

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 лиофилизации культур алканотрофных актинобактерий из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ)

Составители: к.б.н. Каменских Т.Н., аспирант Черемных К.М.
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 лиофилизации коллекционных культур алканотрофных актинобактерий с учетом изученных структурных и физиолого-биохимических особенностей их клеток.

Назначение. Лиофилизация представляет собой высушивание клеток из состояния замороженной суспензии в вакуумной камере лиофилизатора путем сублимации. Способ обеспечивает гарантированное сохранение жизнеспособности и стабилизацию первоначальных свойств чистых идентифицированных детально охарактеризованных культур алканотрофных актинобактерий. Преимущество метода заключается в снижении риска генетических изменений, что приводит к сохранению стабильном состоянии исходных свойств культур, возможности длительного сохранения микроорганизмов, удобстве при транспортировке. Недостатки метода – трудоемкость, требование специального оборудования, низкая технологичность, ибо лиофилизированные культуры не могут быть использованы сразу после регидратации – для восстановления их функциональной активности необходимо 2-3 пассажа в богатых питательных средах.

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.iegmcol).

Этап 3. Бактериальные клетки, находящиеся в начале стационарной фазы роста, суспендируют с помощью микровстряхивателя в 5 мл дистиллированной воды до начальной концентрации порядка 10^8 – 10^9 клеток/мл.

Этап 4. Чистые стеклянные ампулы для лекарственных средств объемом 3,0 мл марки ШПВ-3, не менее 20 для каждой коллекционной культуры, закрывают ватными тампонами, стерилизуют сухим жаром при 160 °С в течение 2 ч и маркируют с указанием номера штамма и даты (месяц, год) лиофилизации.

Этап 5. В качестве криопротектора используют стерильную сахарозо-желатино-агаровую среду (сахароза – 100 г, желатин – 15 г, агар-агар – 0,1 г, вода дистиллированная – 1000,0 мл).

Этап 6. В стерильные стеклянные ампулы (не менее 20 для каждой культуры) разливают по 0,1 мл бактериальной суспензии, добавляют по 0,1 мл сахарозо-желатино-агаровой среды и вновь закрывают ватными тампонами. Процедуру проводят в стерильных условиях.

Этап 7. Один образец бактериальной суспензии (0,1 мл) используют для определения жизнеспособности культуры перед лиофилизацией. При этом бактериальную взвесь помещают на поверхность агаризованной среды, обеспечивающей оптимальный рост культуры.

Этап 8. После 15-ти минутной эквilibрации содержимое ампулы замораживают путем погружения ее в жидкий азот (минус 196 °С).

Этап 9. Замороженные ампулы поочередно присоединяют к резиновым патрубкам на колонну лиофилизатора Alpha 1-2 LD при глубине вакуума не менее 0,12 mBar и высушивают в течение 24–30 ч.

Этап 8. По окончании сушки ампулы запаивают под вакуумом в области перетяжки с помощью газовой горелки.