6,5 супроводжувалось зниженням вірулентності культур.

Вплив тривалого пасажування епізоотичного швидкорослого штаму *M. bovis* через щільне живильне середовище з рН 7,1 на ліпідний склад, сенсibiliзуючі та вірулентні властивості. У процесі пасажування швидкорослого штаму *M. bovis* через щільне живильне середовище з рН 7,1 спостерігалось зменшення загальних ліпідів у 1,35 та 1,16 раза відповідно на 40 і 59-му пасажах, фосфоліпідів, триацилгліцеролів, ефірів стеринів і збільшення діацилгліцеролів, стеринів та вільних жирних кислот.

Виявлено високий вміст насичених і ненасичених жирних кислот у всіх досліджуваних мікобактерій. У складі насичених жирних кислот помічено суттєвий вміст пальмітинової, арахінової, генейкозанової кислот на 2-му пасажі, тетракозанової, гексакозанової – на 40-му, маргаринової, стеаринової, бегенової, пентакозанової – на 59-му. У складі ненасичених жирних кислот домінувала олеїнова кислота.

Зі збільшенням кількості пасажів зростала кількість таких кислот, як пентадеканова, марга-

ринова, стеаринова, бегенова, пентакозанова, ліолева та ліоленова. Проте відзначено зменшення вмісту арахінової, генейкозанової, гептакозанової та олеїнової кислот.

Загальна кількість коротколанцюгових жирних кислот переважала над довголанцюговими, але їх співвідношення зменшувалося зі збільшенням кількості пасажів на користь довголанцюгових.

Культура швидкорослого штаму *M. bovis* на всіх етапах пасажування через яєчне живильне середовище з рН 7,1 викликала сенсibilізацію організму морських свинок до туберкуліну. На розтині в усіх піддослідних тварин у внутрішніх органах виявляли характерні для туберкульозу ураження, але при цьому спостерігалось зниження вірулентності культури на 40–59-му пасажі у 1,2–1,6 рази відповідно.

Таким чином, збільшення кількості пасажів на яєчному середовищі з рН 7,1 призвело до зниження вмісту загальних ліпідів, фосфоліпідів, триацилгліцеролів та ефірів стеринів. Зміни їх ліпідного складу супроводжувались зниженням вірулентності мікобактерій.

Залежність ліпідного складу швидкорослого штаму *M. bovis* від тривалого перебування у ґрунті. Впродовж трьохмісячного перебування у ґрунті швидкорослого штаму *M. bovis* подовжився термін утворення колоній у порівнянні з вихідною культурою відповідно з 2 до 28 діб. При цьому зменшився вміст загальних ліпідів у 1,34 рази, фосфоліпідів у 1,43 рази, триацилгліцеролів у 1,2 рази, але збільшився вміст діацилгліцеролів у 1,34 рази, стеринів у 1,42 рази та вільних жирних кислот у 1,2 рази.

Після трьохмісячного перебування у ґрунті швидкорослого штаму *M. bovis* вміст ненасичених та насичених жирних кислот становив відповідно 30 і 70 %; із довголанцюгових жирних кислот вміст бегенової збільшився у 3,6 рази, пентакозанової зменшився в 1,3 рази, а генейкозанової – у 7 разів. Трикозанова, тетракозанова, гексакозанова кислоти майже не виявлялись.

У складі коротколанцюгових жирних кислот переважала пальмітолеїнова, вміст якої після перебування у ґрунті швидкорослого штаму *M. bovis* зріс у 1,42 рази, у 3–12 разів зріс вміст лауринової, миристинової, тридеканової, пальмітолеїнової кислот.

Вірулентність швидкорослого штаму *M. bovis* після трьохмісячного перебування у ґрунті зменшилась в 2 рази.

Таким чином, у швидкорослого штаму *M. bovis* впродовж перебування у ґрунті зменшився вміст загальних ліпідів, фосфоліпідів, триацилгліцеролів та знизилась вірулентність.

Вивчення ліпідного складу та вірулентності 9- та 30-добових культур мікобактерій швидкорослого штаму *M. bovis*. 9- та 30-добові культури мікобактерій швидкорослого штаму *M.*

M. bovis, вирощені на яєчному середовищі з рН 6,5, викликали сенсibiliзацію організму морських свинок до туберкуліну і їх загибель впродовж 1,3–2 місяців. Вміст загальних ліпідів у мікобактерій, виділених з організму тварин, заражених 9-добовою культурою, у порівнянні з вихідною, збільшився у 1,42 раза, а з 30-добовою – у 2,67 раза. У вихідного штаму *M. bovis* реєструвався найбільший вміст триацилгліцеролів, тоді як у 9-добовій культурі – стеринів ($14,38 \pm 0,20$ %) і у 30-добовій – ефірів стеринів ($16,11 \pm 0,21$ %).

У *M. bovis*, виділених з організму морських свинок, які були заражені 9- та 30-добовими культурами, вміст фракцій фосfolіпідів, діацилгліцеролів, вільних жирних кислот вірогідно не відрізнявся.

Усі досліджувані штами характеризувалися високим вмістом насичених жирних кислот ($57,33$ – $72,61$ %), з яких основну масу складала пальмітинова кислота, кількість якої максимально зросла у 30-добовій культурі, в якій значний вміст складали пентадеканова ($1,18 \pm 0,17$ %), маргарінова ($6,14 \pm 0,25$ %), ліолева з ліоленовою ($7,01 \pm 0,21$ %) кислоти.

Вміст ненасичених жирних кислот був вищим у 9-добовій культурі за рахунок олеїнової кислоти ($36,58 \pm 0,28$ %), ніж у мікобактерій вихідної та 30-добовій культур.

Встановлено, що вміст різних фракцій ліпідів досліджених штамів мікобактерій не відрізнявся, а пасажування через організм піддослідних тварин не вплинуло на їх кількість, за винятком загальних ліпідів.

Досліджуваний швидкорослий штам *M. bovis* незалежно від тривалості культивування зумовив специфічні для туберкульозу ураження внутрішніх органів морських свинок, що вказує на відсутність залежності вірулентності мікобактерій від строків культивування.

ВИСНОВКИ

1. У стадах великої рогатої худоби господарств степової зони України, неблагополучних щодо туберкульозу, циркулюють як *M. bovis* (33,33 %), так і атипові швидкорослі мікобактерії (8,33 %). 37,5 % штамів *M. bovis* володіють незвичайними властивостями: формують перші колонії на другу добу культивування.

У ліпідному складі швидкорослих мікобактерій, культивованих на штучних живильних середовищах із різним рН, за численних пасажів на штучному живильному середовищі та тривалого перебування у ґрунті встановлені суттєві динамічні зміни, які корелюють з вірулентністю досліджуваних штамів. Надані пропозиції позитивно впливають на підвищення ефективності діагностики мікобактеріальних інфекцій.

2. Епізоотичний швидкорослий штам *M. bovis* відрізняється від повільнорослого не тільки строками появи колоній на штучних живильних середовищах (на 2-гу добу після посіву), але й культуральними і біохімічними властивостями: здатністю рости на середовищі з $0,5 \text{ мг/см}^3$ саліцилату натрію, кількістю загальних ліпідів, підвищеним вмістом фракцій фосфоліпідів ($27,97 \pm 0,26$ проти $22,70 \pm 0,41$ %) та триацилгліцеролів ($18,32 \pm 0,16$ проти $10,43 \pm 0,28$ %).

3. За якісним ліпідним складом мікобактерії не відрізняються, за винятком швидкорослих атипових мікобактерій, у той час як кількісний склад їх різний. Максимальний вміст загальних ліпідів виявлено в епізоотичного повільнорослого штаму *M. bovis*, дещо нижчий – в атипових мікобактерій та найнижчий – у BCG. Високий вміст пальмітинової кислоти фіксується в усіх досліджуваних мікобактерій, арахінової кислоти – у *M. bovis*, бегенової – в атипових мікобактерій. Арахідонову кислоту виявлено лише в атипових мікобактерій (АТ-1 – $7,64 \pm 0,23$ %, АТ-2 – $1,94 \pm 0,04$ %).

4. У швидкорослого штаму *M. bovis* на яєчному живильному середовищі (рН 7,1) переважає вміст загальних ліпідів, фосфоліпідів, ненасичених жирних кислот, тоді як на синтетичному – діацилгліцеролів, стеринів, вільних жирних кислот, триацилгліцеролів, ефірів стеринів та насичених жирних кислот.

5. У швидкорослого штаму *M. bovis* на яєчному живильному середовищі з рН 6,5 відзначається вищий вміст фракцій фосфоліпідів, триацилгліцеролів, ефірів стеринів і окремих вільних жирних кислот (стеаринової, нонадеканової, арахінової, генейкозанової, трикозанової, тетракозанової, пентакозанової), а на середовищі з рН 7,1 – домінування загальних ліпідів, діацилгліцеролів, стеринів та ненасичених жирних кислот, скорочення довжини ланцюга жирних кислот, зменшення синтезу кислот з непарним числом атомів вуглецю.

6. У швидкорослого штаму *M. bovis* на синтетичному живильному середовищі з рН 7,1 виявлено більше загальних ліпідів (у 1,5 раза) та довголанцюгових жирних кислот (1,41 раза), на середовищі з рН 6,5 – триацилгліцеролів (у 1,18 раза), ненасичених (у 1,51 раза) та коротколанцюгових жирних кислот (1,34 раза), а кількість бегенової кислоти ($38,46 \pm 1,16$ та $32,41 \pm 1,05$ % відповідно) не залежала від рН.

7. Багаторазове пасажування швидкорослого штаму *M. bovis* через щільне живильне середовище з рН 6,5 супроводжується зменшенням вмісту загальних ліпідів, фосфоліпідів, триацилгліцеролів, ефірів стеринів на фоні зниження вірулентності культури мікобактерій, збільшенням кількості насичених жирних кислот (пальмітинової, стеаринової) і зменшенням ненасичених.

Зі збільшенням кількості пасажів зменшується вміст нонадеканової, арахінової, генейкозано-

вої, бегенової, трикозанової, тетракозанової, гексакозанової та гептакозанової кислот.

8. Багаторазове пасажування швидкорослого штаму *M. bovis* через щільне живильне середовище з рН 7,1 супроводжується зменшенням вмісту загальних ліпідів, фракцій фосфоліпідів, триацилгліцеролів, ефірів стеринів на фоні зниження вірулентності мікобактерій. У складі насичених жирних кислот найбільший вміст мають пальмітинова, арахінова, генейкозанова кислоти на 2-му пасажі, тетракозанова, гексакозанова – на 40-му і маргарінова, стеаринова, бегенова, пентакозанова – на 59-му. У складі ненасичених жирних кислот домінує олеїнова кислота.

Зі збільшенням кількості пасажів збільшується вміст пентадеканової, маргарінової, стеаринової, бегенової, пентакозанової, лінолевої та ліноленової кислот, проте зменшується кількість арахінової, генейкозанової, гептакозанової та олеїнової кислот.

9. Тривале перебування *M. bovis* у ґрунті супроводжується подовженням терміну утворення колоній у першій генерації з 2 до 28-и діб та зменшенням вмісту загальних ліпідів у 1,34 раза, фракцій фосфоліпідів та триацилгліцеролів у 1,43 та 1,2 раза відповідно і зниженням вірулентності.

10. У *M. bovis*, виділених з організму морських свинок, які були заражені 9- та 30-добовою культурою, вміст фракцій фосфоліпідів, діацилгліцеролів, вільних жирних кислот не залежить від строку культивування та не впливає на ступінь вірулентності.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Як критерій оцінки ступеня вірулентності *M. bovis* використовувати рівень вмісту фосфоліпідів, триацилгліцеролів, ефірів стеринів та кількості ненасичених жирних кислот.

2. Методичні рекомендації щодо строків знезараження ґрунту неблагополучних по туберкульозу господарств степової зони України. – Дніпропетровськ, 2006. – 7 с.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Характеристика причин тривалого епізоотичного процесу туберкульозу великої рогатої худоби / Ткаченко О.А., Хільченко Г.І., Зеленська М.В., Ковальова Л.О. (Ткаченко) // Сільський господар: Науково-практ. журнал. – 2001. – № 11–12. – С. 14–16. *Дисертантка провела аналіз та узагальнення результатів дослідження.*

2. Епізоотичний процес туберкульозу великої рогатої худоби. Причини тривалості. / Ткачен-

ко О.А., Хільченко Г.І., Зеленська М.В., Ковальова Л.О. (Ткаченко) // Наукові праці Полтавської державної аграрної академії. – Полтава, 2002. – Т. 2 (21). – С.218–220. *Дисертантка провела аналіз та узагальнення результатів дослідження.*

3. Експериментальні дані щодо адаптивної можливості епізоотичних і референтного штамів *M. bovis* на щільних яєчних живильних середовищах з різним рН / Ткаченко О.А., Ковальова Л.О. (Ткаченко), Хільченко Г.І., Зеленська М.В. // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. – 2004. – № 1. – С. 91–95. *Дисертантка провела аналіз результатів культурально-морфологічних досліджень та підготувала матеріали статті до друку.*

4. Адаптивна здатність *M. bovis* на щільних яєчних живильних середовищах з різним рН / Хільченко Г.І., Зеленська М.В., Ковальова Л.О., Ткаченко О.А., Короленко Л.С. // Ветеринарна медицина України. – 2004. – № 7. – С. 18–21. *Дисертантка провела аналіз результатів культурально-морфологічних досліджень та підготувала матеріали статті до друку.*

5. Зеленська М.В., Хільченко Г.І. Хімічний склад швидкоростучого штаму *M. bovis* // Ветеринарна медицина-2005: сучасний стан та актуальні проблеми забезпечення ветеринарного благополуччя тваринництва: Міжвідомчий темат. наук. зб. – Харків, 2005. – Т. II. – С. 463–468. *Дисертантка провела вивчення вірулентних властивостей мікобактерій, накопичення біомаси культур, дослідження ліпідного складу, аналіз результатів; оформлення статті до друку.*

6. Зеленська М.В. Порівняльний склад ліпідів у різних видів мікобактерій // Забезпечення ветеринарно-санітарного благополуччя тваринництва, якості і безпеки продукції: Матер. Міжнар. науково-практ. конф. (м. Одеса, 27–29 жовтня 2004 р.) – С. 101–106. *Дисертанткою проведено накопичення біомаси мікобактерій, дослідження ліпідного складу та аналіз його результатів; оформлення статті до друку.*

7. Залежність біохімічного складу швидкоростучого штаму *M. bovis* від рН штучного живильного середовища / Зеленська М.В., Хільченко Г.І., Кравцова Л.В., Ткаченко О.А. // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. – 2005. – № 1. – С. 77–81. *Дисертантка провела накопичення біомаси мікобактерій, дослідження ліпідного складу та аналіз його результатів; оформлення статті до друку.*

8. Вплив рН штучного живильного середовища на біохімічний склад швидкорослого штаму *M. bovis* / Зеленська М.В., Хільченко Г.І., Кравцова Л.В., Ткаченко О.А. // Ветеринарна медицина України. – 2005. – № 9. – С. 15–17. *Дисертантка провела накопичення біомаси мікобактерій, дослідження ліпідного складу та аналіз його результатів; оформлення статті до друку.*

9. Вплив пасажування на біохімічний склад епізоотичного швидкорослого штаму *M. bovis* / Зеленська М.В., Ковальова Л.О., Кравцова Л.В., Ткаченко О.А. // Вісник Дніпропетровського дер-

жавного аграрного університету. – 2005. – № 2. – С. 158–160. *Дисертантка провела накопичення біомаси мікобактерій, дослідження ліпідного складу та аналіз його результатів; оформлення статті до друку.*

10. Біохімічний склад швидкорослого штаму *M. bovis* в залежності від тривалості пасажування / Бусол В.О., Зеленська М.В., Ковальова Л.О., Кравцова Л.В., Ткаченко О.А. // Ветеринарна медицина України. – 2006. – № 2. – С. 20–22. *Дисертантка провела накопичення біомаси мікобактерій, дослідження ліпідного складу та аналіз його результатів; оформлення статті до друку.*

Зеленська М.В. Ліпідний склад та вірулентність *Mycobacterium bovis*, виділених від великої рогатої худоби степової зони України. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія. – Одеський державний аграрний університет. – Одеса, 2006.

При проведенні досліджень вивчено біологічні властивості мікобактерій, виділених з організму великої рогатої худоби господарств, неблагополучних щодо туберкульозу. Показано, що в стадах циркулюють як *M. bovis* (33,33 %), так і атипові швидкорослі мікобактерії (8,33 %). 37,5 % штамів *M. bovis* володіють незвичайними властивостями: формують перші колонії на другу добу культивування. У *M. bovis* вивчено ліпідний склад та залежність його рівня від деяких факторів зовнішнього середовища: впливу складу та рН живильного середовища, тривалості пасажування через штучне живильне середовище з різним рН, тримісячного перебування у ґрунті, тривалості культивування та пасажування через організм морських свинок. Запропоновано критерії оцінки за рівнем ліпідів (загальних ліпідів, фосфоліпідів, триацилгліцеролів) ступеня вірулентності мікобактерій бичачого виду та розроблені й впроваджені рекомендації для знезараження ґрунту неблагополучних щодо туберкульозу господарств.

Ключові слова: мікобактерії бичачого виду (*M. bovis*), атипові мікобактерії, сенсibilізація, вірулентність, діагностика, ліпідний склад.

Зеленская М.В. Липидный состав и вирулентность *Mycobacterium bovis*, выделенных от крупного рогатого скота степной зоны Украины. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология и вирусология. – Одесский государственный аграрный университет. – Одесса, 2006.

При проведении исследований изучены биологические свойства микобактерий, выделенных из организма крупного рогатого скота хозяйств, неблагополучных по туберкулёзу. Показано, что в

стадах циркулируют как *M. bovis* (33,33 %), так и атипичные быстрорастущие микобактерии (8,33 %). 37,5 % штаммов *M. bovis* обладают необычными свойствами: формируют первые колонии на вторые сутки культивирования.

Выделенные быстрорастущие штаммы *M. bovis* культурально-морфологическими и биологическими свойствами сходны с эпизоотическим медленно растущим штаммом *M. bovis*, по времени формирования колоний на плотных питательных средах и способностью расти на яичной среде с салицилатом натрия (в концентрации 0,5 мг/см³) – с атипичными микобактериями.

При изучении липидного состава эталонного, вакцинного, патогенного и атипичных штаммов микобактерий методом ТСХ выделены основные фракции общих липидов. Установлены одинаковый качественный состав липидов, но разное количественное содержание отдельных фракций. Максимальное содержание общих липидов выявлено у эпизоотического медленно растущего штамма *M. bovis*, несколько ниже – у штамма Vallee и атипичных микобактерий, самое низкое – у BCG. Методом ГЖХ были обнаружены свободные жирные кислоты, идентичные для всех штаммов. В основном преобладали насыщенные жирные кислоты, что и характерно для микобактерий.

Установлено, что у быстрорастущего штамма *M. bovis* количество фосфолипидов было в 1,2 раза, триацилглицеролов в 2 раза больше, а ненасыщенных и длинноцепочечных жирных кислот меньше в сравнении с медленно растущим штаммом *M. bovis*, где отмечено больше общих липидов (у 1,5 раза), диацилглицеролов, стерина, эфиров стерина, свободных жирных кислот и некоторое преобладание ненасыщенных жирных кислот.

Установлено, что при культивировании быстрорастущего штамма *M. bovis* на яичной среде (рН 7,1) преобладало количество общих липидов и фосфолипидов (в 1,3 и 1,6 раза соответственно), тут же отмечено большое количество ненасыщенных и короткоцепочечных жирных кислот. А на синтетической среде Сотона у этого штамма преобладали фракции диацилглицеролов, стерина, насыщенные и длинноцепочечные жирные кислоты, из-за высокого содержания бегеновой, пальмитиновой и тетракозановой кислот, которые составляли почти 70 %.

При использовании для культивирования быстрорастущего штамма *M. bovis* таких же сред, но с рН 6,5 выявлена обратная зависимость. Установлено, что на яичной среде с рН 6,5 у штамма несколько преобладали фосфолипиды и триацилглицеролы и существенно – насыщенные жирные кислоты. На синтетической среде с рН 6,5 больше было триацилглицеролов, ненасыщенных и короткоцепочечных жирных кислот.

При многократном пассажировании быстрорастущего штамма *M. bovis* через яичные среды с рН 6,5 и 7,1 выявили тенденцию к снижению общих липидов, фосфолипидов, триацилглицеролов

и эфиров стероидов. Такие изменения липидного состава привели к снижению вирулентности микобактерий, что подтвердили результаты биологических исследований. Продолжительность жизни морских свинок, зараженных 40-ми, 59 и 80-м пассажами, была длительнее, чем у животных, зараженных исходными (вторыми) пассажами.

Установлено, что после трёхмесячного пребывания быстрорастущего штамма *M. bovis* в почве, микобактерии в первой генерации на яичной среде формировали колонии на 28-е сутки инкубации. Выявлено уменьшение количества общих липидов, фосфолипидов, триацилглицеролов (в 1,2–1,4 раза), некоторое увеличение количества короткоцепочечных и ненасыщенных жирных кислот. Исследуемый образец вызвал гибель морских свинок на 61–83-и сутки после заражения, в то время как исходная культура – на 36–38-е.

Исследованиями установлено, что пассажирование быстрорастущего штамма *M. bovis* через организм морских свинок не повлияло ни на фракционный состав липидов, ни на их количество. Кроме того, исследуемая культура, независимо от длительности пребывания на питательной среде и при заражении морских свинок, обусловила специфические для туберкулёза поражения внутренних органов.

Ключевые слова: микобактерии бычьего типа (*M. bovis*), атипичные микобактерии, сенсбилизация, вирулентность, диагностика, липидный состав.

Zelenskaya M.V. Lipids composition and virulence of *Mycobacterium bovis*, isolated from the cattle of steppe zone in Ukraine. – Manuscript.

Thesis of a scientific degree of candidate of veterinary sciences, speciality 16.00.03 – veterinary microbiology and virology. – Odessa State Agrarian University. – Odessa, 2006.

Biological properties for mycobacteria, isolated from the cattle bodies in tuberculosis farms have been studied. It is found out that both *M. bovis* (33,33 %) and atypical quickly growing mycobacteria are under circulation. 37,5 % *M. bovis* strains possess unusual properties, namely: they form the first colonies on the second day of cultivation. *M. bovis* is investigated in terms of its lipids composition and its dependence on some factors of the environmental such as effect of composition and pH nutritious medium, period of their cultivation on the artificial nutritious mediums with different pH, three-month being in soil, cultivation duration and passengering through guinea pigs bodies. Evaluation criteria on lipids level (general lipids, phosphorus lipids, etc.) as well as degree of virulence of mycobacteria of bovine type have been proposed. Recommendations on disinfection of soil in the farms suffered from tuberculosis have been developed and put into operation.

Key words: mycobacterium bovine (*M. bovis*), atypical mycobacteria, sensibility, virulence, diagnostics, lipids composition.