



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 поверхностно-активных веществ

*Впервые разработан К.А. Cook (1979) и К. Ohwada (1975), модифицирован
О.В. Турковской (Турковская и Шуб, 1989) и Е.В. Дубровской
Обновленная версия – Е.В. Дубровской (Октябрь 2013)*

1. Методы

1.1. Отбор пробы

- Проба ризосферной почвы отбирается с территории промплощадки, загрязненной поверхностно-активными веществами (ПАВ).
- 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 поверхностно-активных веществ (ПАВ)

- 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^{-4} до 10^{-7} на питательный агар.
- Чашки инкубируют 5-7 суток при температуре 30°C.
- Выросшие изолированные колонии методом реплик переносят на чашки с агаризованной средой М9, содержащей исследуемое ПАВ, и на питательный агар.
- После инкубирования в течение 5-7 суток при температуре 30°C чашки заливают реактивом Драгендорфа (для неионогенных ПАВ) или реактивом с нейтральным красным (для анионных ПАВ), выдерживают 7-10 мин, сливают реактив, чашки промывают в проточной воде.
- После подсушивания вокруг штаммов, способных разрушать ПАВ, образуются прозрачные зоны на оранжевом фоне (для НПАВ) или на красном фоне (для АПАВ).
- Количественно способность отобранных штаммов разрушать ПАВ проверяют в жидкой среде М9 с соответствующим ПАВ.



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 и реактивы

Физиологический раствор

Готовят 0,85% раствор NaCl и стерилизуют.

Среда M9 (Miller, 1972)

Na_2HPO_4	6,0 г
KH_2PO_4	3,0 г
NaCl	0,5 г
NH_4Cl	1,0 г
Дистиллированная вода	1,0 л
Агар-агар	2,0 г

Значение pH корректируют до 7.2; Автоклавируют при 120°C в течение 30 мин.



Реактив Драгендорфа (Скок, 1978)

1) 0,17% оксинитрата висмута и 4% иодистого калия в 0,2 н уксусной кислоте; 2) ортофосфорная кислота; 3) этанол; 4) 20% хлористый барий. Компоненты смешивают в пропорции 10:1:10:5 соответственно.

Реактив для выявления деструкторов анионных ПАВ (Ohwada, 1975)

1) 0,3% нейтрального красного в дистиллированной воде; 2) 2,42% триса (гидрооксиметиламинометана) в дистиллированной воде. Компоненты смешивают в пропорции 1:1, затем добавляют 0,2 М HCl до pH 8,6 и разбавляют водой в два раза.

3. Литература

Турковская О.В., Шуб Г.М. Микробная деградация неионогенных поверхностно-активных веществ // Прикл. биохим. и микробиол. – 1989. – Т. 25, № 6. – С. 775-780.

Cooke K.A. Rapid method for the detection of nonionic surfactant – degrading microorganisms // J. Appl. Bacteriol. – 1978. – Vol. 44, N 2. – P. 299-303.

Ohwada K. Agar plate method for detection and enumeration of alkylbenzenesulphonate-degrading microorganisms // Appl. Microbiol. – 1975. – Vol. 29, N 1. – P. 40-43.

Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. Gold Spring Harbor Laboratory Press. – 1972. – 466 p.