

(12) **PATENT**

(21) Številka prijave: **201400306**

(51) Int. Cl. (2015.01)

(22) Datum prijave: **08.09.2014**

C12M 1/00

C12M 3/00

B01L 3/00

C12Q 1/00

(45) Datum objave: **31.03.2016**

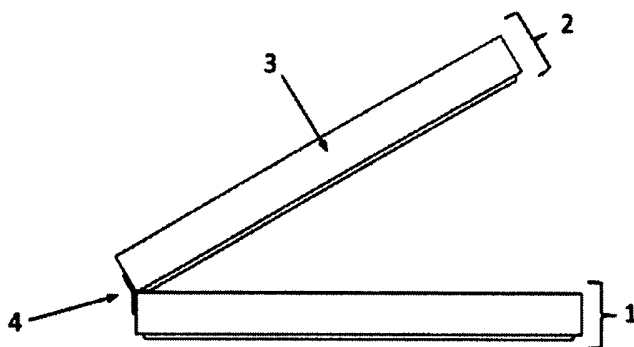
(72) Izumitelj: **Istenič Simon, 1433 Radeče, SI**

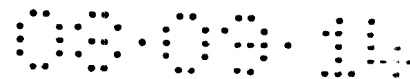
(73) Imetnik: **Istenič Simon,
Ulica OF 21, 1433 Radeče, SI**

(54) **NOSILEC, KI OMOGOČA KONTINUIRNO SPREMLJANJE BAKTERIJ NA TRDNIH GOJIŠČIH Z UPORABO SPEKTROFOTOMETRIČNIH ČITALCEV**

(57) Nosilec omogoča sterilno gojenje bakterij na trdnih gojiščih in hkratio spremljanje spektrofotometričnih lastnosti po vsej svoji površini. Nosilec je narejen iz dveh enakih delov. Spodnji del (1) služi za vlivanje trdnega gojišča, zgornji del (2) pa kot pokrov, ki omogoča sterilno

gojenje in namestitev paropropustnega filma na rob (3) na način, da ne ovira spektrofotometričnih meritev. Spodnji del (1) je z zgornjim (2) povezan s pomočjo pregibne folije (4) prilepljene na rob, ki omogoča enostavnejše zapiranje in odpiranje nosilca.





ISTENIČ Simon

Ulica OF 21,

1433 Radeče

NOSILEC, KI OMOGOČA KONTINUIRNO SPREMLJANJE BAKTERIJ NA TRDNIH GOJIŠČIH Z UPORABO SPEKTROFOTOMETRIČNIH ČITALCEV

Področje tehnike: Biologija

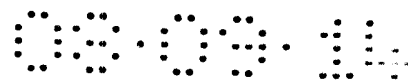
Predmet izuma je nosilec za spektrofotometrično spremljanje bakterijskih kolonij oziroma natančneje nosilec, ki omogoča sterilno gojenje in spremljanje rasti bakterijskih kolonij, na primer bakterijske kemotakse ali širjenje bakteriofagnih plakov znotraj standardnih spektrofotometričnih čitalcev mikrotitrskih plošč.

Tehnični problem, ki ga rešuje izum je nosilec v katerem je moč pripraviti trdno gojišče in v njem sterilno gojiti bakterije. Hkrati pa nosilec omogoča spektrofotometrično merjenje optičnih lastnosti po vsej svoji površini tudi z uporabo standardiziranih čitalcev mikrotitrskih plošč. Nosilec je narejen tako, da omogoča enostavno sterilno rokovanje ter namestitev paropropustnega filma. Poleg tega je pod nosilec mogoče namestiti matriko, ki omogoča lažji nanos vzorcev in kasnejšo lokalizacijo le-teh.

Nosilec torej omogoča merjenje hitrosti ter smeri povečevanja bakterijskih kolonij ali bakteriofagnih plakov s pomočjo spektrofotometričnih naprav in s tem omogoča njihovo natančno kvantifikacijo.

Nosilcev za spektrofotometrično merjenje je precej. Na primer nosilci pod patentnimi prijavami WO1998035013 A1, WO1998031466 A1 ali US5972694 A. Večina jih je narejena tako, da imajo po svoji površini številne vzorčne jamice, v katerih je mogoče izvajati različne spektrofotometrične meritve.

Takšni nosilci pa so omejeni na merjenje spektrofotometričnih lastnosti tekočine in ne omogočajo gojenja bakterij na trdnih gojiščih.



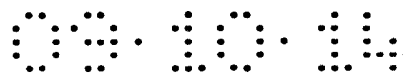
Pri klasičnih tehnikah merjenja bakterijske kemotakse, to je zmožnost zaznavanja in premikanja bakterij v smeri kemijskega gradienta ali širjenja bakteriofagnih plakov, so rezultati zelo odvisni od opazovalčeve subjektivne ocene. Opazovalec po določenem času inkubacije oceni velikost in obliko kolonij ali plakov ter na ta način določi lastnosti posameznih vzorcev. Problem nastane, ko s prostim očesom ne moremo zaznati in pravilno oceniti do kam sega oblak bakterij ali do kam se širi plak. Poleg tega so lahko oblike bakterijskih kolonij ali plakov zelo zapletene in v več nivojih s čimer se zmožnost opazovalčeve ocene še poslabša. Velikokrat se tudi zgodi, da zaradi predolge ali prekratke inkubacije opazovalec zamudi pomembne spremembe v morfologiji kolonij ali plakov.

Bistvena prednost predmeta izuma pa je v tem, da nosilec omogoča kontinuirno gojenje in spremljanje bakterij v samem spektrofotometričnem čitalcu. Na ta način se prepreči, da bi zamudili pomembne morfološke spremembe, hkrati pa lahko z uporabo spektrofotometričnih meritev natančno izmerimo hitrost, debelino, morfologijo in smer premikanja bakterijskih kolonij in plakov ter s tem zaobidemo subjektivno ocenjevanje opazovalca. Poleg tega lahko s spektrofotometričnimi meritvami opazujemo nekatere druge lastnosti bakterij. Na primer fluorescenco ali luminiscenco, ki jo s prostim očesom ni mogoče zaznati. Pomembna prednost pri poskusih z bakteriofagi je tudi v tem, da lahko s pomočjo nosilca kontinuirno spremljamo rast gostiteljskih bakterij v trdnem gojišču in na podlagi rastne krivulje določimo koncentracijo gostiteljskih bakterij, ki so bile v danem trenutku na voljo bakteriofagom česar pri klasičnih tehnikah ni mogoče določiti. S tem nam nosilec omogoči vnos dodatnega parametra v pomoč preučevanja bakteriofagov.

Izum bo opisan na dveh izvedbenih primerih in sliki, ki prikazuje:

Skica 1: Slika 1 prikazuje stranski ris enote nosilca, Slika 2 prikazuje tloris enote nosilca, Slika 3 prikazuje detajle enote nosilca ter Slika 4 prikazuje pritrditev dveh enot nosilca v končni nosilec.

Nosilec je sestavljen iz dveh enakih delov, ki služita različnjima namenoma. Spodnji del (1) služi za vlivanje trdnega gojišča, zgornji del (2) pa kot pokrov, ki omogoča sterilno gojenje bakterijskih vzorcev in namestitev paropropustnega filma na rob (3) na način, da ne ovira spektrofotometričnih meritev. Spodnji del (1) je s pokrovom



(2) povezan s pomočjo pregibne folije (4) prilepljene na rob, ki omogoča enostavnejše zapiranje in odpiranje nosilca. Nosilec je narejen iz prozorne plastike, ki prepušča ultravijolično svetlobo in je primerna za spektrofotometrične meritve.

Izvedbeni primer 1:

V nosilec smo vlili standardno King's B gojišče z 0,3% agarjem. Ko se je gojišče v nosilcu strdilo smo na različne točke nanesti 1 μ L suspenzije bakterij *Ralstonia solanacearum* NIB Z-30. Nosilec smo vstavili v napravo BioTek™ NEO s pomočjo katere smo ob konstantni temperaturi 30°C tri dni kontinuirno spremljali optično gostoto po celotni površini nosilca.

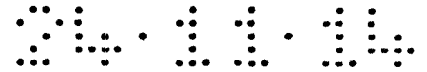
Po končani inkubaciji smo nastalim kolonijam iz pridobljenih podatkov izračunali posamezne parametre.

Bakterije so se sprva, do razdalje 3,2 mm od mesta nacepitve, širile s hitrostjo 2,0 mm/dan. Nato se je bakterijam hitrost rasti do razdalje 7,1 mm povečala na 9,7 mm/dan ter kasneje do razdalje 9,5 mm znižala na 6,3 mm/dan. Spreminjanje koncentracije bakterij v odvisnosti od časa za eno kolonijo je prikazano na Skici 2, Slika 5.

Izvedbeni primer 2.

V nosilec smo vlili homogeno suspenzijo rastlinskih patogenih entero bakterij v gojišču LB Luria z 0,3% agarjem. Ko se je suspenzija strdila smo na površino nanesti različne redčitve suspenzij neznanih bakteriofagov (Skica 3, A: Neredčena suspenzija, B: 100-krat redčena suspenzija in C: 10 000-krat redčena suspenzija bakteriofagov). Nosilec smo prenesli v napravo Synergy MX ter 34 h kontinuirno merili optično gostoto po celotni površini.

Po obdelavi pridobljenih podatkov smo lahko s spreminjanjem različnih parametrov poustvarili podobe nastalih plakov (Skica 3, Slike 6, 8 in 10). Določili in izmerili smo lahko cono inhibicije (Skica 3, Slika 6 in 7) ter območje popolne in delne inhibicije (Skica 3, Slika 8) ter iz podatkov izračunali katera koncentracija bakteriofagne suspenzije (A, B ali C) kaže najboljše iskane lastnosti (Skica 3, Slika 9). S spreminjanjem parametrov je bilo mogoče tudi opaziti nastale kolonije na bakteriofage odpornih bakterij (Skica 3, Slika 10, puščica). Iz podatkov je bilo mogoče tudi izračunati hitrosti širjenja plakov (Skica 3, Slika 11).

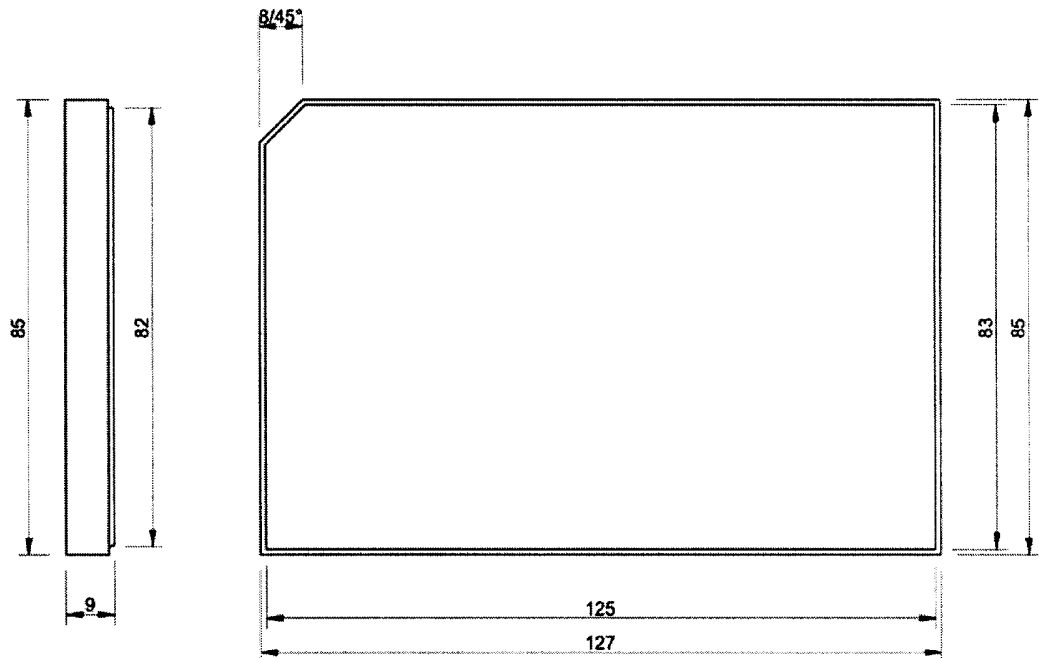


PATENTNI ZAHTEVKI

1. Nosilec, ki omogoča kontinuirno spremljanje bakterij na trdnih gojiščih z uporabo spektrofotometričnih čitalcev,

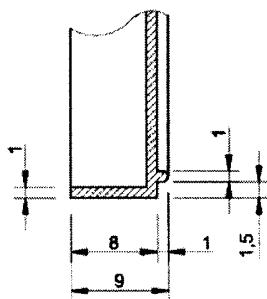
označen s tem,

da je sestavljen iz dveh enakih delov, ki sta med seboj povezana s pregibno folijo (4); spodnji del (1) služi za vlivanje trdnih gojišč, zgornji del (2) pa služi kot pokrov z robom (3), ki omogoča namestitvev paropropustnega filma.

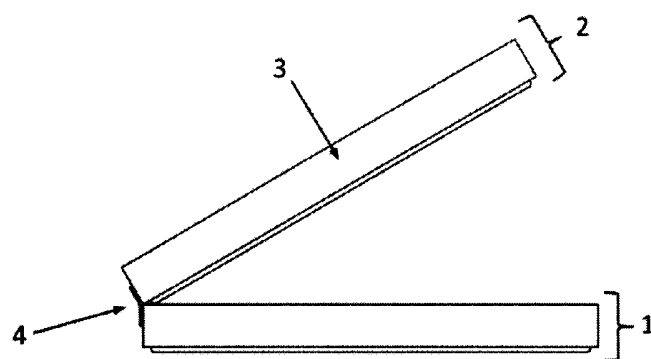


Slika 1

Slika 2

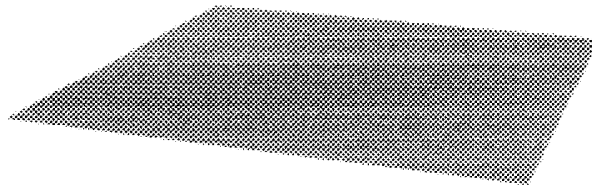


Slika 3

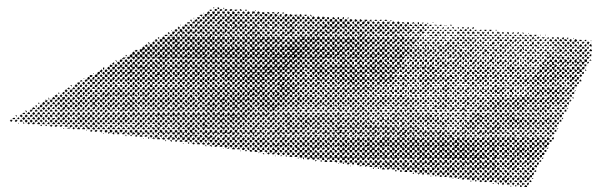


Slika 4

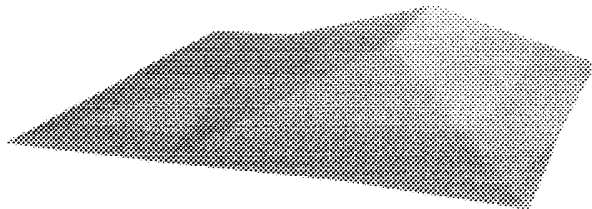
34 h



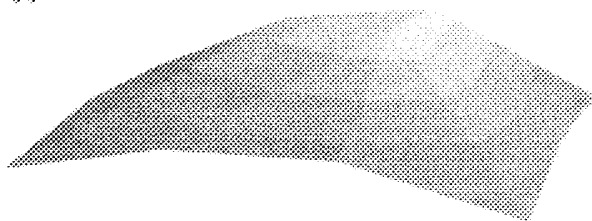
40 h



48 h



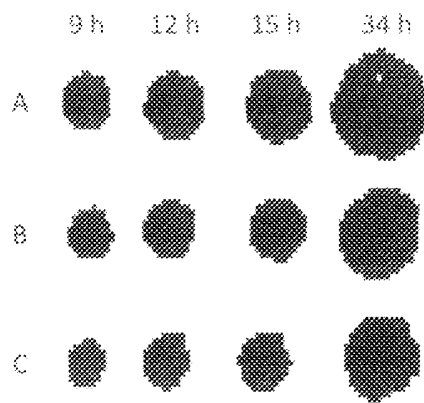
60 h



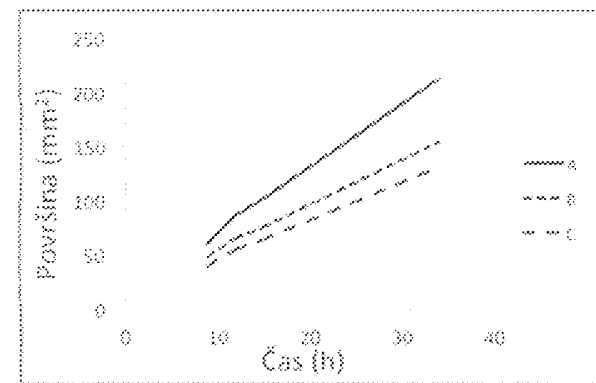
Slika 5

Skica 2

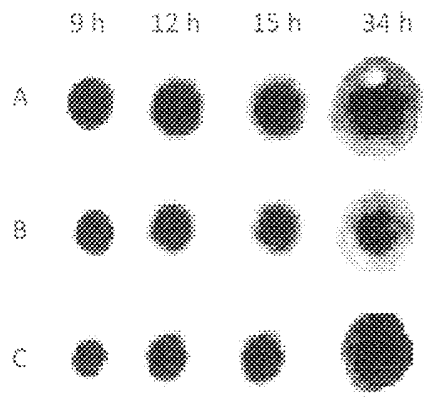
Slika 6



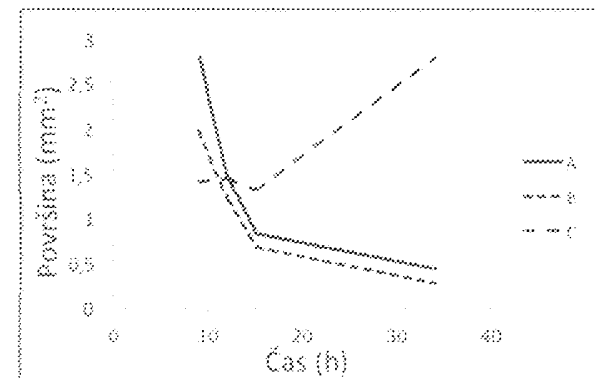
Slika 6



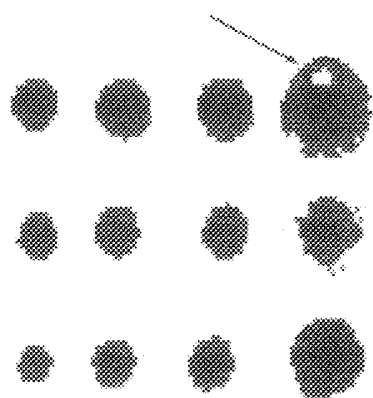
Slika 7



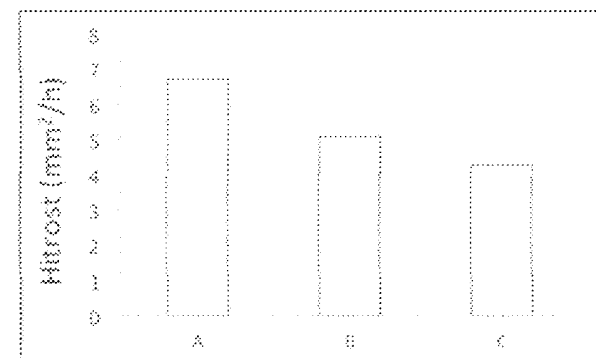
Slika 8



Slika 9



Slika 10



Slika 11