

А.В. Константинов, науч. сотр.;
М.Я. Острикова, ст. науч. сотр, канд. биол. наук;
И.А. Хархасова, асп., мл. науч. сотр.;
С.В. Пантелеев, зав. лабораторией, канд. биол. наук
(ГНУ «Институт леса НАН Беларуси», г. Гомель, Беларусь)

ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ПОВЕРХНОСТНОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ ЭКСПЛАНТОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР ГРИБОВ

Термин стерилизация (от лат. «*sterilis*» – бесплодный) применительно к культивируемым биотехнологическим объектам означает полное уничтожение вегетативных клеток микроорганизмов в питательных средах, посуде и непосредственно на поверхности исходных эксплантов. Особое значение стерилизация приобретает при поддержании изолятов и штаммов в чистой культуре. Использование методов стерилизации в комбинации со стерильным оборудованием и материалами позволяет проводить более точные эксперименты, свободные от влияния последствий развития нежелательной микрофлоры [1].

Степень загрязнения материала посторонней микрофлорой зависит от источника материала для инициации чистых культур. В связи со сбором в природных условиях в теплое время года, обусловленным четкой сезонностью развития грибов, плодовые тела контаминированы большим количеством микроорганизмов, что осложняет ряд их биологических особенностей: пористая структура тканей, неоднородность покровов и слизистая поверхность. Развитие плодовых тел в подстилочном горизонте почвы, ведет к массовому обсеменению бактериями и микромицетами.

Успешность стерилизации связана с целым рядом факторов: степенью зрелости и поражения плодовых тел насекомыми-микофагами, условий их хранения, а также качеством предварительной обработки, типов применяемых стерилизующих агентов и временем экспозиции, особенностями исходных эксплантов [2, 3].

Таким образом, выделение изолятов требует разработки такой последовательности действий, при которой достигается максимальная доля жизнеспособных эксплантов без признаков микробной контаминации, так как решение задачи по разделению мицелия целевого вида от присутствия нежелательных примесей крайне трудоемко.

Были апробированы три схемы поверхностного обеззараживания исходного материала (свежих плодовых тел и фрагментов корней с микоризными окончанием): 1. обработка 3% перекисью водорода (H₂O₂) с последующим промыванием 96 % этиловым спиртом

(C₂H₅OH) в течение 5 минут и ополаскиванием стерильной дистиллированной водой; 2. обработка 70 % этанолом 30 секунд и двукратное промывание дистиллированной водой по 5 минут; 3. обработка 70 % этанолом с последующим выдерживанием 3 минуты в 0,1% сулемы (HgCl₂) и двукратным промыванием стерильной дистиллированной водой. Материал (фрагменты базидиом рядовки и фрагменты корневых систем двухлетних сеянцев сосны обыкновенной, собранных на территории Кореневской ЭЛБ Института леса НАН Беларуси) после обработки эксплантировали по 6-10 шт. на плотные питательные среды MS, содержащие 7,0 г/л микробиологического агара, 30,0 сахарозы и культивировали в термостате.

После 5 суток культивирования проводили учет признаков наличия контаминирующей микрофлоры –роста колоний бактерий и развития плесневых грибов. Бактериальная контаминация преобладала во всех вариантах опыта. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Эффективность различных схем поверхностной стерилизации фрагментов корней сосны обыкновенной с микоризными окончаниями при выделении грибов в чистую культуру

Схема	Исходное кол-во	Стерильных / контаминированных эксплантов, шт./%	Источник заражения, шт./%	
			Бактерии	Плесневые грибы
1	32	17/53,1 / 15/46,9	12/80,0	5/33,3
2	30	12/40,0 / 18/60,0	13/72,2	9/50,0
3	34	23/67,6 / 11/32,4	9/81,8	3/27,3

Установлено, что в случае культивирования фрагментов корней сеянцев с микоризными окончаниями, лучшей схемой предварительной стерилизации является промывание спиртом с последующим экспонированием материала в 0,1% растворе хлорида ртути.

Указанная обработка позволяет снизить количество контаминированного материала до 32,4% в сравнении с 46,9% и 60,0% при применении схем, не предусматривающих использование жесткой стерилизации ртутьсодержащим агентом.

Следует отметить эффективность сулемы в отношении подавления развития плесневых грибов на фрагментах корней сеянцев сосны обыкновенной, контаминация микромицетами составила не более 27,3% в общем объеме заражения.

Несмотря на эффективность последовательного применения спирта и сулемы при указанной схеме до 81,8% контаминации составляли бактерии, что сравнимо с результатами в случае схем 1 и 2

(80,0% и 72,2% соответственно) и связано с высокой обсемененностью почвы микроорганизмами.

В случае стерилизации фрагментов тканей плодовых тел грибов выход до 84,0% и 82,0% стерильных и жизнеспособных эксплантов от исходного количества (50 шт.) соответственно.

Следует отметить, что в случае применения перекиси водорода на 20,4% материала отмечали развитие процессов некроза, который может быть связан как с химическим ожогом тканей, так и деятельностью бактериальной микрофлоры, не проявляющейся на питательной среде (таблица 2).

Таблица 2 – Эффективность различных схем поверхностной стерилизации высечек базидиом при введении в культуру

Схема	Исходное кол-во	Стерильных эксплантов, шт./%	Жизнеспособных / контаминированных / некротизированных эксплантов, шт./%	Источник заражения, шт./%	
				Бактерии	Плесневые грибы
1	54	31/57,4	21/38,9 / 23/4,4 / 11/20,4	17/8,1	8/3,8
2	56	26/46,4	26/46,4 / 30/2,6 / 4/7,1	21/2,8	15/2,0
3	50	42/84,0	41/82,0 / 8/0,3 / 3/6,0	12/4,5	5/1,9

Таким образом, по результатам нашего эксперимента, наиболее подходящей схемой обработки, позволяющей элиминировать контаминирующую микрофлору, как с фрагментов корней сеянцев, так и с высечек из плодовых тел высших грибов, является обработка этанолом и раствором сулемы с двукратным промыванием стерильной дистиллированной водой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей: учебное пособие. – Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. – 152с
2. Поликсенова В.Д., Храпцов А.К., Пискун С.Г. Методические указания к занятиям спецпрактикума по разделу «Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов» для студентов 4 курса дневного отделения специальности «G 31 01 01 – Биология». – Мн.: БГУ, 2004. – 36 с.
3. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа. 2004. С. 149–165.