

ПРИЛОЖЕНИЕ 4.

**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 ПЕРЕСЕВУ КУЛЬТУР
БАЗИДИОМИЦЕТОВ КОЛЛЕКЦИИ БИН РАН**

(Разработано Н.В. Псурцевой)

Санкт-Петербург 2017

4. Пересев культур базидиомицетов состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

- Стандартная операционная процедура по приготовлению питательных сред и стерильной посуды (Приложение 2);
- Стандартная операционная процедура по поддержанию фонда коллекции культур базидиомицетов БИН РАН (Приложение 3);
- Стандартная операционная процедура по выделению чистых культур базидиомицетов из природных экосистем (Приложение 9);
- Стандартная операционная процедура по контролю чистоты (аутентичности) культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 6);
- Стандартная операционная процедура по сохранению культур базидиомицетов под дистиллированной водой (Приложение 7);
- Стандартная операционная процедура по подготовке и проведению криоконсервации культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 8);
- Стандартная операционная процедура по контролю жизнеспособности культур (Приложение 5).

4.1. Пересев культур, находящихся на хранении методом суб-культуры при температуре 4-6 °С.

4.1.2. Все манипуляции по пересеву проводят в ламинаре с горящей спиртовкой в непосредственной близости от пламени. С поверхности скошенной агаризованной среды, находящейся на хранении при температуре 4-6 °С проводится отбор кусочка мицелия и его инокуляция на питательную среду сусло-агар в чашки Петри.

4.1.3. Инокулированные чашки Петри помещают в термостат крышками вниз и инкубируют при температуре 25 °С в течение 1-2 суток.

4.1.4. Ежедневно осуществляют контроль чашек на предмет роста инокулированного мицелия и контаминации как на инокуляте, так и на поверхности питательной среды согласно соответствующим СОПам (Приложения 5, 6).

4.1.5. В случае отсутствия заражения посторонней микрофлорой чашки заматывают парафилмом (в случае его отсутствия можно использовать изоленту типа SafeLine) для предотвращения подсыхания и контаминации.

4.1.6. Выросшие колонии оценивают визуально по макроморфологическим признакам и микроскопируют на наличие характерных микропризнаков и отсутствие посторонней микрофлоры согласно СОП «Стандартная операционная процедура по получению морфологических характеристик культур базидиомицетов коллекции БИН РАН. (Приложение 11).

4.1.7. С прошедших проверку чашек проводится отсев колоний на 2 биологические пробирки со скошенной средой сусло-агар.

4.1.8. Посеянные пробирки инкубируют в растительной камере при 20-25 °С) до зарастания поверхности среды мицелием.

4.1.9. Выросшие культуры возвращают на хранение в коллекцию, предварительно обмотав парафилмом в 3-5 оборотов стык между пластиковым колпачком и пробиркой для гермитизации штаммов при хранении.

4.1.10. Пересеянные пробирки ставятся в холодильник с соблюдением установленного порядка размещения каждого штамма (нужный холодильник, полка, ящик, мешок).

4.2. Пересев культур, находящихся на хранении под дистиллированной водой.

- 4.2.1. Поиск местоположения нужной культуры (номер контейнера, ряд, место) осуществляют по журналу коллекции или базе данных.
- 4.2.2. Микропробирку с пересеваемой культурой вынимают из контейнера и на ее место вставляют кусочек поролона для фиксации места и соседних пробирок.
- 4.2.3. В ламинарном шкафу горлышко микропробирки для стерилизации слегка обжигают в пламени спиртовки (соблюдая осторожность и учитывая пластиковый материал микропробирки).
- 4.2.4. В непосредственной близости от пламени спиртовки отвинчивают крышку микропробирки и тонким скальпелем или крючком по очереди извлекают несколько дисков (или все) на поверхность чашки Петри с сусло-агаром. Пузырек с остатками материала тщательно закрывают.
- 4.2.5. Чашку инкубируют в термостате при 25 °С в течение нескольких суток, контролируя рост и аутентичность штамма.
- 4.2.6. Пузырек (если его содержимое не было полностью израсходовано) возвращают в контейнер на исходное место.
- 4.2.7. После того, как инкубированная чашка зарастет мицелием, совершают контроль аутентичности культуры согласно соответствующему СОПу (Приложение 6).
- 4.2.8. Проверенную культуру отсевают дисками на новый пузырек согласно соответствующему СОПу (Приложение 7) и возвращают в коллекцию на новое место, либо на исходное, если оно свободно.
- 4.2.9. Чашку с оставшимся мицелием при необходимости используют в работе.
- 4.3. Пересев культур, находящихся на хранении при температуре -80°С.
 - 4.3.1. Поиск штаммов осуществляется по журналу или базе данных Коллекции LE-BIN.
 - 4.3.2. Последовательность операций по пересеву культур при их подготовке к криоконсервации проводят согласно соответствующему СОПу (Приложение 8).
 - 4.3.3. Пробирки, находившиеся на хранении в низкотемпературном морозильнике (-80°С) размораживают следующим образом: извлеченную из штатива пробирку помещают в водяную баню при температуре 37 °С и покачивают в течение 1-2 минуты для улучшения теплообмена.
 - 4.3.4. Из растаявшей пробирки тонким скальпелем отбирают все диски и помещают их все в одну чашку Петри с сусло-агаром.
 - 4.3.5. После инокуляции чашки инкубируют в термостате на 25 °С крышками вниз в течение 5-10 суток в зависимости от скорости роста штамма.
 - 4.3.6. После того, как инкубированная чашка зарастет мицелием, совершают контроль аутентичности культуры согласно соответствующему СОПу (Приложение 6).
 - 4.3.7. Проверенную культуру отсевают дисками на новую криопробирку с криопротектором согласно соответствующему СОПу (Приложение 8) и возвращают на исходное место в низкотемпературный морозильник на -80 °С согласно соответствующему СОПу (Приложение 8),.
 - 4.3.8. Остатки колонии на чашке Петри при необходимости используют для работы.

Пересев культур осуществляется с использованием следующего лабораторного оборудования: ламинарные шкафы ВЛ-12, паровой стерилизатор (автоклав) ГК-100, термостаты ТС-1/80 и хладотермостаты ТСО-1/80, низкотемпературный холодильник (New Brunswick Scientific U-410, микроскопическая техника (микроскоп AxioScope A1, Carl Zeiss, стереомикроскопы МБС-10 и МС-2), холодильники, центрифуги, вытяжные

шкафы и т.д.; оргтехники (PC с ОС Windows, принтеры, сканеры и пр.), фототехники (цифровые фотокамеры Canon, Olympus и пр.) и расходных материалов: комплекты инструментов для работы в ламинаре, наборы микропипеток, реактивы для приготовления сред, спирт и т.д..

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



Н.В. Псурцева