

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
БОТАНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ. В.Л. КОМАРОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

УТВЕРЖДАЮ
Директор БИН РАН,


Д.В. Гельтман

29 августа 2017 г.



**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО ПРИГОТОВЛЕНИЮ
ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И СТЕРИЛЬНОЙ ПОСУДЫ**

(Разработано к.б.н. Н.В. Шаховой, к.б.н. Н.В. Псурцевой)

2.1. Подготовка и стерилизация посуды и пробок для питательных сред.

2.1.1. Стеклопосуду (колбы, матрасы, флаконы, пробирки и т. д.), используемую для приготовления питательных сред, необходимо вымыть теплой водой с помощью ерша или щетки, ополоснуть 2—3 раза дистиллированной водой и высушить. Использованную посуду со следами агаризованной среды необходимо предварительно замачивать в растворе щелока. Посуду, применяемую для питательных сред, следует сушить в сушильном шкафу.

2.1.2. Пробирки, колбы, флаконы, бутылки закрывают ватными стерилизуемыми пробками, которые готовят следующим образом. Кладут на стол продолговатую четырехугольную пластинку ваты соответствующей величины, загибают внутрь все четыре края так, чтобы получилась ленточка, по ширине равная длине пробки, и скатывают валик по диаметру пробирки или колбы. Ватную пробку обертывают кусочком марли в один-два слоя. Концы марли снаружи над пробкой крепко связывают ниткой. Можно использовать специальные автоматизированные устройства для изготовления ватных пробок нужного размера, а также коммерческие целлюлозные и автоклавируемые пластиковые пробки. Перед приготовлением питательных сред ватные пробки предварительно стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 40 мин и затем тщательно высушивают в сушильном шкафу.

2.1.3. При использовании стеклянных чашек Петри, их необходимо предварительно простерилизовать в автоклаве 1 час при 1 атм. (или в жарочном шкафу 1 час при 100 °С) и высушить в сушильном шкафу. Стерилизацию проводят либо в специальных биксах, либо стопки чашек заворачивают в плотную бумагу крафт.

2.2. Приготовление среды сусло-агар для выращивания и сохранения в коллекции культур базидиальных грибов.

2.2.1. Среда сусло (4%) – агар (2%) используется для выделения, сохранения и поддержания макромицетов в коллекции. Эта среда является предпочтительной органической средой для выращивания базидиальных грибов. Она содержит сахара и солодовый экстракт в качестве источника углеводов, необходимых для роста грибов. Слабокислое значение рН способствует росту базидиомицетов.

2.2.2. Нативное неохмеленное пивное сусло (промежуточный продукт в производстве пива), содержащее 12—20 % сахаров, фильтруют через тонкий слой ваты или 3—4 слоя марли, разбавляют дистиллированной водой до 4%. Разведенное сусло доводят 5%-ным раствором КОН до рН 5,8-6,0.

2.2.3. Среды для выращивания штаммов в чашках Петри готовят в автоклавируемых колбах или специальных флаконах на 250-1000 мл из расчета конечного объема среды не более 1/3 объема колбы.

2.2.4. В сухую колбу насыпают агар из расчета конечной концентрации 2% и добавляют 4% сусло. Колбу закрывают ватной пробкой и автоклавируют при 1 атм по схеме: продувка 15 мин – стерилизация 15 мин – продувка 5 мин – стерилизация 15 мин. После автоклавирования стерильную среду остужают до температуры, чуть выше комнатной и разливают в ламинарном шкафу по чашкам Петри (из расчета примерно 25 мл среды на чашку Петри диаметром 90 мм) с соблюдением стерильных условий.

2.2.5. Для выделения чистых культур используют среды с добавлением антибиотика (канамицина). Приготовление стерильного раствора канамицина: в колбе на 100 мл. с

ватной пробкой стерилизуют 100 мл. дистиллированной воды и в стерильных условиях растворяют в ней 1 флакон канамицина (1 г.). Приготовленный раствор добавляют в охлажденную колбу со средой из расчета 5-7 мл. раствора антибиотика на 100 мл среды непосредственно перед ее разливом по чашкам Петри. Концентрация антибиотика в среде не должна превышать 0,07%.

2.3. Контроль качества среды.

2.3.1. Плотность готовой среды соответствует по плотности 2,0%-ному агаровому гелю.

2.3.2. Среда имеет янтарную окраску, слегка опалесцирует, когда в чашках Петри формируется гель.

2.4. Хранение среды.

2.4.1. Среду сусло-агар хранят при комнатной температуре в чистом вентилируемом помещении (при необходимости продолжительного хранения – в холодильнике).

2.4.2. По мере необходимости, среду «расплавляют» в СВЧ печи или на водяной бане, остужают до «приятного тепла» и разливают по чашкам Петри.

2.5. Приготовление коллекционных пробирок.

2.5.1. Для хранения штаммов в коллекции готовят пробирки со «скошенным» сусло-агаром и пластиковыми пробками. Для этого разводится сусло (2.3.1.) и добавляется 2% агар. Смесь нагревают в СВЧ или на водяной бане до растворения агара, при этом раствор должен стать прозрачным, и теплым разливают по пробиркам примерно по 5-7 мл среды на стандартную биологическую пробирку диаметром 16 мм. На пробирки надевают пластиковые колпачками (не дожимая до упора) и автоклавируют по схеме (2.2.4.).

2.5.2. После автоклавирования пробирки вынимают из автоклава, дожимают до упора колпачки и раскладывают горячими на бортик подноса для получения скоса среды примерно на 45° до застывания агара.

2.5.3. Застывшие пробирки выдерживают несколько дней при комнатной температуре для контроля их стерильности и подсыхания пробок, затем засевают штаммами или хранят в холодильнике.

2.6. Приготовление коммерческих сред для выращивания коллекционных штаммов базидиальных грибов.

2.6.1. Стандартными коммерческими средами для выращивания культур базидиомицетов считаются мальц-экстракт (ME), мальц-экстракт агар (MEA), картофеле-декстрозный бульон (PDB) и картофеле-декстрозный агар (PDA).

2.6.2. Коммерческие среды выпускаются разными фирмами-производителями под одним и тем же названием, но отличаются по составу и качеству. Культуры базидиомицетов разных таксонов имеют индивидуальные предпочтения к средам определенных производителей, которые выявляются лишь экспериментальным путем. Наиболее предпочтительными для сапротрофных грибов являются ME и MEA Oxoid и Conda. Для штаммов эктомикоризных грибов хорошие результаты были получены на среде Muntons.

2.6.3. Для приготовления сухих коммерческих сред используют пропись производителя, указанную на упаковке. В случае отсутствия таких указаний, используют стандартную для базидиомицетов концентрацию – 15 г/л. Если коммерческая среда не содержит агара, то он добавляется в концентрации 20 г/л.

2.6.4. Метод приготовления: навеску, указанную на упаковке с коммерческой средой на основе мальц-экстракта или картофеле-декстрозной среды или 1,5 % (если не указано иначе) насыпают в колбу из расчета конечный объем среды не более 1/3 объема колбы (см. 2.2.3.), при необходимости в колбу добавляют агар (2%) и наливают нужное

количество дистиллированной воды. Содержимое колбы аккуратно перемешивают до увлажнения всех ее компонентов. Колбу закрывают ватной пробкой, фольгой или закручивающейся крышкой с резьбой (в случае использования специальных флаконов). Автоклавируют и разливают по чашкам по схеме, представленной выше (2.2.4.)

Зав. лабораторией биохимии грибов БИН РАН,
Куратор Коллекции LE-BIN



Н.В. Псурцева