



Выделение штаммов грибов, перспективных для рекультивации земель

Этот метод позволяет выделять штаммы грибов из образцов загрязненной почвы, что делает возможным оценку их потенциальной роли в биотрансформации органополютантов.

1. Метод

1.1. Подготовка образца

Количество, эквивалентное 10 г сухого веса, рассчитывают путем взвешивания 10 г образца на электронных весах и высушивания в печи в течение 24 ч при 60 °С. Затем образец вновь взвешивают и определяют соотношение влажный вес/сухой вес. Далее количество, эквивалентное 10 г сухого веса (СВ) почвы, суспендируют в 90 мл стерильного раствора тетранатриевой соли пиррофосфата для диспергирования органических коллоидов. Суспензию гомогенизируют перемешиванием в течение 30 мин. Дальнейшие разведения выполняют путем добавления 3 мл почвенной суспензии к 27 мл стерильного физиологического раствора до получения разведения 1:10000.

1.2. Посев образца

Аликвоту (1 мл) образца конечного разведения высевают на чашки Петри (Ø 15 мм). Посев материала выполняют по меньшей мере в 20 повторках: 10 на универсальную культуральную среду (MEA), 10 на селективную среду (PR478A), содержащую краситель Poly R478, деградация которого лигнинолитическими ферментами указывает на способность к биodeградации полициклических ароматических углеводов [1]. Расплавленную культуральную среду (30 мл) наливают в стороне от образца посевного материала, чтобы избежать инактивации грибов из-за высокой температуры. Сразу после добавления среды чашки быстро перемешивают вращательным движением, чтобы гомогенизировать с инокулятом еще до ее затвердения.

1.3. Посев образца на твердую среду

Аликвоту (1 мл) конечного разведения засевают на чашки Петри (\varnothing 15 мм), содержащие среду AW (30 мл), по которой распределено 600 мкл раствора сырой нефти в качестве единственного источника углерода для роста грибов (в качестве альтернативы могут быть использованы стандартные углеводороды, такие как нафталин или н-гексадекан, нанесенные на диск стерилизованной фильтровальной бумаги, помещенной под крышку чашки). Инокулят распределяют с помощью изгиба стерильной стеклянной пипетки Пастера. Посев делают по меньшей мере в 10 повторях для каждого образца.

1.4. Инкубация чашек и подсчет колониеобразующих единиц

Чашки инкубируют в темноте при той же температуре, что и в месте отбора проб. Колонии регулярно подсчитывают и отсеивают, отслеживая развитие медленно растущих грибов в течение 4 недель. Регистрируют наличие обесцвеченного гало. Количество колониеобразующих единиц на г сухого веса (КОЕ/г СВ) вычисляют как для общей микофлоры, так и для каждого вида или морфотипа.

1.5. Статистический анализ

Для оценки значимости ($p \leq 0,05$) количественных и качественных различий между двумя средами (MEA и PR478A), а также между общей средой MEA и селективной средой с сырой нефтью, использовали непараметрический критерий Спирмена.

2. Материалы

2.1. Стерильный раствор тетранатрий пиррофосфата

Готовят 0,1% (в/о) раствор $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ и стерилизуют.

2.2. Стерильный физиологический раствор

Готовят раствор 9 г/л NaCl и стерилизуют.

2.3. Стерильные чашки Петри

Стерильные чашки Петри диаметром 15 см.

2.4. Среды для культивирования

Универсальная среда MEA содержит: 20 г/л солодового экстракта, 20 г/л глюкозы, 2 г/л пептона, 18 г/л агара. Среда PR478A содержит: 20 г/л солодового экстракта, 20 г/л глюкозы, 2 г/л пептона, 18 г/л агара, 0,2 г/л Poly R478. После стерилизации автоклавированием в обе среды добавляют 15 мг/л стрептомицин-сульфата и 50 мг/л хлорамфеникола для ингибирования роста бактерий. AW среда содержит 9 г/л NaCl.

2.5. Раствор сырой нефти

Стандарт качества сырой нефти (60 мкл) растворяют в 600 мкл петролейного эфира.

3. Список литературы

Leung P., Pointing SP. 2002. Effect of different carbon and nitrogen regimes on Poly R decolorization by white-rot fungi. *Mycol Res*, 106:86-92