

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Оренбургский федеральный исследовательский центр
Уральского отделения Российской академии наук

Обособленное структурное подразделение
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза
Уральского отделения Российской академии наук

П Р И К А З

19 мая 2023 г.

№ 32

г. Оренбург

Утвердить:

1. Стандартную операционную процедуру № 1 по подготовке культур микроорганизмов к лиофилизации, депонируемых в Сетевой коллекции симбионтных микроорганизмов и их консорциумов ИКВС УрО РАН (СКСМ);
2. Стандартную операционную процедуру № 2 по подготовке культур микроорганизмов к криоконсервации депонируемых в Сетевой коллекции симбионтных микроорганизмов и их консорциумов ИКВС УрО РАН (СКСМ);
3. Форму справки об оценке аутентичности штамма, депонированного в коллекции;

в качестве приложений №№ 12-14 к Положению «О сетевой коллекции симбионтных микроорганизмов и их консорциумов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского Федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук» от 19.05.2022, утвержденного Приказом № 32 от 19.05. 2022 г.

Директор

А.О. Плотников

Согласовано:

19.05.23

Н.Б. Перунова

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ОФИЦ УрО РАН)

ИНСТИТУТ КЛЕТОЧНОГО И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СИМБИОЗА
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИКВС УрО РАН)

Утверждено

Приказом директора ИКВС УрО РАН,
к.м.н., доц. А.О. Плотникова
от «19» мая 2023 г. № 32

П О Л О Ж Е Н И Е

**о сетевой коллекции симбионтных микроорганизмов и их консорциумов
Института клеточного и внутриклеточного симбиоза
Уральского отделения Российской академии наук
– обособленного структурного подразделения
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Оренбургского федерального исследовательского центра
Уральского отделения Российской академии наук**

Приложение № 13

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА №2

**по подготовке культур микроорганизмов к криоконсервации депонируемых в
Сетевой коллекции симбионтных микроорганизмов и их консорциумов ИКВС
УрО РАН (СКСМ)**

Оренбург, 2023

1. На криоконсервацию принимаются аутентичные культуры микроорганизмов, идентифицированные как минимум двумя методами, с обязательным применением MALDI-TOF и/или секвенирования гена 16S рРНК.

2. Криоконсервация культур микроорганизмов осуществляется при -60°C или -80°C в низкотемпературных холодильниках, специально предназначенных для хранения коллекционных культур.

3. Подбор условий культивирования, обеспечивающих оптимальный рост и/или максимальное спорообразование культур микроорганизмов (состав питательной среды, температура, время культивирования и другие условия) производят на основании данных, предоставленных депозитором. При отсутствии данных от депозитора подбор оптимальных условий культивирования производят по данным литературы или сведений из других коллекций микроорганизмов.

4. Для криоконсервации культуру бактерий или дрожжевых грибов культивируют в оптимальных условиях до поздней логарифмической или начальной стационарной фазы роста.

5. В качестве криопротекторов для бактерий и дрожжевых грибов используют 10% глицерин, 5-10% диметилсульфоксид (ДМСО) и другие растворы. Раствор глицерина предварительно разливают в стеклянные пробирки в объеме 5 мл и автоклавируют при 121°C 15-20 мин. Раствор ДМСО стерилизуют путем фильтрации через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм. Стерильные растворы криопротекторов хранят при $+5^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца.

6. Стерильные полипропиленовые или поликарбонатные криопробирки объемом 1,0 – 2,0 мл (не менее 6 для каждой культуры) маркируют путем наклейки этикеток с указанием ключевых идентификаторов образца и даты криоконсервации.

7. Выращенную в жидкой питательной среде культуру микроорганизмов переносят в количестве 630 мкл в стерильную криопробирку, содержащую 70 мкл криопротектора, с соблюдением правил асептики. Оптимальная концентрация культуры для криоконсервации составляет 10^7 - 10^8 клеток в 1 мл криопротектора. После внесения культуры пробирки тщательно закрывают и переносят в специальный штатив для медленной заморозки со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Штатив для заморозки с ампулами ставят в криокамеру на -60°C или -80°C . Через час пробирки из этого штатива переставляют в криоштатив, который размещён в низкотемпературном холодильнике при -60°C или -80°C .

8. Сведения о хранении каждого образца с указанием координат ячеек в сетке штатива, номера коробки, номера холодильника, документируют в электронной и бумажной версии журнала криоконсервации культур.

9. Размораживание штамма микроорганизмов, подвергнутого процедуре криоконсервации.

9.1. Извлекают нужную криопробирку из коробки, хранящейся в низкотемпературном холодильнике и помещают в криостатив, предварительно замороженный до температуры -18°C .

9.2. Немедленно, в асептических условиях, стерильной деревянной зубочисткой разрыхляют поверхность замороженной поверхности суспензии микроорганизмов в криопробирке и калиброванной бактериальной петлей снимают одну петлю материала и рассеивают по поверхности питательной среды или переносят в пробирку с жидкой питательной средой, согласно рекомендациям для данного штамма. Культивирование проводят в оптимальных для данного штамма условиях.

9.3. Криопробирку с оставшейся в замороженном состоянии суспензией криопротектора немедленно помещают в штатив в низкотемпературном холодильнике, где пробирка находилась первоначально.

10. Оценка эффективности хранения штамма при криоконсервации.

10.1. Оценку эффективности хранения штамма при криоконсервации проводят путем высева клеток через месяц после консервации. Для этого проводят посев петлей по секторам на поверхности агаризованной среды в чашке Петри по методу Gould. Интерпретацию результатов производят по приведенной ниже таблице.

I сектор	II сектор	III сектор	IV сектор	Количество в 1 мл
1-6	-	-	-	<1000
8-20	-	-	-	3000
20-30	-	-	-	5000
30-60	-	-	-	10000
70-80	-	-	-	50000
100-150	5-10	-	-	100000
не сосч.	20-30	-	-	500000
"-	40-60	-	-	1 млн
"-	100-150	10-20	-	5 млн
"-	не сосч.	30-40	-	10 млн
"-	"-	60-80	ед.кол.	100 млн

Если численность жизнеспособных клеток через месяц после заморозки снижается на 1 порядок и более, процедуру повторяют или подбирают другие условия хранения штамма по согласованию с депозитором.

10.2. Оценку эффективности длительного хранения штамма при криоконсервации проводят путем высева клеток через год после консервации и далее – ежегодно. При выявлении резкого снижения числа жизнеспособных клеток

при очередном пересеве на 1-2 порядка и более, штамм высевают и процедуру криоконсервации повторяют.

10.3. Результаты оценки эффективности криоконсервации вносят в журнал криоконсервации культур.

АВТОР СОП:

К.С. Инчагова, к.б.н., с.н.с. ЦКП «Персистенция микроорганизмов»