



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86516** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**G01N 33/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2012 13502</b>	(72) Винахідник(и): <b>Бергілевич Олександра Миколаївна (UA), Касянчук Вікторія Вікторівна (UA), Бергілевич Олег Олександрович (UA), Могутова Валентина Федорівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>26.11.2012</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.01.2014</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.01.2014, Бюл.№ 1</b>	(73) Власник(и): <b>СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Кірова, 160, м. Суми, 40021 (UA)</b>

## (54) СПОСІБ ФІКСАЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ ФІКСАТОРОМ ТРУМПСА 4F:1G ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ УЛЬТРАСТРУКТУРИ ПІД РАСТРОВИМ ЕЛЕКТРОННИМ МІКРОСКОПОМ

### (57) Реферат:

Спосіб фіксації мікроорганізмів з використанням фіксатора Трумпса 4F:1G для їх дослідження під растровим електронним мікроскопом включає центрифугування змивів добової культури мікроорганізмів, отриманої на щільному живильному середовищі, протягом 5 хвилин при 3000 обертах для утворення концентрованого осаду із мікроорганізмів, з наступним їх дво-триразовим обробленням фіксатором Трумпса 4F:1G та витримкою в різних концентраціях етилового спирту.

UA 86516 U



Корисна модель належить до ветеринарної та харчової мікробіології, і може бути використана при вивченні морфологічних характеристик бактеріальних клітин (стану поверхні, наявності джгутиків, капсули тощо), виділених з об'єктів навколишнього середовища (ґрунт, повітря вода) та всіх видів харчових продуктів під растровим електронним мікроскопом.

Відомим є спосіб фіксації біологічних об'єктів з використанням глутарового альдегіду для гістологічних досліджень. Глутаровий альдегід вважається хорошим фіксатором, так як він забезпечує найкращу збереженість морфологічної структури біологічних об'єктів та стабільність багатьох ферментів, тому його найчастіше використовують для фіксації та приготування зразків таких біологічних об'єктів, як тканин організму людини та тварини для електронної мікроскопії. Проте від використання глутарового альдегіду більша кількість ліпідів клітин тканин в досліджуваному зразку розчиняється та вимивається, тому для запобігання цьому необхідно проводити дофіксацію в тетраоксиді осмію [Микроскопическая техника. Руководство для врачей и лаборантов/ под редакцией Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова/ М.: Медицина, 1996. - 544 с.].

Найближчим аналогом є спосіб фіксації біологічних об'єктів (тканин організмів, окремих клітин (сперма), комах та інших багатоклітинних простих організмів) з використанням фіксатора Трумпса 4F:1G [McDowell, E.M., and B.F. Trump. 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. Arch. Pathol. Lab. Med., 100:405-414].

Подібними ознаками з найближчим аналогом є те, що для фіксації мікроорганізмів використовували фіксатор Трумпса 4F:1G, який складається з 4 % формальдегіду, 1 % глутаральдегіду та фосфатно-буферного розчину, який наприкінці приготування повинен мати pH 7,2-7,4. Цей фіксатор стабілізує білкові клітинні компоненти та готує їх до зневоднення спиртами. Досліджувані зразки можна зберігати в фіксаторі Трумпса 4F:1G до 6місяців за температури 4 °C [McDowell, E.M., and B.F. Trump. 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. Arch. Pathol. Lab. Med., 100:405-414].

Відмінним ознаками аналога від заявленого способу є те, що до цього часу фіксатор Трумпса 4F:1G застосовували лише для фіксації біологічних тканин з наступним приготуванням гістозрізів, а не для фіксації культури мікроорганізмів для дослідження під растровим (скануючим) електронним мікроскопом. Згідно з нашими дослідженнями, цей фіксатор добре зберігає морфологічну структуру бактеріальних клітин. Крім того, зберігання в ньому досліджуваних мікроорганізмів може відбуватись довготривалий час без змін їх морфологічних властивостей.

В основу корисної моделі поставлена задача: розробити спосіб фіксації мікроорганізмів фіксатором Трумпса 4F:1G для дослідження їх ультраструктури під растровим електронним мікроскопом.

Поставлена задача вирішується наступним чином.

Отриману на МПА або на іншому щільному середовищі (бажано не використовувати живильні середовища з додаванням фарбників) добову культуру мікроорганізмів змивають фізіологічним розчином у центрифужні пробірки. Змиви з добової культури мікроорганізмів центрифугують протягом 5 хвилин при 3000 обертів для утворення концентрованого осаду із мікроорганізмів. Надосадову рідину зливають і до бактеріального осаду додають фіксатор Трумпса 4F:1G, який попередньо готують з таких компонентів: 86 см<sup>3</sup> дистильованої води, 10 см<sup>3</sup> 37-40 % формальдегіду, 4 см<sup>3</sup> 25 % глутаральдегіду, 1,16 г NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O та 0,27 г NaOH.

Після додавання фіксатора Трумпса 4F:1G проводять ретельне перемішування в пробірках до утворення рівномірної суспензії. Суспензію центрифугують протягом 5 хвилин при 3000 обертах для утворення концентрованого осаду із мікроорганізмів. Зливають надосадову рідину і знову додають фіксатор Трумпса 4F:1G, перемішують, центрифугують і так роблять 2-3 рази. Осад, із бактеріальних клітин, який був отриманий вищезазначеним способом, відмивають фосфатним буфером від фіксатора Трумпса 4F:1G.

Після цього бактеріальний осад витримують у спиртах за схемою: по 15 хвилин в 30 %, 50 %, 75 %, 95 %, 100 % спиртах і потім ще одну годину - в 100 % спирті. Після кожного витримання у спирті проводять центрифугування. Невелику кількість осаду з бактеріальних клітин, отриманого після останнього центрифугування, за допомогою препарувальної голки наносять на графітові "столики", висушують на повітрі, напильють у вакуумній камері вуглицем або золотом, досліджують в скануючому електронному мікроскопі.

Переваги способу, перш за все, полягають в тому, що його можна застосовувати для фіксації мікроорганізмів з метою дослідження їх під растровим електронним мікроскопом. По-друге, це досить швидкий спосіб фіксації мікроорганізмів, так як використання фіксатора 4F:1G, зменшує час фіксації до 1-2 годин (на відміну від 3-4 годин при використанні лише глутарового альдегіду, що обов'язково повинно супроводжуватися дофіксацією), при цьому якість зображених об'єктів не погіршується. По-третє, при застосуванні фіксатора Трумпса 4F:1G

добре зберігається структура бактеріальних клітин до 6 місяців без змін морфологічних властивостей мікроорганізмів, що дає можливість їх добре вивчити та встановити їхні розміри. Крім того, цей спосіб не потребує дорогих реактивів та його можна застосовувати поряд з класичними мікробіологічними методами досліджень бактеріальних клітин як такий, що точно

5 (адекватно) відображає найбільш важливі морфологічні характеристики досліджуваних об'єктів.  
Приклад I. Вивчення форми та розмірів бактеріальних клітин бактерій *Enterobactersakazakii*, які належать до родини *Enterobacteriaceae*, для фіксації яких використали фіксатор Трупса 4F:1G на ультраструктурному рівні з використанням растрового електронного мікроскопа (фіг. 1). За використанням запропонованого методу було встановлено форму мікроорганізмів

10 (симетричні палички або форма неповного завитка) та розміри: довжина від 1,4 до 2,1 мкм та ширина від 0,4 до 1 мкм. Поверхня бактеріальних клітин гладка і рівна.  
Приклад II. Вивчення стану поверхні та розмірів бактеріальних клітин *Staphylococcus aureus*, для фіксації яких використали фіксатор Трупса 4F:1G на ультраструктурному рівні з використанням растрового електронного мікроскопа (фіг. 2). За використанням запропонованого

15 методу було встановлено форму мікроорганізмів (чітко округла) та їх розміри від 1,15 до 0,6 мкм. Поверхня бактеріальних клітин гладка і рівна, на деяких клітинах помічено нерівності та нашарування.  
Поряд з тим, за наших досліджень та використання даного способу фіксації стало можливим

20 вивчення деяких фізіологічних процесів бактеріальних клітин, так наприклад процес ділення (фіг. 3) та встановлення зв'язків між бактеріальними клітинами (фіг. 4).  
Приклад III. Вивчення асоціацій мікроорганізмів на прикладі кефірного грибка, для фіксації якого використали фіксатор Трупса 4F:1G. За використанням запропонованого методу було встановлено форму мікроорганізмів, які входять до мікробної асоціації, їх кількість і співвідношення в асоціації, а також стан їх поверхні (фіг. 5).

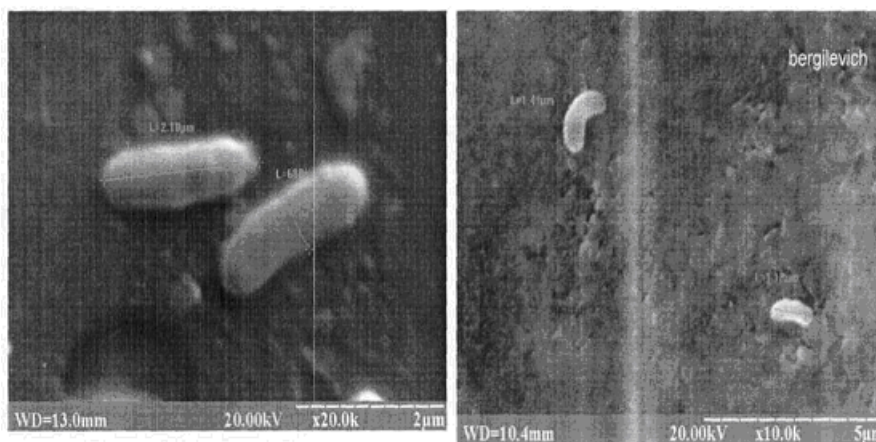
25 Як видно з наведених прикладів I-III, запропонований спосіб фіксації бактеріальних клітин з використанням фіксатора Трупса 4F:1G точно відображає найбільш важливі морфологічні характеристики досліджуваних об'єктів.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

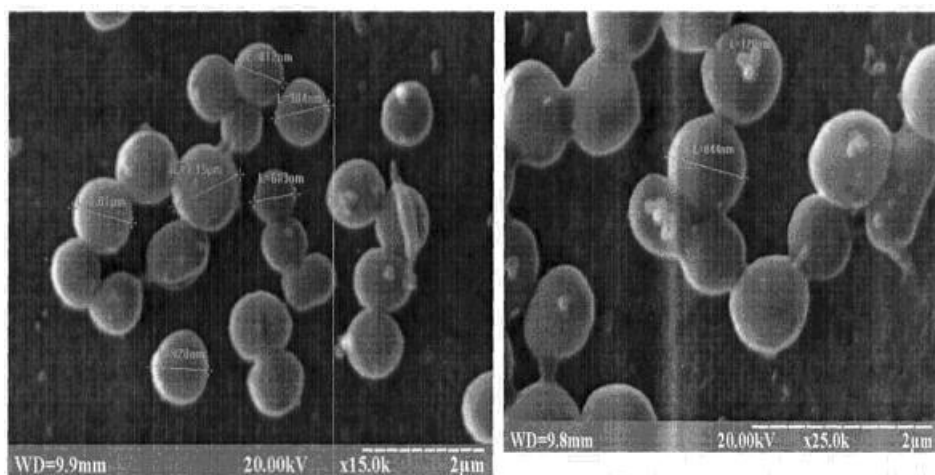
30 Спосіб фіксації мікроорганізмів з використанням фіксатора Трупса 4F:1G для їх дослідження під растровим електронним мікроскопом, який **відрізняється** тим, що центрифугування змивів добової культури мікроорганізмів, отриманої на щільному живильному середовищі, здійснюють протягом 5 хвилин при 3000 обертах для утворення концентрованого осаду із мікроорганізмів, з

35 наступним їх дво-триразовим обробленням фіксатором Трупса 4F:1G та витримкою в різних концентраціях етилового спирту за відповідною схемою, за його використання зменшується час фіксації зразків до 1-2 годин (на відміну від 3-4 годин при використанні лише самого глутаральдегіду), при цьому якість досліджуваних об'єктів не погіршується, зафіксовані даним способом культури мікроорганізмів можна зберігати у фіксаторі Трупса 4F:1G до 6 місяців без

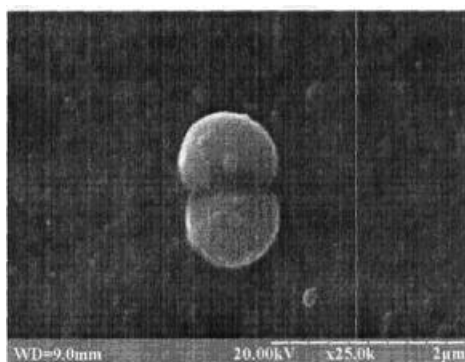
40 змін морфологічних властивостей мікроорганізмів.



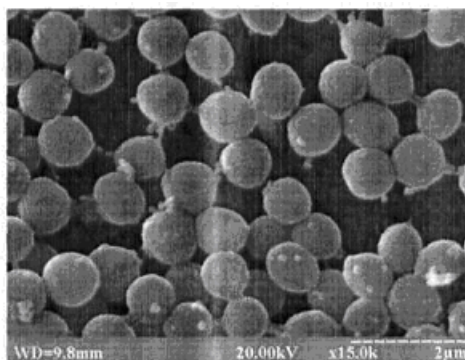
фіг. 1



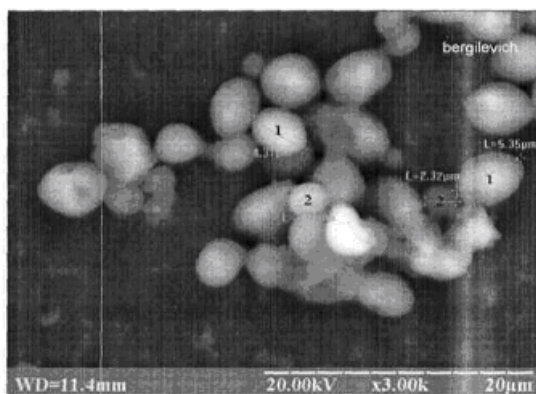
фиг.2



фиг.3



фиг.4



фiг.5

---

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601