

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

ПОЛОЖЕНИЕ

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 № 12

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА №1

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

Оренбург, 2023

Лиофилизация культур микроорганизмов СКСМ проводится на лиофильной сушке Powerdry LL 1500 (Termo Fisher Scientific, Czech Republic) в соответствии с рабочей инструкцией по эксплуатации лиофильной сушки. Отжиг ампул проводится по оригинальной методике, с помощью технической системы, состоящей из газовой горелки, оборудования для смешивания газов и баллонов с кислородом и пропаном.

Лиофилизация культур микроорганизмов СКСМ состоит из ряда последовательных процедур, включающих подготовку материалов, культур и собственно процесса лиофилизации.

1 Подготовка ампул

Стеклянные ампулы (нейтральное стекло, диаметр 14,2 мм, длина 82 мм):

- промывают последовательно детергентом, проточной водопроводной водой и дистиллированной водой, высушивают;
- тампонируют рыхлыми тампонами хлопковой ваты на глубину 1 см от края ампулы;
- стерилизуют в автоклаве при 132°C, 30 мин.

2 Подготовка защитной среды

Для лиофилизации используется защитная среда, обеспечивающая гарантированное сохранение жизнеспособности бактериальных культур. Защитная глюкозо-желатиновая среда готовится из стерильных аптечных препаратов - желатиноль и 5% раствор глюкозы. Возможно использование оригинальных защитных сред по прописи депозитора или данным литературы, каталогов других коллекций или авторов.

3 Подготовка культур микроорганизмов

Бактериальная культура рассеивается на твердой среде в чашке Петри для получения отдельных колоний. Рассев культуры и оценку штаммовой аутентичности проводит депозитор. Фотография чашки Петри с отдельными колониями бактерий отправляется ответственному за лиофилизацию в качестве доказательства аутентичности штамма (Рис. 1).



Рисунок 1. Фотография чашки Петри с отдельными колониями бактерий (ЧК). Посев отдельных колоний (3-4 колонии) в жидкую питательную среду и доведение концентрации бактерий до 10^9 КОЕ/мл осуществляет депозитор. Бактериальные взвеси в концентрации не менее 10^9 КОЕ/мл в 3-х пробирках (по 2 мл в каждой) передаются для лиофилизации.

4 Заполнение ампул и лиофилизация

Смешивание защитной глюкозо-желатиновой среды и взвеси бактерий проводят перед лиофилизацией культур. Смесь готовят *ex tempore* в следующей пропорции (взвесь бактерии/5% раствор глюкозы/желатиноль – 1:1:8). Ампулы заполняют с помощью шприца, по 3 мл в каждую ампулу. Количество ампул для лиофилизации одной культуры – не менее 6. Процесс лиофилизации культур проводится в течение 18-24 часов.

5 Отжиг ампул

Ампулы запаивают в области перетяжки с помощью газовой горелки со смесью пропан/кислород. Герметичность ампул проверяют путем их погружения в воду. Негерметичные ампулы обезвреживаются (автоклавирование) и уничтожаются.

6 Контроль жизнеспособности и чистоты культуры после лиофилизации

Для контроля жизнеспособности и чистоты культуры после лиофилизации депозитору предоставляется отдельная ампула, не входящая в набор из 6-ти ампул, размещаемых на хранение. Через 24 часа после лиофилизации поверхность контрольной ампулы стерилизуют 70% этиловым спиртом и

вскрывают после нанесения на стекле насечки с использованием алмазного стеклореза или металлического надфиля. В ампулу вносят 0,2 – 0,3 мл стерильного бульона и пипетируют несколько раз для формирования однородной суспензии. Суспензию рассеивают по поверхности твердой питательной среды методом количественного секторного посева по Gould. Ампулу с бульоном ставят в термостат на 4-6 часов при оптимальной температуре (например, +37°C) для подрачивания культуры. После инкубации суспензию повторно рассеивают по поверхности твердой питательной среды методом секторного посева. Через 24 часа чашки Петри с выросшей культурой (Рис. 2) осматривают, проводят оценку чистоты лиофилизированной культуры и количества КОЕ в 1 мл, и фотографируют. Фотографии отправляются ответственному за лиофилизацию в качестве доказательства чистоты и жизнеспособности штамма.



Рисунок 2. Высев культуры бактерий из контрольной ампулы сразу после вскрытия и после подрачивания в течение 4-6 часов в термостате (+37°C).

В заключение депозитор отправляет в СКСМ справку утвержденного образца (бумажный оригинал или высококачественный цветной скан) об оценке аутентичности лиофилизированного штамма, депонированного в коллекции (Приложение).

7 Эtiquетирование и хранение

Ампулы маркируют этикеткой утвержденного образца с названием штамма, ID штамма, номера ампулы, даты лиофилизации.

Ампулы с образцами хранят при температуре +5...+8°C, в штативах, в холодильниках, специально предназначенных для хранения коллекционных культур. Сведения о лиофилизации и хранении каждого образца с указанием номеров упаковки, коробки, холодильника, документируют в электронной и бумажной версии журнала лиофилизации культур.

АВТОР СОП:

О.С. Журлов, к.м.н., в.н.с. ЦКП «Персистенция микроорганизмов»,
куратором сектора информации и координации СКСМ