

**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

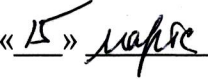
2017

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО ПОДГОТОВКЕ КУЛЬТУР
МИКРООРГАНИЗМОВ К КРИОКОНСЕРВАЦИИ в ЦКП «Коллекция уникальных и
экстремофильных микроорганизмов различных физиологических групп
биотехнологического назначения (UNIQEM)»
(ЦКП «Коллекция UNIQEM»)**

«Согласовано»

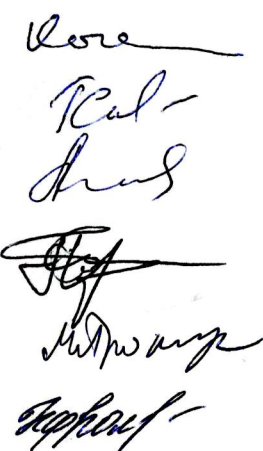
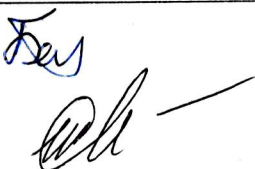
Руководитель ЦКП «Коллекция UNIQEM»

 д.б.н. А.Л. Мулюкин

«15»  2017

МОСКВА 2017

Разработано

ФИО, степень, должность	Подпись	Подразделение
Кочетова Т.В., к.б.н., н.с. Слободкина Г.Б., к.б.н., с.н.с. Перевалова А.А., к.б.н., с.н.с. Подосокорская О.А., к.б.н., с.н.с. Прокофьева М.И., к.б.н., н.с. Фролова А.А., аспирант, м.н.с.		Отдел биологии экстремофилов
Филиппова С.Н., 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
Семенова Е.М., 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. Болтянская Ю.В., к.б.н., н.с. Самылина О.С., к.б.н., с.н.с.		Лаборатория реликтовых микробных сообществ
Паршина С.Н., к.б.н., с.н.с.		Лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания

Подготовку культур микроорганизмов коллекции UNIQEM к криоконсервации производят в соответствии со следующими процедурами.

1. Проверку культур микроорганизмов перед подготовкой к криоконсервации на аутентичность осуществляют согласно требованиям «Стандартной операционной процедуры по проверке аутентичности поддерживаемого фонда микроорганизмов», разработанной для ЦКП «Коллекция UNIQEM».
2. Выбор способа, условий и среды для криоконсервации осуществляют:
 - для штаммов в каталоге коллекции UNIQEM – по данным в Паспортах, размещенных на сайте коллекции <http://www.fbras.ru/services/ckp/tskp-kollektsiya-uniqem>;
 - для культур, предоставляемых на хранение/депонирование – по информации депозиторов, которая заносится в Паспорта;
 - для новых изолятов – по данным авторов, выделивших штамм; по литературным данным или по имеющемуся опыту успешной консервации и эффективного хранения для других близкородственных микроорганизмов.
3. Выращивание культур микроорганизмов осуществляют в соответствии со «Стандартной операционной процедурой по поддержанию штамма микроорганизма в живых культурах», разработанной для ЦКП «Коллекция UNIQEM».
4. Подготовка емкостей для криоконсервации
 - 4.1. Для криоконсервации используют стерилизованные пробирки или флаконы объемом 2 – 2.2 мл (пластиковые с крышками или пробками – для аэробов, стеклянные с металлической винтовой крышкой и резиновой прокладкой – для анаэробов).
 - 4.2. Стеклянные емкости с крышками (с или без добавления криопротекторной смеси) стерилизуют автоклавированием (1 атм, 30 мин); пластиковые пробирки стерилизуют таким образом при наличии гарантии производителя об устойчивости к этому режиму термообработки.
 - 4.3. Стерилизованные пластиковые пробирки или стеклянные флаконы (не менее 2-3 для каждой культуры) маркируют с указанием номера культуры и даты криоконсервации (месяц, год).

5. Подготовка криопротекторов

- 5.1. В зависимости от конкретного микроорганизма используют: либо 10% диметилсульфоксид (ДМСО), либо 15% глицерин (для некоторых штаммов), либо смесь 10% ДМСО с 15% глицерином. Не следует использовать глицерин для автотрофных микроорганизмов. Для криоконсервации вторичных анаэробов, сверхчувствительных к окислительному стрессу, рекомендовано добавление твердого носителя.
- 5.2. Криопротекторные растворы (смеси) разливают в стеклянные флаконы или пластиковые пробирки и стерилизуют в автоклаве при 1 атм, 30 мин.

6. Подготовка биомассы бактерий и архей

- 6.1. С поверхностных культур, выращенных на плотной среде в подходящих условиях, производят смыв раствором выбранного криопротектора (5 мл с культур в чашках Петри, 2 – 5 мл с культур на плотной среде в пробирках). Смытый материал (в виде суспензий) переносят в заранее подготовленные стерильные емкости. Все манипуляции (внесение раствора криопротектора, смыв, перенос с пробирки) осуществляют с соблюдением стерильных условий.
 - 6.2. Жидкие культуры добавляют в емкость, простерилизованную с необходимым количеством криопротектора и перемешивают.
 - 6.3. При наличии у данного микроорганизма покоящихся форм (спор, цист и др.) следует применять условия культивирования, способствующие максимально большому их выходу в поверхностных или жидких культурах.
7. Суспензию микроорганизмов с протектором разливают в необходимом объеме (от 0.5 мл – до полного объема емкости), закрывают крышками с соблюдением стерильных условий и сразу замораживают.
 8. Предварительную оценку эффективности сохранения штамма проводят по численности жизнеспособных клеток до консервации, сразу после консервации и через 1 мес хранения. Количество жизнеспособных клеток определяют посевом на чашки с плотными средами с последующим подсчетом колоний или методом предельных разведений в жидкой среде.

9. Культуры, в которых через 1 мес хранения в криоконсервированном виде численность жизнеспособность клеток составляет тот же порядок, что и до замораживания, и которые сохранили ключевые фенотипические признаки, обозначенные в Паспорте штамма, закладывают на длительное хранение.
11. Культуры штаммов, которые не выдерживают криоконсервации (1 мес хранения) после подготовки в выбранных условиях (с низкой численностью жизнеспособных клеток и/или с утраченными ключевыми признаками), поддерживают путем периодических пересевов. Для этих штаммов подбирают другие условия консервации в соответствии с рекомендациями депозитора или литературными источниками.
12. Эффективность длительного (1 год и далее) хранения штамма в криоконсервированном виде оценивают в соответствии со «Стандартной операционной процедурой контроля качества единиц хранения», разработанной для ЦКП «Коллекция UNIQEM».
13. Подготовка некоторых групп микроорганизмов к криоконсервированию может осуществляться в соответствии со специально разработанными и утвержденными Стандартными операционными процедурами.
14. В случае неудовлетворительной сохранности жизнеспособности клеток и ключевых признаков штамма в условиях криоконсервации руководствуются «Стандартной операционной процедурой по коррекции нарушений качества единиц хранения», разработанной для ЦКП «Коллекция UNIQEM».