



СОП Выделение актиноризных клубеньковых бактерий

Протокол разработан О.Ступарем (июнь 1987).

1. Метод

1.1. Стерилизация поверхности

Клубеньки с корневой системы каждого растения подвергают стерилизации для удаления внешней бактериальной флоры.

1. Помещают друзы клубеньков в 250-мл с 50 мл 1%-ного раствора нетоксического детергента (7X, Serva) и встряхивают 30-60 сек. Разделяют друзы на отдельные клубеньки и повторяют промывание с раствором детергента. Споласкивают клубеньки 5 раз водопроводной водой. Таким образом удаляются крупные загрязнения, такие, как песок и остатки почвы.

2. Переносят 5-10 клубеньков в пробирку, содержащую 10 мл 96%-ного этанола и оставляют на 3 мин, периодически встряхивая. Вынимают клубеньки из этанола и высушивают на воздухе в чашке Петри.

3. Перенесут клубеньки в пробирку, содержащую 3 мл 3%-ного раствора OsO_4 на 3 мин. (**ОСТОРОЖНО!** Для защиты легких и глаз при работе с раствором OsO_4 используйте противогаз!)

4. Сливают раствор OsO_4 в сливную емкость, добавляют в пробирку 10 мл стерильной водопроводной воды и встряхивают 1-2 мин. Повторяют промывание стерильной водопроводной водой 5 раз. Начиная с этого этапа используют для работы с клубеньками стерильные инструменты.

1.2. Выделение

Переносят индивидуальный клубенок на стерильную чашку Петри, нарезают скальпелем на ломтики толщиной 0,5-1 мм и помещают в пробирки (1 ломтик на пробирку), содержащие 10 мл стерильной жидкой среды OS-1. Инкубируют пробирки при 29°C вплоть до 120 дней. Проверяют рост регулярно каждую неделю. Выделенные культуры эндوفита идентифицированы, как *Frankia* sp. с использованием фазово-контрастной микроскопии по характерной морфологии - присутствию спорангий с неподвижными спорами на субстратном мицелии. Культуры можно сохранять периодическим субкультивированием на среде OS-1 (не реже раза в 3 месяца) либо замороженными в криопробирках (Nunk).

2. Материалы

2.1. Стерильная водопроводная вода

Заполняют бутылки (0,5-1 л) и стеклянные пробирки (20 мл) водопроводной водой и стерилизуют.

2.2. OsO₄ 3%

Стерилизуют колбу с 97 мл дистиллированной воды. Добавляют 3,0 г OsO₄. Хранят раствор в плотно закрытой колбе.

2.3. Стерильные инструменты

Стерилизуют пинцеты и скальпели в сушильном шкафу(60 мин при 170°C)

2.4. Среда OS-1

K₂HPO₄ 0,15 г
NaH₂PO₄ x H₂O 0,1 г
KCl 0,1 г
MgSO₄ x 7H₂O 0,1 г
Пептон 2,5 г
Дрожжевой экстракт 0,25 г
Ацетат натрия 0,5 г
Tween-80 0,5 г
Раствор микроэлементов 1 мл
Дистиллированная вода 1000 мл

Раствор микроэлементов:

FeNa цитрат 5 г
H₃BO₃ 0,75 г
MnSO₄ x 5H₂O 0,4 г
ZnSO₄ x 7H₂O 0,3 г
(NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4H₂O 0,1 г
CoSO₄ x 7H₂O - 0,01 г
Дистиллированная вода 1000 мл

Среду стерилизуют 30 мин при 121 °С.

3. Ссылки

Гавристов А.В., Ступарь О.С., Жицкая Е.А. Влияние концентрации питательной среды на рост штамма *Frankia* sp. NRL 010210. Прикладная биохимия и микробиология 1990, №3, 399-403