

ННЦМБ ДВО РАН	СОП №	
	Версия	
Биоресурсный центр "Морской Биобанк"	Заменяет	
	Действительно с	

## СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА

**НАЗВАНИЕ: Приготовление среды F/2 для культивирования микроводорослей**

### Разработчики

	ФИО	Должность	Подпись
Подготовил	Литвинова Н.Г.	ведущий инженер	
Утвердил	Орлова Т.Ю.	Зам. директора ННЦМБ ДВО РАН по научной работе	

### I. Цель и сфера применения:

Стандартизация процессов приготовления среды F/2.

Настоящая операционная процедура разработана для сотрудников ННЦМБ ДВО РАН.

### II. Безопасность:

При работе с автоклавом соблюдать технику безопасности и иметь допуск для работы. Соблюдать осторожность при включённой ультрафиолетовой лампе в ламинарном боксе. Соблюдать правила работы с зажжённой спиртовкой.

### III. Материалы и оборудование необходимо для приготовления 1 литра среды F2:

	Наименование	Количество	Примечания
1.	Электронный настольный автоклав	1 шт.	Ватты – 2200 W Дистиллированной воды – 3 л, Объем резервуара – 3 л, Модель – 2540EKA, Производитель: Tuttnauer Инв №М000459706-3
2.	Ламинарный бокс	1 шт.	Модель – SafeFAST Elite-S/D Инв №1013400141
3.	Весы	1 шт	Модель ScoupPro Инв №М000459464
4.	Дистиллятор	1 шт	Модель GFL-2004 Инв №М00459455-3

НИЦМБ ДВО РАН	СОП №	
	Версия	
Биоресурсный центр "Морской Биобанк"	Заменяет	
	Действительно с	

5.	Холодильник	1 шт	Инв №000459640
6.	Автоматическая пипетка-дозатор 100-1000 мкл	1 шт.	Автоматический одноканальный дозатор ResearchPlus переменного объема (100-1000 мкл). Производитель – Biohit
7.	Автоматическая пипетка-дозатор 50-200 мкл	1 шт.	Автоматический одноканальный дозатор ResearchPlus переменного объема (50-200 мкл). Производитель – Biohit
8.	Наконечники объемом 1000 мкл (1000µl)	3 штуки	Наконечники, стерильные, до 1000 мкл, бесцветные.
9.	Наконечники объемом 200 мкл (200 µl)	5 штук	Наконечники, стерильные, до 200 мкл, бесцветные.
10.	Фальконы пластиковые, градуированные, с закручивающейся крышкой на 15 мл	5 шт	
11.	Фальконы пластиковые, градуированные, с закручивающейся крышкой на 50 мл	3шт	
12.	Бутылки из тефлона объёмом 1 л	1 шт	NALGEN
13.	Спиртовка	1 шт	
14.	Пластиковые одноразовые чайные ложки	9 штук	пищевые
15.	Медицинский халат	1 шт.	
16.	Асептическая жидкость	13 мл	75% спирт
17.	Дистиллированная вода для заправки автоклава	3 литра	
18.	Дистиллированная вода для приготовления растворов	200 мл	
19.	Натрий азотнокислый (NaNO <sub>3</sub> )		Финальная концентрация в среде 8,82 x 10 <sup>-4</sup> М
20.	Фосфат натрия однозамещённый водный (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)		Финальная концентрация в среде 3,62 x 10 <sup>-5</sup> М
21.	Железа хлорид (III), 6-водный, 99% чистота, гранулированный, (FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O)		Финальная концентрация в среде 1,17 x 10 <sup>-5</sup> М
22.	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O (ЭДТА, C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )		Финальная концентрация в среде 1,17 x 10 <sup>-5</sup> М
23.	Медь сернокислая водная (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)		Финальная концентрация в среде 3,93 x 10 <sup>-8</sup> М

НИЦМБ ДВО РАН	СОП №	
	Версия	
Биоресурсный центр "Морской Биобанк"	Заменяет	
	Действительно с	

24.	Натрий молибденовокислый водный ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )		Финальная концентрация в среде $2,60 \times 10^{-8}\text{M}$
25.	Цинк сернокислый водный ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )		Финальная концентрация в среде $7,65 \times 10^{-8}\text{M}$
26.	Кобальт хлористый водный ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )		Финальная концентрация в среде $4,20 \times 10^{-8}\text{M}$
27.	Марганец хлористый водный ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )		Финальная концентрация в среде $9,10 \times 10^{-7}\text{M}$

#### IV. Общие положения

1. Для приготовления среды используют природную фильтрованную морскую воду солёностью не менее 30‰, предварительно проавтоклавируемую и охлаждённую.
2. Для приготовления сред используют бутылки из тефлона, объемом 1 л.
3. Растворы для среды готовят на основе бидистиллированной воды.
4. Навески солей, во избежание загрязнения реактивов, каждый раз берут новыми чистыми одноразовыми ложками.
4. Готовые растворы солей автоклавируют по отдельности и охлаждают, после чего их можно использовать для приготовления среды в течение месяца при условии хранения в тёмном месте при температуре 4-8<sup>0</sup>С.
5. Каждый сосуд с компонентом среды должен быть плотно закрыт крышкой и снабжён этикеткой с указанием состава, концентрации и времени приготовления.
6. Перед работой в ламинарном боксе необходимо включить УФ-лампу минимум на 20 минут. Рабочую поверхность обработать спиртом.
7. Во избежание заражения среды микроорганизмами, все компоненты вносят в морскую воду возле зажжённой спиртовки.

#### V. Описание

1. Приготовление исходного раствора металлов:
  - 1.1 Взвесить на электронных весах 0,098 гр  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Пересыпать соль в градуированный фалькон объемом 15 мл и добавить дистиллированной воды до объёма 10 мл.
  - 1.2. Взвесить на электронных весах 0,063 гр  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Пересыпать соль в градуированный фалькон объемом 15 мл и добавить дистиллированной воды до объёма 10 мл.
  - 1.3. Взвесить на электронных весах 0,22 гр  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Пересыпать соль в градуированный фалькон объемом 15 мл и добавить дистиллированной воды до объёма 10 мл.
  - 1.4. Взвесить на электронных весах 0,1 гр  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Пересыпать соль в градуированный фалькон объемом 15 мл и добавить дистиллированной воды до объёма 10 мл.

НИЦМБ ДВО РАН	СОП №	
	Версия	
Биоресурсный центр "Морской Биобанк"	Заменяет	
	Действительно с	

1.5. Взвесить на электронных весах 1,8 гр  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ . Пересыпать соль в градуированный фалькон объемом 15 мл и добавить дистиллированной воды до объема 10 мл.

1.6. Взвесить на электронных вес 0,218 гр  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ . Пересыть соль в градуированный фалькон объемом 50 мл и добавить дистиллированной воды до объема 35 мл. Плотнo закрыть пробирку и взболтать до полного растворения соли.

1.7. Взвесить на электронных весах 0,158 гр  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ . Пересыпать соль в фалькон с раствором  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ . Плотнo закрыть пробирку и взболтать до полного растворения соли.

1.8. К полученному раствору  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$  и  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  с помощью автоматической пипетки-дозатора на 50-200 мкл, внести по 50 мкл каждого раствора металлов:  $CuSO_4$ ,  $Na_2MoO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $CoCl_2$ ,  $MnCl_2$ . Каждый раствор вносить новым чистым наконечником на 200 мкл.

1.9. Полученный раствор металлов довести до объема 50 мл, добавляя дистиллированную воду.

2. Приготовление расвтора  $NaNO_3$ . Взвесить на электронных весах 3,75 гр  $NaNO_3$ . Пересыпать соль в градуированный фалькон объемом 50 мл и добавить дистиллированной воды до объема 50 мл.

3. Приготовление раствора  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ . Взвесить на электронных весах 0,25 гр  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ . Пересыпать соль в градуированный фалькон объемом 50 мл и добавить дистиллированной воды до объема 50 мл.

4. Морскую воду в тefлоновой бутылке объемом 1 л и три полученных раствора (раствор металлов, раствор  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , раствор  $NaNO_3$ ) помещают в автоклав. Автоклавирование воды и компонентов для среды производится в течение 30 минут при температуре  $121^\circ C$  с медленным сбросом пара.

Всё время работы автоклава, включая время генерации пара, время стерилизации и стадии медленного сброса пара, занимает около 1 часа.

5. Проавтоклавированная морская вода и компоненты для среды извлекаются из автоклава и остужаются при комнатной температуре.

6. Автоклавирование штатива с наконечниками для автоматической пипетки-дозатора объемом 1000 мкл. Автоклавирование штатива должно происходить не ранее чем через 10 минут после завершения автоклавирования воды и сред, согласно требованиям по эксплуатации автоклава. Наконечники автоклавируются в течении 30 минут, при температуре  $121^\circ C$  с последующей сушкой.

Всё время работы автоклава, включая время генерации пара, время стерилизации и стадии сушки занимает около 1,5 часа.

7. Проавтоклавированные наконечники извлекаются из автоклава и остужаются при комнатной температуре.

НИЦМБ ДВО РАН	СОП №	
	Версия	
Биоресурсный центр "Морской Биобанк"	Заменяет	
	Действительно с	

8. Приготовление среды производится в ламинарном боксе в стерильных условиях. Поэтому перед работой в нём необходимо на 20 минут включить ультрафиолетовую лампу.

9. После выключения лампы рабочая поверхность бокса и руки обрабатывают спиртом из расчета 5 мл спирта на одну обработку стола и 5 мл на обработку рук.

10. Зажечь спиртовку. Возле зажженной спиртовки в 1 литр морской воды с помощью автоматической пипетки-дозатора вносят по 1 мл приготовленных растворов (раствор металлов, раствора  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , раствор  $\text{NaNO}_3$ ). После чего бутылку закрывают и тщательно взбалтывают. Каждый раствор вносят новым чистым наконечником на 1000 мкл. Время горения спиртовки около 5 минут, что требует около 3 мл спирта.

11. Подписать бутылку со средой, указывая название среды, дату приготовления, фамилию. Поместить бутылку со средой на хранение в тёмное место при температуре 4-8°C.

#### VI. Затраченное время:

	Процедура	Время, мин	Примечания
1	Работа электронного настольного автоклава	150	
2	Работа ультрафиолетовой лампы в ламинарном боксе	20	
3	Работа обычной лампы в ламинарном боксе	7	время включает обработку рабочих поверхностей и приготовление среды
4	Работа электронных весов	40	
5	Работа дистиллятора	120	
6	Человеко-часы	120	
	Время необходимое для приготовления среды	522	С учётом времени между циклами автоклавирования (не менее 10 минут) и времени необходимого для остывания морской воды и растворов после автоклавирования.