

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
(ФИЦ БИОТЕХНОЛОГИИ РАН)**

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор



Федерального государственного учреждения  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии  
РАН)

чл.-корр. РАН Попов

*С.А. Попов*  
«12» сентября 2017

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО ВЫДЕЛЕНИЮ ШТАММОВ  
МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ РАЗНЫХ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ, В Т.Ч.  
ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ МЕСТ ОБИТАНИЙ  
в ЦКП «Коллекция уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных  
физиологических групп биотехнологического назначения (UNIQEM)»  
(ЦКП «Коллекция UNIQEM»)**

«Согласовано»



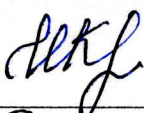
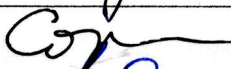
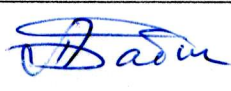
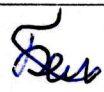
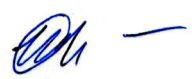


Руководитель ЦКП «Коллекция  
UNIQEM»

*А.Л. Мулюкин*  
д.б.н. А.Л. Мулюкин

«30» августа 2017

МОСКВА 2017

Разработано

ФИО, степень, должность	Подпись	Подразделение
Кочетова Т.В., к.б.н., н.с. Фролова А.А., аспирант, м.н.с.	 	Отдел биологии экстремофилов
Кравченко И.К., к.б.н., в.н.с.		Лаборатория выживаемости микроорганизмов
Сорокин Д.Ю., д.б.н., в.н.с. Брянцева И.А., к.б.н., н.с.	 	Лаборатория экологии и геохимической деятельности микроорганизмов
Бабич Т.Л., к.б.н., н.с.		Лаборатория нефтяной микробиологии
Белова С.Э., к.б.н., с.н.с. Куличевская И.С., к.б.н., с.н.с.	 	Лаборатория микробиологии болотных экосистем
Булаев А.Г., к.б.н., и.о. зав. лаб.		Лаборатория хемолитотрофных микроорганизмов
Берестовская Ю.Ю., к.б.н. н.с.		Лаборатория реликтовых микробных сообществ
Паршина С.Н., к.б.н.. с.н.с.		Лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания

Выделение штаммов микроорганизмов (изолятов) из природных источников, в т.ч. экстремальных мест обитания, осуществляют в соответствии со следующими процедурами.

1. Источниками для выделения микроорганизмов являются образцы:
  - почв;
  - водных экосистем различной глубины (в том числе, гидротермальных источников и рассолов);
  - грунтов;
  - минеральных отложений и руд;
  - торфа и растительных остатков;
  - донных отложений, прибрежного и придонного ила, обрастаний, микробных матов;
  - антропогенных систем очистных сооружений, нефтяных скважин, подземных газовых хранилищ, полигонов твердо-бытовых отходов;
  - других экосистем.
2. Образцы отбирают с соблюдением техники асептического отбора проб в стерильные емкости с плотно привинчивающимися крышками для исключения контаминации посторонней микрофлорой. Доставка и последующее хранение отобранных образцов должны обеспечивать сохранность микроорганизмов в условиях, максимально приближенных к природным. Данная СОП не регламентирует технику стерильного отбора проб, форму их доставки и условия хранения перед выделением штаммов микроорганизмов.
3. Первая стадия выделения штаммов включает получение накопительных культур в жидких средах после их засева навесками или аликвотами природных образцов и/или посев суспензий образцов на агаризованные плотные среды подходящего состава. В некоторых случаях посевы осуществляют только после первичного тестирования активности специфических процессов в исходных пробах как индикатора наличия определенных физиологических групп прокариот.
4. Засеянные жидкие или плотные среды инкубируют в селективных условиях, обеспечивающих преимущественное развитие целевых микроорганизмов - при определенных температурах, рН, солености, составе газовой атмосферы, освещенности, временных сроках и т.д.
5. Подбор состава питательных сред и селективных условий культивирования для получения жидких накопительных культур и/или первичных посевов на плотных

питательных средах осуществляют с учетом особенностей пищевых потребностей и природных условий обитания целевых микроорганизмов:

6. Особенности питательных сред для:

- гетеротрофных микроорганизмов: полноценные или разбавленные жидкие и плотные питательные среды с определенным органическим субстратом и комплексом минеральных веществ, специфичными для целевой группы.
- хемогетеротрофов: синтетические среды, содержащие специфический неорганический терминальный окислитель (нитрат, сульфат, карбонат) и органический источник углерода.
- хемолитотрофных микроорганизмов: минеральные среды (без органического вещества) с добавкой неорганического донора и акцептора электронов, специфичных для целевой группы, например,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{Fe(II)}$ ,  $\text{CO}$ , окисленные соединения серы,  $\text{Fe(III)}$ ,  $\text{NO}_3^-$  и др.).
- фототрофных микроорганизмов: среды, аналогичные средам для гетеротрофных или литотрофных прокариот, но инкубируемые на свету различного спектра.
- олиготрофных микроорганизмов: среды с низким (менее 1 мМ) содержанием органического углерода или иного субстрата.
- метано- и метилотрофных прокариот: среды с использованием  $\text{C}_1$ - соединений в качестве единственного источника углерода.
- анаэробных прокариот: наличие в составе питательных сред восстановителя/антиоксиданта ( $\text{Na}_2\text{S}$ , дитионита, цистеина и др.).

7. Основные требования к солености и pH сред для выделения:

- галофильных микроорганизмов: содержание и состав солей должен соответствовать таковому исходных пробах.
- алкалофильных микроорганизмов: щелочные значения pH задают комбинацией щелочных буферов с общим содержанием солей, соответствующих местообитанию (главным образом, боратов/ $\text{Ca(OH)}_2$  для несоленых щелочных источников, либо карбонатов натрия для содовых озер).
- ацидофильных микроорганизмов: нужное значение pH задают либо увеличением содержания  $\text{CO}_2$  в газовой фазе для умеренных ацидофилов (pH 4-6), либо добавкой минеральных кислот для экстремальных ацидофилов (pH < 4).

8. Рекомендуемые диапазоны температур (с допущением вариаций) для выделения:

- психрофильных микроорганизмов: 1 - 10 °C
- психротолерантных: 10-20°C,

- мезофильных: 20 - 40°C
  - термофильных (в том числе, умеренно-термофильных): 40°C - 80°C
  - гипертермофильных:  $\geq 80^\circ\text{C}$
9. Основные требования к составу газовой фазы для выделения:
- аэробов: наличие кислорода (5-20%) при использовании воздуха или искусственной газовой смеси;
  - анаэробов: отсутствие кислорода за счет замены воздуха на  $\text{N}_2$ , или  $\text{N}_2/\text{CO}_2$ , или  $\text{CO}_2$ , или  $\text{Ar}$ , или  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  и др. (в зависимости от метаболизма анаэробных микроорганизмов);
  - микроаэробов: уровень кислорода менее 2% (от 0.2 до 2%);
  - метанотрофов: наличие метана в газовой фазе;
  - карбоксидотрофов: наличие  $\text{CO}$  в газовой фазе;

#### 9. Другие требования

В ряде случаев для успешного получения накопительных культур в питательные среды необходимо добавлять витамины, аминокислоты, казминовые кислоты, дрожжевой экстракт, факторы роста, а также стерильные экстракты, полученные из природных образцов. При выделении фототрофных микроорганизмов необходимо обеспечить подходящие условия освещения.

10. Первичные накопительные культуры микроорганизмов получают, культивируя образец, отобранный из природного объекта исследования, на жидкой среде до появления достаточной численности клеток (не менее  $\times 10$  увеличения по сравнению с инокулятом), а первичные посеы на плотных питательных средах – до появления различимых колоний (визуально, либо под биноклем).

11. Чистые культуры получают из жидких накопительных культур или отдельных колоний за счет:

- создания селективных условий для роста и развития целевых микроорганизмов. Селективные условия создают за счет: использования специфических питательных сред, добавления витаминов, антибиотиков, (более узкого) определённого диапазона концентраций питательных веществ, солености, pH, температуры инкубации, определенных режимов освещенности (интенсивности и/или спектра).

- многократных пересевов предельно разведенных суспензий (до получения конечного числа морфологически однородных клеток) или колоний;
- применения приемов ингибирования роста сопутствующей микрофлоры (прогрев, обработка антибиотиками и фагами и др.).
- применения методов физического разделения клеток (в некоторых случаях) с разным размером путем центрифугирования суспензий в градиенте плотности или фильтрованием.

12. Проверку чистоты культуры осуществляют по следующим критериям:

- морфологическим и колониальным признакам (однородности клеток и колоний);
- совокупности физиологических и биохимических признаков;
- на основании анализа последовательности генов рибосомальной РНК (16SpРНК), house-keeping генов, а также полногеномных последовательностей.
- результатам гибридизации со специфичными олигонуклеотидными зондами, мечеными люминесцентными красителями (в ряде случаев);

13. Штаммы микроорганизмов, претендующих на отнесение к новой таксономической группе, описывают по совокупности необходимых для данного уровня фенотипических, хемотаксономических и молекулярно-генетических признаков.

14. Поддержание, подготовку к хранению, контроль качества хранения, коррекцию нарушений качества хранения выделенного штамма осуществляют согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам, разработанным для ЦКП «Коллекция UNIQEM».