

I. СУЧАСНІ АСПЕКТИ БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

МЕТОДИКА ПІДГОТОВКИ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТОДОМ РАСТРОВОЇ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ

**Бергілевич О. М.¹, Івченко В. Д.², Шубін П. А.¹, Буцик А. С.¹,
Ткаченко А. В.¹, Бедредінова В. О.¹**

o.bergylevyich@med.sumdu.edu.ua, ivchenkovd@gmail.com p.shubin@med.sumdu.edu.ua,
a.butsyk@med.sumdu.edu.ua

¹Сумський державний університет

²Сумський національний аграрний університет

Вступ. Растровий електронний мікроскоп (РЕМ) – це прилад, призначений для дослідження поверхні об'єктів, принцип роботи якого полягає в опроміненні досліджуваної області зразка тонко сфокусованим пучком електронів. На сьогодні електронні мікроскопи є важливою складовою багатьох передових лабораторій. Їх використовують для дослідження біологічних зразків, найдрібніших мікроорганізмів, молекул, клінічних препаратів в цитології, клітинній та молекулярній біології, мікробіології. Растрова мікроскопія, на відміну від світлової, дозволяє виявити найдрібніші клітинні структури [3; 4]. Крім того останнім часом РЕМ застосовують для діагностики і визначення елементного складу клітин, тканин та інших об'єктів. Він дозволяє встановити лінійні розміри субмікронного діапазону та масову частку елементів методом рентгенівського мікроаналізу. РЕМ використовують для дослідження об'єктів різних за походженням – як органічних, так і не органічних.

Важливим етапом під час дослідження методом електронної мікроскопії є підготовка проб. Методика підготовки об'єктів для дослідження РЕМ вклю-чає конкретні етапи, проте може відрізнятися залежно від походження об'єкту, що досліджується. Аналіз літературних джерел показав, що описані методики підготовки зразків мікробіологічного походження різняться між собою.

Метою даної роботи є детальний опис використаної нами методики підготовки мікробіологічних зразків для дослідження методом растрової електронної мікроскопії.

Основна частина. Описані методики підготовки мікробіологічних об'єктів включають етапи, ідентичні з етапами підготовки об'єктів еукаріотичних клітин, за виключенням більшої сили центрифугування (5 хвилин при 2 тис. обертів) та довшого часу фіксації (24-48 годин) [1].

Відмінністю використаної методики від попередніх аналогів є подвійна фіксація зі зменшеним часом – 45 хвилин кожна.

Основними етапами підготовки мікробіологічних об'єктів для вивчення за допомогою РЕМ є:

- 1) отримання культури мікроорганізму;
- 2) фіксація досліджуваного об'єкта;
- 3) відмивка об'єкта від фіксатора;
- 4) зневоднення об'єкта;
- 5) нанесення досліджуваного об'єкта на предметний столик;
- 6) напилення шару електропровідної речовини.

Отримання культури мікроорганізму. Для дослідження мікроорганізмів використовували добові культури клітин. Доцільніше використовувати культури, вирощені у пробірках зі скошеним щільним поживним середовищем. Клітини мікроорганізмів змивають з поверхні поживного середовища невеликою кількістю дистильованої води.

Фіксація досліджуваного об'єкта. Для фіксації зразка використовують 2,5 % глутаральдегід на фосфатному буферному розчині. Головною вимогою до буфера є відповідність його рН до рН досліджуваного зразка (табл. 1). У дослідженні був використаний фосфатний буфер – $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ – слабка кислота/сполучена основа). Така буферна система утворена сумішшю двох солей багатосировної кислоти, що відповідають різним стадіям її нейтралізації [2].

На практиці для приготування буферного розчину використовують кристалогідрати солей NaH_2PO_4 та Na_2HPO_4 . Тому для отримання кінцевих розчинів необхідно розчинити деяку кількість цих сполук у 100 мл дистильованої води. Маса, речовини, яка необхідна, залежить від вмісту води у кристалогідраті. Так, для NaH_2PO_4 необхідно використати 2,76 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; або 3,12 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Для Na_2HPO_4 необхідно використати 2,84 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; або 5,36 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; або 7,17 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

Таблиця 1

**Співвідношення між NaH_2PO_4 та Na_2HPO_4
для отримання необхідного значення рН**

рН	NaH_2PO_4 , мл	Na_2HPO_4 , мл
7,0	39,0	61,0
7,2	28,0	72,0
7,4	19,0	81,0
7,6	13,0	87,0
7,8	8,5	91,5

Мікроорганізми, змиті у пробірку з поверхні живильного середовища, центрифугують, зливають надосадову рідину, додають фіксатор у співвідношенні 1:10 і суспензують вміст пробірки. Витримують фіксатор 45 хвилин після чого центрифугують і зливають надосадову рідину. Повторну фіксацію проводять так само, як і попередню.

Відмивка об'єкта від фіксатора. Зразки відмивають від фіксатора буферним розчином, який додають у співвідношенні 1:10. Вміст пробірки суспензують, витримують 5 хвилин, центрифугують і зливають надосадову рідину. Доцільніше повторити відмивку двічі.

Зневоднення об'єкта. Для зневоднення зразка використовують серію розчинів етилових спиртів зростаючої концентрації (30 %, 50 %, 70 %, 96 %, 100 %). Почергово до 1 мл культури клітин додають 9 мл спирту, суспензують, центрифугують, зливають надосадову рідину і додають спирт наступної концентрації. У спиртах концентрації 30 %, 50 %, 70 % зразок витримують 10 хвилин, у спиртах концентрації 96 %, 100 % – 15 хвилин. Зневоднення спиртом концентрації 100 % проводиться двічі.

Нанесення об'єкта на предметний столик. Готові зразки наносять на предметній столик, що являє собою металеву підставку. Безпосередньо на нього наклеюють двосторонню вуглецеву стрічку. До стрічки прикріплюють графітову підложку, на яку наносили краплю досліджуваного зразка.

Напилення шару електропровідної речовини. Зафіксований зразок напилюють тонким шаром графіту, використовуючи вакуумний універсальний пост ВУП-5 («СЕЛМІ», Україна).

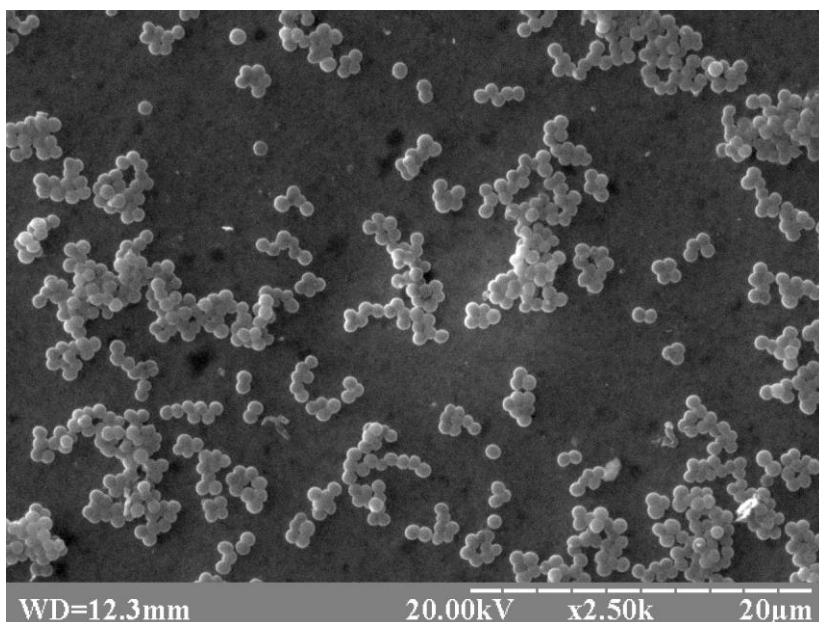


Рис. 1. Колонії *Staphylococcus aureus* при дослідженні РЕМ.

Обговорення результатів. Описана вище методика була використана для дослідження *Staphylococcus aureus*. У ході дослідження були отримані чіткі зображення клітин (рис. 1), а зменшення часу фіксації дозволило скоротити хід дослідження.

Висновок. Таким чином, використана нами видозмінена методика є ефективною та більш швидкою порівняно з аналогами. Використання цієї методики дозволило отримати чіткі зображення бажаних об'єктів та дослідити морфологічну структуру організмів мікробіологічного походження.

Список використаних джерел

1. Electron Microscopy: Methods and Protocols. Second Edition, edited by John Kuo. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 2007. P. 11–18.
2. Кравченко С. А. Фиксирующие растворы в электронно-микроскопическом исследовании тканей легких // Український журнал клінічної та лабораторної медицини, 2011. С. 139–143.
3. Методы исследования в микробиологии : учеб.-метод. пособие / Ж. Г. Шабан [и др.]. Минск : БГМУ, 2010. 124 с.
4. Электронная микроскопия в цитологических исследованиях: методическое пособие / Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2013. 85 с.

ВЛИЯНИЕ ЭТИОЛЯЦИИ НА РИЗОГЕНЕЗ СОРТОВ ВИШНИ И КЛОНОВОГО ПОДВОЯ ЯБЛОНИ *IN VITRO*

Викс Т. Н.¹, Шапорева В. А.², Деревинский А. В.³

tania_gavrilenko@mail.ru¹, viktorija_shaporeva@mail.ru², derevin@rambler.ru³

Белорусский государственный педагогический университет
имени Максима Танка

Этиоляция вызывает ювенилизацию тканей *in vitro* растений, что часто является причиной легкости ризогенеза микрочеренков. Этиоляция стимулирует рост и растяжение клеток и индуцирует закладку корней, повышая уровень эндогенных ауксинов и предотвращая их разрушение под действием света [1]. Количество корней первого порядка значительно влияет на дальнейшее укоренение растений, увеличивая их способность к выживанию в условиях *ex vitro* [2–4].

По литературным данным для трудноукореняемых культур рекомендуют использовать темновой период на начальном этапе укоренения растений *in vitro*. Его продолжительность зависит от культуры и колеблется от 3–5 дней до 4 недель [5].

Целью исследования было изучение влияния этиоляции на корнеобразование шести сортов вишни и клонового подвоя яблони 54-118 в условиях *in vitro*.

Объектами исследования являлись растения вишни следующих сортов: Гриот белорусский, Ливенская, Ровесница, Вянок, Ласуха, Новодворская; клоновый подвой яблони 54-118.