



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ДОНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
(ДГТУ)**

«УТВЕРЖДАЮ»
Ректор ФГБОУ ВО «ДГТУ»
Б. Ч. Месхи
« » 2022 г.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО
МИКРОСКОПИРОВАНИЮ КУЛЬТУР И КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ
в «Южно-российской коллекции пробиотических микроорганизмов»
(ЮРКПМ)»**

Ростов-на-Дону
2022

РАЗРАБОТАНО

Вед. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

А.Б. Брень

« ____ » _____ 2022 г.

Гл. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

В.А. Чистяков

« ____ » _____ 2022 г.


Ст. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

М.С. Мазанко

« ____ » _____ 2022 г.

СОГЛАСОВАНО



Digitally signed by Michael Chikindas, Ph.D.
DN: cn=Michael Chikindas, Ph.D., o=Rutgers
University, ou=SEBS,
email=tchikind@sebs.rutgers.edu, c=US
Date: 2022.12.12 17:50:19 -05'00'

Заведующий НИЛ «ЦАБТ»

_____ подпись

М.Л. Чикиндас

« ____ » _____ 2022 г.

Проректор по НИРиИД


_____ подпись

И.Н. Ефременко

« ____ » _____ 2022 г.

ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ _____

РЕДАКЦИЯ _____



Микроскопические исследования суспензий клеток микроорганизмов методами просмотров в режимах светлое поле, темное поле, фазовый контраст осуществляют в соответствии со следующими процедурами.

1. Подготовка препаратов:

- 1.1 Используют чистые, обезжиренные и высушенные предметные стекла толщиной не более 1 мм и покровные стекла толщиной не более 0.17 мм.
- 1.2 При просмотрах препаратов с использованием объектива с маркировкой oil используют иммерсионное масло.
- 1.3 Для исследований живых (нефиксированных) клеток на предметное стекло наносят 3-5 мкл клеточной суспензии или культуры и плотно прижимают покровным стеклом. При необходимости на поверхность покровного стекла наносят иммерсионное масло.
- 1.4 Для исследований фиксированных клеток препарат наносят на предметное стекло, высушивают, и поверх высушенного образца наносят каплю иммерсионного масла. Препарат прижимают покровным стеклом.
- 1.5 Для исследований препаратов на мембранных фильтрах их кусочки помещают в каплю иммерсионного масла на предметном стекле, поверх фильтра наносят масло и прижимают покровным стеклом.
- 1.6 Обработку образцов клеток флуоресцентными красителями проводят в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Данная СОП не регламентирует процедуру окрашивания препаратов различными красителями и ограничивается описанием подготовки препарата с использованием популярного красителя.
 - 1.6.1. Пример подготовки препарата красителем Live/Dead для выявления целых и поврежденных клеток бактерий по зеленой и красной эпифлуоресценции, соответственно. Суспензию живых клеток объемом 5 мкл наносят на покровное стекло и смешивают с 5 мкл нанесенного раствора Live/Dead, который готовят и хранят согласно поставляемой инструкции. Смесь накрывают покровным стеклом и инкубируют 15 мин в темноте при 37 °С до начала просмотра. В случае работы с галофильными микроорганизмами, для которых недопустимо разбавление суспензии раствором красителя, подготовку препарата проводят следующим образом: 5 мкл раствора Live/Dead наносят на предметное стекло в определенной точке и высушивают при комнатной температуре в темноте до полного высыхания капли. Суспензию галофильных микроорганизмов объемом наносят в эту точку, прижимают покровным стеклом и инкубируют 15 мин в темноте перед просмотром.
 - 1.6.2. Подготовку препаратов с прокрашиванием акридиновым оранжевым, DAPI, picoGreen и т.д. осуществляют по специально разработанным процедурам.

2. Порядок работы со световым микроскопом с объективами для просмотров препаратов с увеличением $\times 40$, $\times 60$, $\times 100$ раз.

2.1. Включение:

2.1.1. Снять защитные колпаки на окулярах и на стекле проходящего света.

2.1.2. Включить микроскоп.

2.1.3. При просмотре в режиме эпифлуоресценции – включить блок питания люминисцентной лампы

2.2. Просмотр препарата в проходящем свете:

2.2.1. Поместить подготовленный препарат на предметный столик микроскопа под прижимными лапками напротив меток.

2.2.2. Выбрать нужный объектив и направить его на препарат, путём вращения револьвера с объективами.

2.2.3. Проверить соответствие выбранного метода микроскопии объективу и сверить маркировки объектива и режима, установленного на колесе предметного столика. Проверить наличие масла (для объективов с маркировкой "oil")

2.2.4. Открыть шторку лампы проходящего света на блоке управления микроскопа.

2.2.5. Переместить препарат под объектив с помощью направляющих ручек.

2.2.6. Сблизить стекло с препаратом и объектив до необходимого расстояния путем подъема предметного столика.

2.2.7. Настроить резкость препарата с помощью микро и макро винта смотря в окуляры

2.3. Просмотр препарата в отраженном свете (для просмотров в режиме эпифлуоресценции):

2.3.1. Включить блок питания люминисцентной лампы. Работу начинать только после окончания обратного отсчета на дисплее блока питания.

2.3.2. Поместить препарат подготовленный в соответствии с п.1.1, 1.2 или 1.3 на предметный столик микроскопа под прижимными лапками напротив меток.

2.3.3. Выбрать нужный объектив и направить его на препарат, путём вращения револьвера.

2.3.4. Проверить соответствие выбранного метода микроскопии объективу и сверить маркировки объектива и режима, установленного на колесе предметного столика. Проверить наличие масла для объективов с маркировкой "oil"

- 2.3.5. Выбрать фильтр для отраженного света с необходимой длиной волны.
- 2.3.6. Опустить защитную шторку перед объективом
- 2.3.7. Открыть шторку лампы отраженного света на блоке управления микроскопа.
- 2.3.8. Переместить под объектив препарат с помощью направляющих ручек.
- 2.3.9 Сблизить стекло с препаратом и объектив до необходимого расстояния путем подъема предметного столика.
- 2.3.10. Настроить резкость препарата, смотря в окуляры, с помощью микро- и макровинтов.

2.4. Окончание работы с микроскопом

- 2.4.1. Выключить питание люминисцентной лампы.
- 2.4.2. Выключить питание микроскопа.
- 2.4.3. Опустить предметный столик и выдвинуть его на себя.
- 2.4.4. Вынуть препарат из-под лапок столика
- 2.4.5. Протереть бумажной салфеткой объектив, если использовалось масло.
- 2.4.6. Накрыть окуляры и стекло проходящего света защитными колпаками.
- 2.4.7. Накрыть микроскоп чехлом.
- 2.4.8. Выключить компьютер.

3. Регистрация сеанса

После окончания работ в журнал заносят дату, время сеанса, сведения о препарате, ФИО пользователя и сотрудника, проводившего сеанс микроскопии.



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ДОНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
(ДГТУ)**

«УТВЕРЖДАЮ»
Ректор ФГБОУ ВО «ДГТУ»
Б. Ч. Месхи
« » 2022 г.

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО ПОДДЕРЖАНИЮ
ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА В ЖИВЫХ КУЛЬТУРАХ
в «Южно-российской коллекции пробиотических микроорганизмов»
(ЮРКПМ)»

Ростов-на-Дону
2022

РАЗРАБОТАНО

Вед. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

А.Б. Брень

« ____ » _____ 2022 г.

Гл. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

В.А. Чистяков

« ____ » _____ 2022 г.

Ст. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

М.С. Мазанко

« ____ » _____ 2022 г.

СОГЛАСОВАНО

Заведующий НИЛ «ЦАБТ»



Digitally signed by Michael Chikindas, Ph.D.
DN: cn=Michael Chikindas, Ph.D., o=Rutgers
University, ou=SEBS,
email=tchikind@sebs.rutgers.edu, c=US
Date: 2022.12.12 17:47:00 -05'00'

М.Л. Чикиндас

« ____ » _____ 2022 г.

Проректор по НИРиИД


_____ подпись

И.Н. Ефременко

« ____ » _____ 2022 г.

ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ _____

РЕДАКЦИЯ _____



Условием регистрации штамма в каталоге коллекции ЮРКПМ является гарантированное сохранение им жизнеспособности и ключевых признаков за счет поддержания путем периодических пересевов и/или обеспечения эффективного хранения. К поддержанию и/или хранению штамма могут быть привлечены профильные специалисты из других подразделений НИЛ ЦАБТ ДГТУ.

1. Проверку культур штамма на аутентичность проводят в соответствии со «Стандартной операционной процедурой по проверке аутентичности коллекционного фонда микроорганизмов», разработанной для «Коллекции ЮРКПМ».
2. Подбор методов и условий культивирования (тип и состав питательных сред, состав газовой атмосферы, температура, сроки инкубации и др.), производят:
 - для штаммов в каталоге коллекции ЮРКПМ – по данным в паспортах, размещенных на сайте коллекции <https://probioticdonstu.com/>;
 - для новых изолятов – по данным литературных источников или авторов, выделивших штамм.
3. Культуры бактерий выращивают до образования хорошо различимых колоний (на плотных средах, в том числе, селективных) или достижения стационарной фазы (в жидких культурах).
4. Штаммы аэробных бактерий, растущие в поверхностных культурах, поддерживают на скошенных плотных средах в пробирках (3-4 мл среды в пробирке на 20 мл) с периодичностью пересевов 3-4 раза в год (или чаще при необходимости). Рекомендовано производить пересев культур методом истощающего штриха на плотной среде в чашках Петри.
5. Штаммы анаэробных микроорганизмов выращивают на средах и в условиях, обеспечивающих отсутствие кислорода: в стеклянных флаконах или пробирках Хангейта с резиновыми пробками и завинчивающимися крышками с заменой воздуха, например, на N_2 , или N_2/CO_2 , или CO_2 , или H_2/CO_2 и др. (в зависимости от метаболизма анаэробных микроорганизмов). В большинстве случаев облигатные анаэробы поддерживают в жидких культурах на средах с восстановителем

(сульфид, дитионит, цистеин) в пробирках Хангейта под инертной газовой фазой (азот/CO₂ или аргон).

6. Штаммы бактерий, поддающиеся культивированию только в жидких средах, поддерживают в виде клеточных суспензий в пробирках (3-4 мл культуры в пробирке на 20 мл – для аэробов или по технике Хангейта – для анаэробов). Культивирование штамма проводят с учетом его специфики, представленной в Паспорте. Частота пересевов не менее 4 раз в год или чаще в зависимости от сохранения штаммом способности к возобновлению роста.
7. Штаммы культур, нуждающиеся в определённом составе газовой фазы, поддерживают в виде клеточных суспензий в герметично закрытых флаконах с объемом жидкой среды 1/5 объема флакона с коррекцией газовой фазы.
8. Пробирки с культурами бактерий, выросших на(в) плотных или жидких средах, хранят в холодильных установках при 4 °С или иных, подходящих для данного штамма температуре.
9. Не допускается высыхание плотной среды с поверхностно выросшей культурой или клеточной суспензии при хранении. Для предотвращения высыхания культур аэробов на скошенной плотной среде, после выращивания под ватными пробками пробирки перезатыкают стерильными резиновыми пробками и помещают в таком виде для хранения.
10. При разливке расплавленных плотных питательных сред в пробирки или чашки Петри следует избегать образования большого количества конденсата (рекомендуемая температура расплавленной среды перед разлитием 42 – 44 °С). Допустимо выдерживать чашки с открытой крышкой на 3 мин после разлива среды в ламинарном боксе.
11. Хранение штамма в виде культур на плотной среде в чашках Петри, особенно пластиковых, не рекомендуется. В случае такого хранения чашки запечатывают парафильмом и хранят в перевернутом виде в пластиковых пакетах.

12. Эффективность сохранения штамма, поддерживаемого периодическими пересевами, оценивают по способности к возобновлению роста после инокулирования на плотной или жидкой среде и сохранению ключевых фенотипических признаков.
13. Поддержание некоторых групп микроорганизмов может осуществляться в соответствии со специально разработанными и утвержденными Стандартными операционными процедурами.
14. Оценка качества единиц хранения проводят в соответствии со «Стандартной операционной процедурой контроля качества единиц хранения», разработанной для «Коллекции ЮРКПМ».
15. В случае неудовлетворительной сохранности жизнеспособных клеток руководствуются «Стандартной операционной процедурой по коррекции нарушений качества единиц хранения», разработанной для «Коллекции ЮРКПМ».



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ДОНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
(ДГТУ)**



«УТВЕРЖДАЮ»
Ректор ФГБОУ ВО «ДГТУ»

Б.Ч. Месхи

« _____ » _____ 2022 г.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО ВЫДЕЛЕНИЮ
ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРИРОДНЫХ
ИСТОЧНИКОВ**
в «Южно-российской коллекции пробиотических микроорганизмов»
(ЮРКПИМ)»

Ростов-на-Дону
2022

РАЗРАБОТАНО

Вед. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

А.Б. Брень

« ____ » _____ 2022 г.

Гл. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

В.А. Чистяков

« ____ » _____ 2022 г.

Ст. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

М.С. Мазанко

« ____ » _____ 2022 г.

СОГЛАСОВАНО



Digitally signed by Michael Chikindas, Ph.D.
DN: cn=Michael Chikindas, Ph.D.,
o=Rutgers University, ou=SEBS,
email=tchikind@sebs.rutgers.edu, c=US
Date: 2022.12.12 17:49:49 -05'00'

Заведующий НИЛ «ЦАБТ»

_____ подпись

М.Л. Чикиндас

« ____ » _____ 2022 г.

Проректор по НИРиИД


_____ подпись

И.Н. Ефременко

« ____ » _____ 2022 г.

ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ _____

РЕДАКЦИЯ _____



Выделение штаммов микроорганизмов (изолятов) из природных источников осуществляют в соответствии со следующими процедурами.

1. Источниками для выделения микроорганизмов являются образцы:
 - содержимого кишечника животных;
 - подстилки, мест содержания животных;
 - почв;
 - растений;
 - кормовых и пищевых продуктов;
 - водных экосистем;
 - грунтов и донных отложений;
 - антропогенных экосистем;
 - других экосистем.
2. Образцы отбирают с соблюдением техники асептического отбора проб в стерильные емкости с плотно привинчивающимися крышками для исключения контаминации посторонней микробиотой. 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.
- фототрофных микроорганизмов: среды, аналогичные средам для гетеротрофных или литотрофных прокариот, но инкубируемые на свету различного спектра.
- анаэробных прокариот: наличие в составе питательных сред восстановителя/антиоксиданта (Na_2S , дитионита, цистеина и др.).

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

- мезофильных: 20 - 40°C
- термофильных (в том числе, умеренно-термофильных): 40°C - 80°C

8. 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 N_2 , или N_2/CO_2 , или CO_2 , или Ar, или H_2/CO_2 и др. (в зависимости от метаболизма анаэробных микроорганизмов);
- микроаэробов: уровень кислорода менее 2% (от 0.2 до 2%);

10. Другие требования

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

11. 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 посевы на плотных питательных средах – до появления различимых колоний (визуально, либо под биноклем).

12. 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, солёности, рН, 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.

13. 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 (16S рРНК), house-keeping генов, а также полногеномных последовательностей.
- результатам гибридизации со специфичными олигонуклеотидными зондами, мечеными люминесцентными красителями (в ряде случаев);

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

15. Поддержание, подготовку к хранению, контроль качества хранения, коррекцию нарушений качества хранения выделенного штамма осуществляют согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам, разработанным для «Коллекции ЮРКПМ».



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ДОНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
(ДГТУ)**

**«УТВЕРЖДАЮ»**
Ректор ФГБОУ ВО «ДГТУ»
Б.Ч. Месхи
« ____ » _____ 2022 г.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА КОРРЕКЦИИ
КАЧЕСТВА ЕДИНИЦ ХРАНЕНИЯ
в «Южно-российской коллекции пробиотических микроорганизмов»
(ЮРКПМ)»**

Ростов-на-Дону
2022

РАЗРАБОТАНО

Вед. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

А.Б. Брень

« ____ » _____ 2022 г.

Гл. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

В.А. Чистяков

« ____ » _____ 2022 г.

Ст. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

М.С. Мазанко

« ____ » _____ 2022 г.

СОГЛАСОВАНО

Заведующий НИЛ «ЦАБТ»




Digitally signed by Michael Chikindas, Ph.D.
DN: cn=Michael Chikindas, Ph.D., o=Rutgers
University, ou=SEBS,
email=tchikind@sebs.rutgers.edu, c=US
Date: 2022.12.12 17:49:19 -05'00'

М.Л. Чикиндас

« ____ » _____ 2022 г.

_____ подпись

Проректор по НИРиИД


_____ подпись

И.Н. Ефременко

« ____ » _____ 2022 г.

ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ _____

РЕДАКЦИЯ _____



Коррекцию нарушений качества единиц хранения в коллекции ЮРКПМ осуществляют по следующим процедурам.

1. Основанием выбора единиц хранения, подлежащих замене, является их несоответствие одному из нижеперечисленных требований:
 - полной сохранности емкости хранения и находящегося внутри нее материала;
 - удовлетворительной сохранности жизнеспособности;
 - сохранности всех ключевых фенотипических признаков;
2. В случае выявления единиц хранения с нарушенной сохранностью емкости и находящегося материала осуществляют:
 - выбор дубликатов единиц хранения того же штамма, у которых полностью сохранена емкость и материал;
 - стерильный отбор инокулята из неповрежденных единиц хранения;
 - выращивание, поддержание и подготовку культуры к хранению в соответствии с разработанными Стандартными операционными процедурами;
 - восстановление не менее того же числа единиц хранения (3 – 5);
3. Коррекция нарушений эффективности сохранения жизнеспособности включает следующие процедуры.
 - 3.1. Выявление оптимального (из имеющихся) способа дальнейшего поддержания/хранения штамма.
 - 3.2. В случае неудовлетворительной сохранности жизнеспособности штаммом, не зависящей от применяемого способа поддержания/хранения проводят:
 - подбор индивидуальных условий для восстановления способности к росту по литературным данным, имеющемуся опыту восстановления этого или близкородственного микроорганизма, рекомендациям депозиторов и ответственных за поддержание штамма;
 - общие рекомендации к восстановлению ростовой активности штамма:
 - отмывка клеток от жидкой среды и ресуспендирование в новой среде перед посевом;
 - пересев на разбавленные плотные и жидкие среды;
 - посев в полужидкий агар;
 - инкубация высушенного материала в водных растворах в присутствии добавок;

- добавление аминокислот, сахаров, антиоксидантов в отмытые клеточные суспензии и/или питательные плотные и жидкие среды;
 - иные подходы, известные в зарубежной литературе как resuscitation.
 - сведения о необходимости применения специальных процедур и самих процедурах восстановления ростовой активности штамма (единицы хранения) обязательно заносят в Паспорт штамма.
4. Коррекция нарушений эффективности сохранения ключевых признаков штамма (единицы хранения) включает следующие процедуры:
- проверку дубликатов единиц хранения на наличие всех ключевых признаков путем посевов на соответствующие среды;
 - в случае утраты ключевого признака независимо от формы поддержания/хранения штамма – осуществляют подбор индивидуальных условий для восстановления признака, исходя из литературных данных, имеющегося опыта для этого или близкородственного микроорганизма, рекомендаций депозиторов и ответственных за поддержание штамма;
 - применение специальных подходов к восстановлению ключевых признаков штамма, которые являются индивидуальными и могут включать:
 - посев на специальные среды или инкубацию в условиях, способствующих проявлению этого признака;
 - модификацию питательных сред (например, для повышения выхода спор);
 - создание селективных условий роста и развития микробных культур;
 - сведения о возможности утраты определенного признака и возможности его восстановления обязательно заносят в Паспорт штамма.
5. В случае невозможности коррекции нарушений качества штамма, утратившего жизнеспособность, он подлежит изъятию из каталожного фонда коллекции ЮРКПМ.
6. В случае необратимой утраты какого-либо ключевого признака, но сохранении остальных важных свойств обязательно осуществляют исключение/корректировку соответствующего описания в Паспорте штамма.



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ДОНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
(ДГТУ)**

«УТВЕРЖДАЮ»
Ректор ФГБОУ ВО «ДГТУ»
Б. Ч. Месхи
« » 2022 г.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА
ЕДИНИЦ ХРАНЕНИЯ
в «Южно-российской коллекции пробиотических микроорганизмов»
(ЮРКПМ)»**

Ростов-на-Дону
2022

РАЗРАБОТАНО

Вед. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

А.Б. Брень

« ____ » _____ 2022 г.

Гл. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

В.А. Чистяков

« ____ » _____ 2022 г.

Ст. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

М.С. Мазанко

« ____ » _____ 2022 г.

СОГЛАСОВАНО

Заведующий НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

Digitally signed by Michael Chikindas, Ph.D.
DN: cn=Michael Chikindas, Ph.D.,
o=Rutgers University, ou=SEBS,
email=tchikind@sebs.rutgers.edu, c=US
Date: 2022.12.12 17:48:25 -05'00'

М.Л. Чикиндас

« ____ » _____ 2022 г.

Проректор по НИРиИД


_____ подпись

И.Н. Ефременко

« ____ » _____ 2022 г.

ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ _____

РЕДАКЦИЯ _____



Контроль качества единиц хранения микроорганизмов в виде периодически пересеваемых живых культур или консервированных культур микроорганизмов коллекции ЮРКПМ осуществляют по следующим процедурам.

1. Емкости с периодически пересеваемыми или консервированными культурами микроорганизмов с повреждениями, трещинами, с неплотно закупоренными пробками, большим количеством конденсата, высохшей жидкой или плотной средой (за исключением лиофильно высушенных культур) подлежат замене на качественный образец.
2. Замену единицы хранения штамма осуществляют путем выращивания культур с использованием в качестве инокулята образцов из неповрежденных дубликатов единиц хранения.
3. Сохранение жизнеспособности штамма оценивают по способности к возобновлению роста на плотной среде - для культур на скошенной плотной среде, или по численности колониеобразующих единиц (КОЕ) или жизнеспособных клеток (по методу предельных разведений) - для жидких культур и суспензий;
4. Сохранение жизнеспособности штаммом, заложенным на длительное хранение в криоконсервированном виде, определяют с периодичностью 1 раз в год в течение 3 лет, а далее - 1 раз в течение 3 лет.
5. Сохранение ключевых фенотипических признаков проверяют путем сопоставления характеристик, указанных в Паспорте, с характеристиками, выявленными при оценке жизнеспособности единицы хранения.
6. Неизменными должны быть следующие ключевые фенотипические признаки:
 - морфология колоний (в случае проявления фенотипической диссоциации с изменением свойств необходимо доказывать аутентичность);
 - морфология клеток;
 - физиологические характеристики (рост в определенных условиях, устойчивость, диапазоны и оптимумы роста).



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ДОНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
(ДГТУ)**

«УТВЕРЖДАЮ»
Ректор ФГБОУ ВО «ДГТУ»

Б. Ч. Месхи
« _____ » _____ 2022 г.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО ПРОВЕРКЕ
АУТЕНТИЧНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННОГО ФОНДА МИКРООРГАНИЗМОВ
в «Южно-российской коллекции пробиотических микроорганизмов»
(ЮРКПМ)»**

Ростов-на-Дону
2022

РАЗРАБОТАНО

Вед. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

А.Б. Брень

« ____ » _____ 2022 г.

Гл. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

В.А. Чистяков

« ____ » _____ 2022 г.

Ст. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

М.С. Мазанко

« ____ » _____ 2022 г.

СОГЛАСОВАНО

Заведующий НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

Digitally signed by Michael Chikindas, Ph.D.
DN: cn=Michael Chikindas, Ph.D.,
o=Rutgers University, ou=SEBS,
email=tchikind@sebs.rutgers.edu, c=US
Date: 2022.12.12 17:47:59 -05'00'

М.Л. Чикиндас

« ____ » _____ 2022 г.

Проректор по НИРиИД


_____ подпись

И.Н. Ефременко

« ____ » _____ 2022 г.

ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ _____

РЕДАКЦИЯ _____



Проверку аутентичности штаммов (единиц хранения) коллекционного фонда микроорганизмов проводят по следующим процедурам.

1. Штамм (единица хранения) подлежит проверке на аутентичность при:

- введении в коллекционный фонд;
- подготовке к криоконсервации или хранению в лиофильно-высушенном состоянии;
- неполноте сведений о таксономической принадлежности штамма и его характеристиках;
- коррекции качества единиц хранения, особенно в случае восстановления из минимально поврежденной емкости хранения;
- длительном поддержании/хранении, особенно для культур, описанных только по фенотипическим характеристикам;
- достоверной и стабильной утрате какого-либо ключевого признака при пересевах или длительном хранении;
- варьировании колониально-морфологических признаков (возможном проявлении фенотипической variability);
- при подозрении на загрязнение после оживления из глубокой заморозки.

2. Проверку на аутентичность штамма (единицы хранения) осуществляют по:

- наличием характерной морфологии колоний, выросших после засева питательной среды, оптимальной для роста данного штамма, и инкубации в подходящих условиях; наличие колоний иного типа часто, но не всегда, является признаком смешанной культуры;
- отсутствию посторонней микробиоты (например, спор в культурах неспорообразующих бактерий и архей, грам-отрицательных палочек в суспензиях спор и т.д.), выявляемому при микроскопировании самих единиц хранения штамма и выросших из них культур.
- соответствию ключевых фенотипических признаков указанным в Паспорте штамма.

3. Проверку аутентичности на уровне рода осуществляют молекулярно-генетическими методами с анализом последовательности амплифицированного гена 16S рРНК и ее сопоставлением с задепонированной в базе данных GenBank.

или приведенной в Паспорте (в случае отсутствия в GenBank) последовательностью. Для проверки аутентичности используют дополнительные методы: ДНК-ДНК гибридизацию, риботипирование (рестрикционные фрагменты рРНК оперон), протеомный анализ с использованием MALDI-TOF.

4. Заключение об аутентичности делают на основании соответствия выявленных в тестах характеристик свойствам, приведенным для штаммов в каталоге коллекции ЮРКПМ – в паспортах, размещенных на сайте коллекции <https://probioticdonstu.com/>
5. В случае отсутствия аутентичности штамма, поддерживаемого пересевами или хранящегося в виде консервированных образцов, исходному штамму он подлежит изъятию из каталожного фонда коллекции ЮРКПМ.



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ДОНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
(ДГТУ)**

«УТВЕРЖДАЮ»
Ректор ФГБОУ ВО «ДГТУ»

Б. Ч. Месхи
« » _____ 2022 г.

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО ПОДДЕРЖАНИЮ
ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА В ЖИВЫХ КУЛЬТУРАХ
в «Южно-российской коллекции пробиотических микроорганизмов»
(ЮРКПМ)»

Ростов-на-Дону
2022

РАЗРАБОТАНО

Вед. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

А.Б. Брень

« ____ » _____ 2022 г.

Гл. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

В.А. Чистяков

« ____ » _____ 2022 г.

Ст. науч. сотрудник НИЛ «ЦАБТ»


_____ подпись

М.С. Мазанко

« ____ » _____ 2022 г.

СОГЛАСОВАНО

Заведующий НИЛ «ЦАБТ»



_____ подпись

Digitally signed by Michael Chikindas, Ph.D.
DN: cn=Michael Chikindas, Ph.D., o=Rutgers
University, ou=SEBS,
email=tchikind@sebs.rutgers.edu, c=US
Date: 2022.12.12 17:47:28 -05'00'

М.Л. Чикиндас

« ____ » _____ 2022 г.

Проректор по НИРиИД


_____ подпись

И.Н. Ефременко

« ____ » _____ 2022 г.

ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ _____

РЕДАКЦИЯ _____



Подготовку культур микроорганизмов «Южно-российской коллекции пробиотических микроорганизмов» (ЮРКПМ) 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 «Коллекции ЮРКПМ».
2. Выбор способа, условий и среды для криоконсервации осуществляют:
 - для штаммов в каталоге «Коллекции ЮРКПМ» – по данным в Паспортах, размещенных на сайте коллекции <https://probioticdonstu.com/>;
 - 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 «Коллекции ЮРКПМ».
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
- 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). Смывтый 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) 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 «Коллекции ЮРКПМ».
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 «Коллекции ЮРКПМ».