

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ МЕТОДОМ РАСТРОВОЇ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ

Т. І. Фотіна, доктор ветеринарних наук, професор (tif_ua@meta.ua)

Сумський національний аграрний університет (м. Суми)

А. Г. Левченко, кандидат ветеринарних наук (AnnLevchenko22.12@gmail.com)

Сумський національний аграрний університет (м. Суми)

В. Д. Івченко, кандидат технічних наук (ivchenkovd@gmail.com)

Сумський національний аграрний університет (м. Суми)

Наведена методика підготовки Staphylococcus aureus для дослідження растровим електронним мікроскопом. Підібрано оптимальний час контакту зразків мікроорганізмів з фіксуєчими реагентами, параметри центрифугування та схема зневоднення, що дозволяє отримати якісні електронномікроскопічні зображення при мінімізації затрат часу на пробопідготовку.

Ключові слова: Staphylococcus aureus, електронна мікроскопія, глутаральдегідний фіксатор, центрифугування, зневоднення, растровий електронний мікроскоп.

Актуальність обраної теми. Електронна мікроскопія є однією з базових методик сучасної мікробіології. Суттєвою перевагою цього методу досліджень перед класичною оптичною мікроскопією є можливість отримання досконалих зображень завдяки на порядки вищому діапазону збільшень, розподільчій здатності приладу та глибині фокусу [1, 3]. Растровий (скануючий) електронний мікроскоп дозволяє зафіксувати чітку та об'ємну форму окремих бактеріальних клітин та колоній мікроорганізмів у вигляді цифрового фото. Скориставшись програмним забезпеченням електронного мікроскопа, або спеціальними комп'ютерними програмами для обробки цифрових зображень, можна виконувати різноманітні вимірювання в площині дослідження та вести статистичну обробку даних з високою достовірністю [1, 2, 5].

До недоліків методу електронної мікроскопії можна віднести неможливість прижиттєвого дослідження мікроорганізмів та трудоемкість і тривалість процесу підготовки проб. Отже, перед дослідником постає дуже відповідальна задача – перевести живу бактеріальну клітину у стабільний стан та зафіксувати її молекулярні структури без внесення

спотворень і артефактів, які можуть привести до хибного тлумачення результатів експерименту. Не менш важливою задачею є дотримання балансу між затратами часу на підготовку зразків та необхідністю отримання якісних РЕМ-зображень. В різних літературних джерелах наводиться час фіксації біологічних зразків від 5 до 24 год, а іноді і більше в залежності від обраної методики [1, 4, 6]. З іншого боку, загальновідоме правило: чим дрібніший об'єкт дослідження, тим менша тривалість фіксації і кількість фіксуючих реагентів.

Із загального числа культур бактерій, виділених із проб молока хворих на клінічний серозний і субклінічний мастит корів господарств, більшу частину склали культури *Staphylococcus aureus* – у 60 % та 33 %, *Streptococcus agalactiae* – у 26,6 % та 20,1 %, *Escherichia coli* – у 13,4 % та 13,3 % випадків, відповідно. У пробах молока від хворих на клінічний серозний і субклінічний мастит корів із особистих селянських господарства були виділені ті ж мікроорганізми: *Staphylococcus aureus* – у 100 % та 80 %, *Escherichia coli* – у 80 % та 100 %, *Streptococcus agalactiae* – у 60 % та 80 % випадках, відповідно [7, 8]. Таким чином, *Staphylococcus aureus* найпоширеніший збудник маститів бактеріальної етіології.

Staphylococcus aureus здатний синтезувати ряд ферментів (каталазу, плазмокоагулазу), які підсилюють його патогенність, гіалуронідазу, яка посилює його адгезивні властивості. Крім того, золотистий стафілокок містить на своїй поверхні протеїн А, завдяки чому здатний чинити опір фагоцитозу і володіє здатністю не піддаватися лізису всередині фагоцитів. Стафілококи мають різноманітні антигени, які локалізовані в основному в клітинній стінці, вони продукують кілька видів токсинів (гістіотоксин, гемотоксин, ентеротоксин, лейкоцидин), які мають різнобічну дію на організм, що викликають як місцеве нагноєння, так і зараження крові. Токсини стафілококів мають білкову природу, є повноцінними антигенами, на які утворюються імунні реакції. Ентеротоксин накопичується в молоці, викликаючи стафілококову інфекцію та отруєння організму продуктами життєдіяльності мікроба. Стафілококи дуже важко ліквідувати через їх антибіотикостійкість і здатність паразитувати всередині клітин. Найчастіше цей мікроб зустрічається при субклінічній формі маститів, що створює небезпеку потрапляння золотистих стафілококів у молоко [7, 8].

Отже, сучасна електронна мікроскопія перебуває у стані постійного розвитку, випробовуються і впроваджуються все нові методи пробопідготовки для електронно-мікроскопічних досліджень.

Ці актуальні питання і визначили вибір напрямів наших досліджень та методи виконання роботи.

Мета роботи: Модифікувати загальноприйнятну методику підготовки мікроорганізмів (на прикладі *Staphylococcus aureus*) для растрової електронної мікроскопії, зокрема

встановити оптимальний час контакту зразків з фіксуючими реагентами, підібрати ефективну схему хімічного зневоднення, а також оптимальні параметри центрифугування (тривалість та кількість обертів).

Матеріали і методи досліджень: Для дослідження використовували культуру *Staphylococcus aureus*, що була виділена від корів, хворих на клінічний серозний та субклінічний мастит.

Підготовка культури *Staphylococcus aureus*. Стандартні розведення культури, що вивчались, готували за схемою: спочатку робили висіви на МПА, витримували у термостаті за температури 37 °С 16 – 18 год. До стерильної дистильованої води вносили добре ізольовану колонію мікроорганізмів і за стандартом мутності 0,5 ОД McFarland визначали концентрацію мікробних клітин в 1 см³ [4]. Концентрація в 1 см³ *Staphylococcus aureus* становила 49,0±0,2 КУО/см³. Концентрацію мікроорганізмів визначали шляхом висіву десятикратних розведень суспензії культури на МПА.

Зразки для електронномікроскопічного дослідження готували за стандартною методикою [1, 3], яка включала: забір клітинного матеріалу; фіксацію мікроорганізмів; відмивку від фіксатора; хімічне зневоднення. Після контакту з кожним розчином суспензії мікроорганізмів відцентрифугували. Модифікація методики полягала у підборі мінімального часу фіксації, достатнього для отримання якісних РЕМ-фотографій, доступної схеми хімічного зневоднення та оптимальних параметрів центрифугування.

Результати досліджень та їх обговорення:

I. Забір матеріалу для досліджень проводили шляхом змиву культури *Staphylococcus aureus* з поживного середовища дистильованою водою. Після центрифугування надосадову рідину зливали, залишаючи суспензію клітин, об'ємом близько 1 см³.

II. Фіксація мікроорганізмів. В якості фіксатора обрали глутаровий альдегід на фосфатному буфері Міллоніга. Це широкоживий фіксуючий реагент, який вирізняється швидким проникненням та найкращою стабілізацією морфологічних структур в клітинах за рахунок "зшивання" білкових полімерів, що входять до складу клітинних мембран.

В день експерименту готували розчин для фіксації: 8 см³ 25 %-го глутаральдегіду + 32 см³ 2,26 %-го розчину дигідрофосфату натрію (NaH₂PO₄ · 2H₂O). Далі по краплинах додавали 2,52 %-ий розчин гідроксиду натрію (NaOH) до досягнення рН 7,2 – 7,4. Загальний об'єм фіксуючої суміші доводили дистильованою водою до 50 см³. Суспензію культури *Staphylococcus aureus* змішували з отриманим розчином фіксатора у класичному співвідношенні 1:10.

Для встановлення оптимального часу фіксації досліджувані зразки розділили на дві групи. В першій групі сумарний час фіксації складав 3 год з потрійною зміною фіксатора через кожну годину. В другій групі сумарний час фіксації складав 1 год і 30 хв, заміну фіксатора здійснювали через 45 хв. Під час фіксації розчини періодично суспендували легким струшуванням пробірок. Після кожної зміни фіксатору розчини відцентрифугували та зливали надосадову рідину. Наступне дослідження растровим електронним мікроскопом не виявило суттєвої різниці у якості зображення зразків першої та другої групи. Це може бути підставою для рекомендації скоротити загальний час фіксації до 1 год 30 хв, що пов'язано з невеликими розмірами бактеріальних клітин.

III. Встановлення параметрів центрифугування проводили експериментально в режимах роботи центрифуги: 1500, 2000 та 3000 обертів/хв. Час, необхідний для осадження мікроорганізмів, контролювали за візуальними ознаками щільності отриманої суспензії в діапазоні від 7 до 3 хв. Відомо, що інтенсивний механічний вплив може призвести до порушення цілісності досліджуваних клітин або їх деформації, що вносить небажані артефакти. Тому важливо було підібрати максимально м'який режим осадження за оптимальний проміжок часу. Дослідженням встановлено, що використання режиму в 3 тис. обертів/хв. є недоцільним, так як може призводити навіть до розриву скляних центрифужних пробірок. Як оптимальний ми обрали режим центрифугування у 1500 обертів/хв. тривалістю 5 хв.

IV. Відмивку від фіксатора виконували по завершенню часу контакту з розчином глутаральдегіду. Відцентрифуговану суспензію заливали у співвідношенні 1:10 фосфатним буферним розчином, приготованим змішуванням 2,26 %-го розчину дигідрофосфату натрію ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) та 2,52 %-го розчину гідроксиду натрію (NaOH) до рН 7,2 – 7,4. Витримували 15 хв, періодично суспензували, потім осаджували в центрифугузі, надосадову рідину зливали.

V. Зневоднення об'єкту дослідження – важливий етап підготовки зразків, так як навіть залишкова кількість води неминуче призведе до розриву клітин у вакуумі об'єктивної камери електронного мікроскопа. Відомі методики видалення вологи з біологічних зразків шляхом сушки у критичній точці, ліофільна сушка, висушування у вакуумі. Однак для реалізації даних методів необхідне спеціальне високовартісне обладнання. Більш доступним виявляється хімічне зневоднення з використанням водовіднімаючих реагентів, таких як ацетон, діетиловий ефір, камфен, ізопропіловий спирт, етиловий спирт тощо. Саме етиловий спирт зростаючої концентрації ми обрали для виконання процедури дегідратації як найменш токсичний але достатньо ефективний реагент.

Проводку по серії етилових спиртів почали з 50%-го розчину, щоб унеможливити механічне пошкодження клітини мікроорганізмів через різку зміну поверхневого натягу у більш концентрованому спиртовому розчині. Дотримувалися співвідношення об'ємів суспензії мікроорганізмів до дегідруючого розчину 1:10, витримували 5 хв, далі центрифугували в обраному вище режимі. Після зливання надосадової рідини, аналогічно повторювали процедуру зневоднення з 60 %, 70 %, 80 %-ми розчинами етилового спирту. Далі у співвідношенні 1:10 вносили 96 %-ий етиловий спирт – витримували 15 хв. Після центригування у тому ж співвідношенні вносили абсолютний (100 %-ий) спирт на 15 хв. Зневоднення абсолютним спиртом повторювали двічі. Після останнього центрифугування залишали невелику кількість надосадової рідини для отримання суспензії. Краплинку суспензії переносили бактеріальною петлею на металічний предметний столик із закріпленою двобічною вуглецевою стрічкою. Сушка зразка проходила на повітрі.

VI. Надання зразкам електропровідності здійснювали шляхом напилення сріблом у вакуумному універсальному пості "ВУП – 5М".

VII. Електронномікроскопічне дослідження культури *Staphylococcus aureus* виконували на приладі "РЭМ – 106 И" (ВАТ Selmy, 2007).

За допомогою електронної мікроскопії встановили розмір і форму *Staphylococcus aureus*.

При мікроскопії за електронною мікроскопією стафілококи формували скупчення у вигляді грона винограду, розміри і форма відповідали показникам цього виду мікроорганізму. На поверхні скупчень чітко видно окремі клітини кулястої форми, які пов'язані з клітинами глибоких шарів (рис. 2).

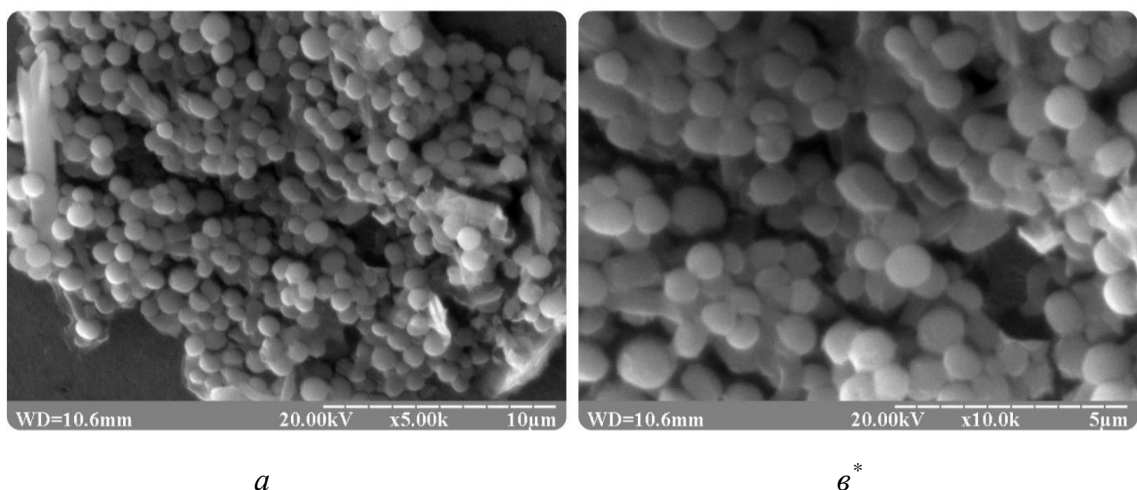


Рис. 2. РЕМ – зображення колоній *Staphylococcus aureus*

Примітка: * – *a* загальний час фіксації – 3 год (збільшено у 5 тис. разів); *в* – загальний час фіксації – 1,5 год (збільшено у 10 тис. разів).

Висновки: 1. Модифікована методика підготовки зразків *Staphylococcus aureus* для дослідження растровим електронним мікроскопом дозволяє зменшити час контакту з глутаральдегідним фіксатором до 1 год 30 хв, що суттєво знижує тривалість процесу пробопідготовки.

2. Підібрані параметри центрифугування у 1,5 тис. обертів на хвилину протягом 5 хв при умові, що початковий об'єм взятої для дослідження культури мікроорганізмів складає близько 1 см³, дозволяє уникнути механічних пошкоджень клітини.

3. Запропонована схема зневоднення у серії етилових спиртів зростаючої концентрації: 50% (5') → 60% (5') → 70% (5') → 80% (5') → 96% (15') → 100% (15') → 100% (15'), є доступним для виконання та ефективним методом повної дегідратації зразків.

Перспективи подальших досліджень: полягають у вивченні морфологічної структури наступних мікробіологічних об'єктів та удосконаленні методики під них.

Список використаної літератури:

1. Салига Ю. Т., Снітинський В. В. Електронна мікроскопія біологічних об'єктів. – Львів: Світ, 1999. – С. 152.
2. Пиз Д. Гистологическая техника в электронной микроскопии. – М. Изд-во иностр. лит. 1962. – С. 676 – 682.
3. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. – М.: Мир, 1975. – 276 – 279 с.
4. Микробиологические и вирусологические исследования в ветеринарной медицине : справочное пособие / А. Н. Головкин, В. А. Ушкалов, В. Г. Скрыпник, Б. Т. Стегний и др.; под ред. А. Н. Головкин. – Харьков: НТМГ, 2007. – С. 23 – 44.
5. Agar A. W. The story of European commercial electron microscopes // Mulvey T. (ed) The Growth of electron microscopy. – 1996. – P. 30 – 34.
6. Микроскопическая техника: Руководство / под ред. Д. С. Саркисова и Ю. Л. Перова. – М.: Медицина, 1996. – с. 247 – 250.
7. Левченко А. Г. Особливості прояву маститу у корів у господарствах з різними технологіями та розробка комплексних профілактично-лікувальних заходів: дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук: спец. 16.00.03 "Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія інфекційні хвороби та імунологія" / А. Г. Левченко. – Київ, 2015. – 20 с.
8. Краевский А. И. Бактериальный мастит у коров : монография / А. И. Краевский, М. В. Рубленко, Г. П. Дюльгер. – Сумы, 2014. – С.12 – 29.

Т. Фотина, А. Левченко, В. Ивченко ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Приведена методика подготовки Staphylococcus aureus для исследования растровым электронным микроскопом (РЭМ – 106 И). Подобрано оптимальное время контакта образцов микроорганизмов с фиксирующими реагентами, параметры центрифугирования и схема обезвоживания, что позволяет получить качественные электронно-микроскопические изображения при минимизации затрат времени на пробоподготовку.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus, электронная микроскопия, глутаральдегидный фиксатор, центрифугирование, обезвоживание, растровый электронный микроскоп.*

T. Fotina, A. Levchenko, V. Ivchenko THE METHOD OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS PREPARATION FOR THE ELECTRON MICROSCOPE (SEM 106 I) RESEARCH HAS BEEN DONE

The method of Staphylococcus aureus preparation for the electron microscope (SEM 106 I) research has been done. The optimum contact time for microorganisms samples with fixing reagents, centrifugation options, the method of dehydration have been chosen. It allows to get qualitative electron microscopic images while minimizing the sample preparation time.

Key words: *Staphylococcus aureus, electron microscopy, glutaraldehyde fixation, centrifugation, dehydration, scanning electron microscope.*