

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



УТВЕРЖДАЮ
Директор БИН РАН,

Д.В. Гельтман
Д.В. Гельтман

"29" августа 2017 г.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО ПОЛУЧЕНИЮ
БИОХИМИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТУР БАЗИДИОМИЦЕТОВ
КОЛЛЕКЦИИ БИН РАН**

(Разработано Н.В. Псурцевой и Н.В. Шаховой)

13. Стандартная операционная процедура по биохимической характеристике культур базидиомицетов коллекции БИН РАН включает ряд последовательных действий по изучению биологической активности штаммов при культивировании на агаризованных питательных средах и учитывает требования следующих стандартных операционных процедур:

— Стандартная операционная процедура по приготовлению питательных сред и стерильной посуды (Приложение 2);

— Стандартная операционная процедура по пересеву культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 4);

— Стандартная операционная процедура по контролю жизнеспособности культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 5);

— Стандартная операционная процедура по контролю чистоты (аутентичности) культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 6);

13.1. Культуры для анализов выращивают на среде сусло-агар в термостате при 25 °С в течение 1-3 недель, в зависимости от их скорости роста.

13.2. Биохимическая характеристика культур проводится с применением экспресс-методов оценки активности окислительных и целлюлозолитических ферментов.

13.3. Определение активности окислительных ферментов.

13.3.1. Приготовление субстрата: водный агар (2%) с добавлением АВТS (0,1%) автоклавируют в течение 30 мин при 1 атм и разливают по стерильным чашкам Петри диаметром 90 мм.

13.3.2. После застывания чашек на них методом аппликации помещают диски (мицелием вверх) диаметром 7 мм, вырезанные из краевой зоны активно растущих колоний, приготовленных для анализа (по 3 диска каждого штамма на чашку). Инкубирование чашек осуществляют в термостате при 25 °С в течение 48 часов.

13.3.3. Способность к окислению АВТS характеризуют по наличию окрашенной зоны вокруг инокулятов (в мм). Через 2 суток инкубации измеряют диаметр образовавшихся зон (синезеленого цвета) в двух взаимно перпендикулярных плоскостях.

13.4. Определение активности целлюлозолитических ферментов.

13.4.1. Приготовление субстрата: водный агар (Difco, 1%) с добавлением микрокристаллической целлюлозы (КМЦ, 0,1%) автоклавируют в течение 30 мин при 1 атм и разливают по стерильным чашкам Петри диаметром 90 мм.

13.4.2. После застывания чашек на них методом аппликации помещают диски (мицелием вверх) диаметром 7 мм, вырезанные из краевой зоны активно растущих колоний, приготовленных для анализа (по 3 диска каждого штамма на чашку). Инкубирование чашек осуществляют в термостате при 25 °С в течение 48 часов.

13.4.3. Через 2 суток проводят оценку активности целлюлозолитических ферментов по диаметру зоны просветления вокруг инокулюма.

13.4.4. Для проявления зоны просветления готовят (ex tempore) раствор йода в йодистом калие (0,5% I в 2% KI).

13.4.5. Инкубированные чашки вынимают из термостата и заливают небольшим количеством приготовленного раствора йода в йодистом калие; осторожным покачиванием чашек, раствор распределяют по всей поверхности чашки, оставляют на 20-30 сек, после чего сливают (возможно повторное использование раствора в одной серии эксперимента).

13.4.6. Измеряют диаметр образовавшихся зон просветления в двух взаимно перпендикулярных плоскостях.

13.5. Статистическая обработка данных проводится в соответствии с общепринятыми методами с использованием компьютерных программ Microsoft Excel Statistic tool или OriginPro 7.5.

Биохимическая характеристика культур осуществляется с использованием следующего лабораторного оборудования: ламинарные шкафы ВЛ-12, паровой стерилизатор (автоклав) ГК-100, термостаты ТС-1/80; оргтехники (РС с ОС Windows, принтеры, сканеры и пр.) и расходных материалов: комплекты инструментов для работы в ламинаре, стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 90 мм, реактивы для приготовления сред и раствора для выявления зон просветления, спирт и т.д.

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



Н.В. Псурцева