



Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН (КММ)
Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (ТИБОХ ДВО РАН)

№: СОП-004	Дата создания: 21 августа 2017	Версия No: V 2.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 1 из 6
---------------	-----------------------------------	----------------------	----------------------------------	-------------

Стандартная операционная процедура «Идентификация штаммов бактерий и грибов по морфологическим и физиологическим характеристикам в Коллекции морских микроорганизмов»

СОП-004

УТВЕРЖДАЮ
И.о. директора ТИБОХ ДВО РАН, к.б.н.
Черников О.В.

14.10.2021 г.

Место нахождения документа: Электронная копия: Лаборатория микробиологии, серверный компьютер, диск D, папка «СОПы» Бумажная копия: Лаборатория микробиологии, комната 514, папка «СОПы»		
Документ подготовлен: к.б.н. Куриленко В.В.  14.10.2021	Документ проверен: зав. ЛМБХ, к.м.н. Исаева М.П.  14.10.2021	Документ согласован: чл.-корр., д.б.н. Михайлов В.В.  14.10.2021

Владивосток 2021



№: СОП-004	Дата создания: 21 августа 2017	Версия №: V 2.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 2 из 6
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	-------------

1. ВВЕДЕНИЕ

Стандартная операционная процедура «Идентификация штаммов бактерий и грибов по морфологическим и физиологическим характеристикам в Коллекции морских микроорганизмов» - СОП-004 содержит протоколы для определения таксономической принадлежности штаммов микроорганизмов с использованием морфологических и физиологических методов.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Стандартная операционная процедура разработана для стандартизации процессов идентификации штаммов грибов и бактерий из КММ ТИБОХ ДВО РАН.

Данный документ может быть использован сотрудниками лаборатории, выполняющими данную процедуру, а также для обучения нового персонала.

3. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНА ТРУДА

Следование правилам техники безопасности и санитарного режима на рабочем месте является неукоснительным требованием для соблюдения всем персоналом, допущенным к работе в лаборатории.

В лаборатории имеется комплект инструкций по технике безопасности по каждому виду лабораторных работ. Ответственность за организацию безопасных условий труда в лаборатории возлагается в соответствии с приказом по учреждению на руководителя соответствующего подразделения или специально назначенное ответственное лицо.

Каждый сотрудник получает первичный инструктаж по технике безопасности при приеме на работу или возвращении к данному виду деятельности после длительного перерыва. Повторный плановый инструктаж проводят ежегодно, а внеплановый – при возникновении аварийных ситуаций или по распоряжению администрации учреждения. О прохождении инструктажа и допуске к самостоятельной работе в лаборатории делают отметку под роспись сотрудника в «Журнале проведения инструктажа по технике безопасности».



№: СОП- 004	Дата создания: 21 августа 2017	Версия №: V 2.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 3 из 6
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	-------------

4. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ПЕРСОНАЛА

Сотрудники лаборатории несут персональную ответственность за выполнение ими правил техники безопасности, соблюдение санитарного и противопожарного режимов на рабочем месте.

Сотрудникам лаборатории запрещено без разрешения руководителя подразделения выносить за пределы рабочей зоны исследуемые образцы и рабочую документацию лаборатории.

Сотрудники лаборатории обеспечивают качественное выполнение подготовки образцов к исследованиям, соблюдают правила проведения всех этапов проведения исследования и своевременно предоставляют результаты исследований в соответствии с разработанными условиями (заполнение рабочего журнала, ведение электронной отчетности). Сотрудники лаборатории рационально используют реактивы и расходные материалы, обеспечивают сохранность лабораторного оборудования и лабораторных образцов на всех этапах исследования.

5. ПРОЦЕДУРА

В качестве биологического материала для исследования используются культуры микроорганизмов.

5.1. Общие положения

Работа с культурами микроорганизмов проводится в боксе биологической безопасности во избежание загрязнения помещения и последующей контаминации образцов.

Подготовку бокса проводят до начала работ, обеззараживание – по их окончании в соответствии с правилами санитарного режима в подразделении.

5.2. Идентификация штаммов микроорганизмов из КММ ТИБОХ ДВО РАН

5.2.1. Идентификация бактерий

Макроморфологические признаки

Основными диагностическими культуральными (макроморфологическими) признаками бактерий являются характерные особенности роста на плотных и жидких питательных средах, к которым относятся:

№: СОП- 004	Дата создания: 21 августа 2017	Версия №: V 2.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 4 из 6
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	-------------

При росте на поверхности агаризованных сред:

- размер колонии
- форма колоний
- поверхность колоний
- профиль колоний
- наличие блеска и прозрачности колоний
- цвет колонии
- окраска питательной среды при наличии
- строение края и центра колоний
- структура колоний
- консистенция колоний

Рост в жидких питательных средах проявляется в виде помутнения, образования осадка или пленки. По типу роста характеризуют: степень помутнения, характер осадка, особенности пленки.

Микроморфологические признаки

Морфологические признаки бактерий выявляются при световой микроскопии. Для исследования готовится препарат, для чего на предметное стекло наносят каплю воды, помещают в нее исследуемый материал или каплю культуры, выращенную на жидкой питательной среде. Препарат покрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Основными диагностическими микроморфологическими признаками являются:

- форма клеток
- размер клеток
- при наличии спор: форма, диаметр спор, расположение спор в клетке
- наличие подвижности клеток
- тип жгутикования
- наличие включений и их описание

Физиолого-биохимические свойства

№: СОП– 004	Дата создания: 21 августа 2017	Версия №: V 2.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 5 из 6
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	-------------

Характеристика физиолого-биохимических свойств бактерий при проверке аутентичности культур включает в себя набор тестов, являющихся идентификационными для каждого представителя. К таким тестам относятся:

- использование различных соединений углерода
- использование соединений азота
- использование соединений серы
- отношение к молекулярному кислороду
- отношение к NaCl
- ферментативная активность по отношению к определенным субстратам
- потребность в факторах роста

Для характеристики физиолого-биохимических свойств бактерий используются API-системы (Франция).

5.2.2. Идентификация грибов

Идентификация микроскопических грибов проводится на основании культурально-морфологических признаков с использованием различных определителей.

Макроморфологические признаки

Основными диагностическими культуральными признаками мицелиальных грибов, выявляемых при изучении внешнего вида колонии являются:

- размер колонии
- окраска колонии
- окраска обратной стороны (реверса) колонии
- строение края и центра
- характер поверхности
- наличие эксудата
- наличие и характер запаха
- наличие и характер репродуктивных органов

№: СОП- 004	Дата создания: 21 августа 2017	Версия №: V 2.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 6 из 6
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	-------------

Микроморфологические признаки

Морфологические признаки мицелиальных грибов выявляются при световой микроскопии. Для выявления спороношения культуры производится микроскопия непосредственно на чашке Петри с использованием микроскопов типа МБС-1 (отраженный свет, увеличение от 16х до 50х) или «Эргавал» (Carl Zeiss Jena) (проходящий свет, увеличение от 15х до 400х).

Для дальнейшего исследования готовится препарат, для чего на предметное стекло наносят каплю воды или 0,1% раствора уксусной кислоты, помещают в нее исследуемый материал. Препарат накрывают покровным стеклом, с помощью фильтровальной бумаги удаляют излишки жидкости. Исследование проводят сначала при малом увеличении, затем при большом увеличении. Основными диагностическими морфологическими признаками мицелиальных грибов, выявляемых при микроскопии, являются:

- тип конидеобразования
- размер и форма конидиальных структур
- размер конидий, аскоспор или базидиоспор
- форма конидий, аскоспор или базидиоспор
- окраска конидий, аскоспор или базидиоспор
- поверхность конидий, аскоспор или базидиоспор
- количество клеток в конидии, аскоспоре, тип перегородок