



**MYCOTHECA UNIVERSITATIS TAURINENSIS (MUT)**  
**Department of Life Sciences and Systems Biology**



**University of Turin**



## **Окрашивание грибных гиф и пропагул флуоресцентным отбеливателем**

Этот метод дает возможность прямой визуализации под флуоресцентным микроскопом гиф и грибных пропагул, присутствующих в различных субстратах, таких как образцы почвы, донных отложений, воды и т.д. Также может быть оценена общая длина грибных гиф.

### **1. Метод**

#### **1.1. Подготовка образца**

Соответствующее разбавление образца получают путем гомогенизации образца почвы или осадка в стерильной воде с добавлением 1% Tween 80 и 0,5% Antifoam A (Sigma) для облегчения диспергирования частиц почвы. В случае образцов воды, можно непосредственно перейти к окрашиванию, как описано ниже.

#### **1.2. Окрашивание**

Флуоресцентный краситель Fluorescent Brightener 28 (Sigma Aldrich Co., Ltd.) добавляют к разведению почвы или водному образцу до получения конечной концентрации  $0,1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Образцы инкубируют в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. Флуоресцентный краситель Fluorescent Brightener 28 (синонимы Calcofluor White M2R и Tinopal UNPA-GX) неспецифически связывается с полисахаридами со связями  $\beta$ -1,3 и  $\beta$ -1,4, такими, как хитин,  $\beta$ -глюканы и целлюлоза, и поэтому может окрашивать грибы в вегетативной фазе. Максимум поглощения при 365 нм (УФ), максимум эмиссии при 450 нм.

#### **1.3 Фильтрация**

Образцы фильтруют с использованием системы фильтрации через мембраны Anodisc

(Whatman) с порами 0,2 мкм. Объем отфильтрованной пробы зависит от концентрации. Мембранный фильтр с помощью пинцета переносят на предметное стекло с каплей деионизированной воды для улучшения адгезии и накрывают покровным стеклом для проведения наблюдений.

#### 1.4 Наблюдение флуоресценции

Препараты рассматривают при ультрафиолетовом освещении под флуоресцентным микроскопом, снабженным окуляром со счетной сеткой (10×10), при 400-кратном увеличении.

#### 1.5 Расчет количества пропагул и общей длины гиф на грамм почвы

Количество пропагул на грамм почвы рассчитывают как:

$$B = (N/X) \cdot (A/B) \cdot (1/S) \quad (1)$$

где N - количество подсчитанных грибных пропагул (спор и конидий), X - количество подсчитанных полей зрения (сеток), A - площадь фильтра, покрытая образцом, B - площадь сетки и S - количество почвы на фильтре.

Длину гиф H (мкм•сетка<sup>-1</sup>) рассчитывают по формуле:

$$H = I \cdot \pi \cdot A/2L \quad (2)$$

где I - число пересечений на сетку, A - площадь сетки (мкм<sup>2</sup>) и L - общая длина линий в счетной сетке (мкм).

Общую длину грибных гиф, F (м•г<sup>-1</sup> почвы) рассчитывают по формуле:

$$F = H \cdot 10^6 \cdot (A/B) \cdot (1/S) \quad (3)$$

где H - длина гиф (мкм•сетка<sup>-1</sup>), 10<sup>6</sup> - коэффициент перевода мкм в м, A - площадь фильтра, покрытая образцом, B - площадь сетки и S - количество почвы на фильтре.

Биообъем V (мкм<sup>3</sup>) рассчитывают из длины (L, мкм) и ширины (W, мкм), используя уравнение:

$$V = (\pi/4) \cdot W^2 \cdot (L-W/3) \quad (4)$$

Для получения достоверных результатов анализируют по крайней мере 50-100 полей на каждом фильтре. Поля должны охватывать область фильтра случайно, например, поля выбирают вдоль двух центральных перпендикуляров

## 2. Материалы

### 2.1 Раствор Fluorescent Brightener 28

Stock solution is prepared dissolving the powder in distilled water, stirring and adding drop by drop 20% (w/v), until the solution becomes transparent; reach the final volume concentration of 1mg mL<sup>-1</sup> with distilled water and store in single use aliquots at -20°C. Working solution

concentration is 10% (v/v) of the stock solution.

Запасной раствор готовят растворением порошка в дистиллированной воде, перемешиванием и добавлением 20%-ного (в/о) КОН до прозрачности раствора, доведением конечной концентрации до 1 мг/мл дистиллированной водой и хранением аликвот для однократного применения при -20°C. Концентрация рабочего раствора составляет 10% (о/о) от запасного раствора.

### **3. Ссылки**

**Alef K., Nannipieri P.** 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press.