



Коллекция ризосферных микроорганизмов

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов

Российской академии наук

Россия, 410049 г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13; <http://collection.ibppm.ru>



Стандартный протокол выделения микроорганизмов-деструкторов полициклических ароматических углеводов

Разработан А.Ю. Муратовой (Muratova et al., 2003)

на основе метода Kiyohara et al. (1982)

Обновленная версия – А.Ю. Муратовой (Октябрь 2013)

1. Методы

1.1. Отбор пробы

- Проба ризосферной почвы отбирается с территории промплощадки, загрязненной нефтепродуктами или полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ).
- Растения выкапывают титановой лопатой, отряхивают, затем помещают вместе с оставшейся на корнях почвой в полиэтиленовые пакеты, снабженные этикетками с указанием вида растения, даты, времени и места отбора образца.

1.2. Выделение микроорганизмов-деструкторов ПАУ

- В лаборатории у растений асептически отделяют корни, отбирают навеску тонких корней с оставшейся ризосферной почвой (примерно 1 г).
- Навеску корней помещают в колбу Эрленмейера, содержащую 100 мл стерильной водопроводной воды, и встряхивают на качалке в течение 30 мин. После встряхивания колбам дают отстояться 10-15 мин для осаждения почвенных частиц.
- Отбирают 1 мл почвенной суспензии и готовят серию разведений в физрастворе.
- Посев производят из разведений от 10^{-2} до 10^{-5} на агаризованную среду для деструкторов ПАУ.
- Выявление деструкторов ПАУ проводят по методу Kiyohara et al. (1982).
- Чашки инкубируют 3-5 суток при температуре 30°C.
- Поверхность чашек опрыскивают раствором ПАУ (например, фенантрена) в эфире и продолжают инкубировать.
- Через 3-5 суток вокруг колоний микроорганизмов, способных разрушать ПАУ, образуются зоны просветления.
- Колонии отсевают, проверяют на чистоту.
- Количественно способность отобранных штаммов разрушать ПАУ проверяют в жидкой среде с соответствующим ПАУ.

1.3. Идентификация

- Идентификацию проводят на основании изучения культурально-морфологических, физиолого-биохимических, иммунохимических характеристик и анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК микроорганизма.



1.4. Хранение

Осуществляется двумя методами: криоконсервацией (при -70°C) и хранением под минеральным маслом.

1.5. Криоконсервация

- Пробирку с 5 мл жидкой среды LB засевают петлей 18-48 ч агаровой культуры.
- Культуру выращивают при 30°C на качалке до фазы позднего экспоненциального роста.
- Микроскопируют для проверки чистоты.
- Суспензию клеток разбавляют в соотношении 1:1 свежей средой, содержащей 40% глицерина.
- Полученную суспензию разливают по стерильным пробиркам Эппендорфа объемом 0,5-1,0 мл, снабженным этикетками с указанием видового названия, лабораторного шифра штамма и даты консервации.
- Замораживают в жидком азоте.
- Хранят в морозильной камере при температуре -70°C .

1.6. Хранение под вазелиновым маслом

- Пробирку с 9 мл полужидкой среды LB засевают уколом петлей 18-48 ч агаровой культурой.
- Посевы культивируют при 30°C в термостате.
- Столбики с выросшей культурой заливают 1-2 мл стерильного вазелинового масла.
- Пробирки с культурами хранят в холодильнике при 4°C .

2. Среды

Физиологический раствор

Готовят 0,85% раствор NaCl и стерилизуют.

2.1. Среда для ПАУ-деструкторов (Muratova et al., 2003)

K_2HPO_4	0,5 г
NH_4Cl	1,0 г
Na_2SO_4	2,0 г
KNO_3	2,0 г
MgSO_4	0,5 г
FeCl_3	следы
Раствор микроэлементов (после автоклавирования)	1,0 мл
Дистиллированная вода	1 л
Агар-агар	2,0 г

Автоклавируют при 120°C в течение 30 мин.



Раствор микроэлементов

H_3BO_3	0,5 г
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,04 г
KI	0,1 г
$FeCl_3$	0,2 г
$MnSO_4 \cdot H_2O$,	0,4 г
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,2 г
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,4 г
Дистиллированная вода	1 л

Автоклавируют при 120°C в течение 30 мин.

2.2. Среда LB

Триптон	10 г
Дрожжевой экстракт	5 г
NaCl	10 г
Дистиллированная вода	1 л
Агар-агар	0,5 or 2,0 г

Автоклавируют при 120°C в течение 30 мин.

3. Литература

Muratova A., Hübner Th., Tisher S., Turkovskaya O., Möder M., Kusch P. Plant – rhizosphere-microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil // Int. J. Phytorem. – 2003. – V.5, № 2. – P. 137-151.

Kiyohara H., Nagao K. and Yano K. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, soil hydrocarbons on agar plates // Appl. Environ. Microbiol. – 1982. – Vol. 43. – P. 454-457.