

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИЭГМ УрО РАН,

д.м.н. профессор, чл.-корр. РАН

Демаков В.А.



«12» января 2017 г.

Стандартная операционная процедура по криоконсервации культур алканотрофных актинобактерий из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ)

Составители: к.б.н. Каменских Т.Н., к.б.н. Елькин А.А.

Дата обновления: 12 января 2017 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Руководитель Региональной профилированной
коллекции алканотрофных микроорганизмов,
зав. лаб. алканотрофных микроорганизмов,
д.б.н., профессор, академик РАН

Ившина И.Б.

«12» января 2017 г.

Пермь 2017

Наименование исследования. Применение метода криоконсервации (при минус 86 °С) коллекционных культур алканотрофных актинобактерий с учетом изученных структурных и физиолого-биохимических особенностей их клеток.

Назначение. Криоконсервация представляет собой замораживание бактериальных суспензий при температуре минус 86 °С. Способ обеспечивает гарантированное сохранение жизнеспособности и стабилизацию первоначальных свойств чистых идентифицированных детально охарактеризованных культур алканотрофных актинобактерий. Преимуществами метода являются исключение риска генетических изменений культур при долгосрочном хранении, малая вероятность заражения культуры, сохранение в стабильном состоянии исходных свойств микроорганизмов, небольшие временные и материальные затраты, а также возможность использовать замороженные образцы в качестве прямого инокулята.

Этап 1. Проверка коллекционных культур на аутентичность в соответствии с требованиями СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда алканотрофных актинобактерий.

Этап 2. Выращивание бактериальных культур на адекватных агаризованных питательных средах в оптимальных условиях, обозначенных в Каталоге Коллекции ИЭГМ (www.iegmc.org).

Этап 3. Бактериальные клетки, находящиеся в начале стационарной фазы роста, суспендируют с помощью микровстряхивателя в 10 мл дистиллированной воды до начальной концентрации порядка 10^8 – 10^9 клеток/мл.

Этап 4. Стерильные пластиковые криопробирки с винтовой крышкой объемом 2,0 мл (Simport) не менее 5 для каждой коллекционной культуры маркируют с указанием номера штамма и даты (месяц, год) криоконсервации.

Этап 5. В качестве криопротектора используют 20% глицерин, который разливают в стеклянные пробирки (20 мл) по 10 мл и стерилизуют автоклавированием при 1 атм. в течение 20 мин.

Этап 6. В стерильные криопробирки (не менее 5 для каждой культуры) разливают по 0,9 мл бактериальной суспензии, добавляют по 0,9 мл 20% глицерина и закрывают крышками.

Этап 7. Полученную бактериальную взвесь (0,1 мл) используют для определения жизнеспособности культуры перед криоконсервацией. При этом бактериальную взвесь помещают на поверхность агаризованной среды, обеспечивающей оптимальный рост культуры.

Этап 8. После 15-ти минутной эквilibрации заполненные криопробирки помещают в пластиковые коробки с ячейками и приступают к низкотемпературному охлаждению с помощью Морозильника сверхнизких температур (Sanuo, Япония).

Этап 9. Перед использованием замороженный образец размораживают при комнатной температуре и проверяют жизнеспособность культуры с помощью Респирометра (Columbus, США).

Помнить: необходимо приступить к низкотемпературному охлаждению как можно быстрее, ибо бактериальную суспензию в криопротекторных средах нельзя хранить при комнатной температуре длительное время.