

General Guidelines for Freezing and Long-Term Storage of Microbial Cultures with CLEARStable

CLEARStable is an efficient system designed for the long-term freezing and storage of microbial cultures, ensuring stability while eliminating the need for freeze-drying or frequent sub-culturing. The system includes a cryobox containing 80 sterile cryotubes. Each vial contains 20 ± 1 porous beads immersed in 1 ± 0.1 ml of cryoprotectant solution with glycerol, making it ideal for preserving various microorganisms, including bacteria, spore-forming bacteria, fungi, mold and yeast. A dry version of CLEARStable is also available, without cryoprotectant solution. This system enables effective freezing and storage of microorganisms at -20°C, -80°C, or in liquid nitrogen vapor, preserving their viability and genetic stability based on specific storage needs.

Usage Procedure

1. Preservation of the Microbial Strain:

1.1. Preparation of the microorganisms

- For greater efficiency, ensure that the culture (either liquid suspension or plate) is prepared the day before use, allowing it to reach the logarithmic growth phase (typically 20-24 hours, depending on the microorganism)

1.2. Preparation of the Cryotube

- Remove a sterile cryotube from its packaging, ensuring sterility is maintained.
- Label the cryotube with the microbial strain name, date, and any other relevant information.

1.3. Inoculation

- From liquid suspension: using a sterile inoculation loop or pipette, transfer approximately 100-200 µl of actively growing culture into the cryotube.
- From plate Culture: Take a sterile bead from the cryotube, gently streak it across a freshly inoculated agar plate containing microorganisms. Ensure proper adherence of the microorganisms to the bead before transferring it back into the cryotube. Alternatively, you can also pick colonies directly from the plate and transfer them into the cryotube.

1.4. Mixing and Distribution

- Cap the cryotube and gently invert it several times to ensure the beads are fully immersed in the cryoprotective solution and that the bacteria are evenly distributed. **Do NOT vortex**.
- Let the vial stand for 30-60 seconds.
- Using a sterile pipette, remove the excess cryoprotective solution, leaving the beads as free of liquid as possible.
- Close the vial finger tight.

1.5. Freezing the Cryotube

- Immediately store the inoculated cryotube in a -20°C freezer for short-term storage or a -80°C freezer for long-term storage, or in the vapor phase of nitrogen for optimal preservation, ensuring the freezer is well-maintained and monitored to maintain a constant temperature.

2. Retrieval of the Microbial Strain:

2.1. Removal of the cryotube from the nitrogen vapor phase or the freezer

- When necessary, promptly remove the cryotube from storage.

2.2. Removal of a Bead

- Open the cryotube and, using sterile tweezers or a similar tool, (e.g., Microloops ref BSV120 from Biosigma), remove a frozen bead. Immediately close the cryotube and return it to the freezer to minimize temperature fluctuations.

2.3. Thawing and Inoculation

- Transfer the frozen bead into a fresh, appropriate culture medium (e.g., nutrient broth or agar plate). If using a liquid medium, immerse the bead into the broth; if using a solid medium, gently streak the bead across the surface. Incubate at the optimal temperature for the recovery and growth of the microorganisms.
- Safely discard the bead after use, according to the established guidelines for contaminated material disposal.

Precautions and Warnings:

- **Sterility**: Always work under sterile conditions to prevent contamination of microbial cultures.
- **Personal Protective Equipment (PPE)**: Wear appropriate PPE throughout all handling procedures.
- **Temperature Control**: Minimize temperature fluctuations, as they can compromise microorganism viability. When retrieving a bead, avoid thawing the remaining beads. A cryoblock can be utilized to maintain a stable temperature. Keep the cryoblock frozen and place the vial inside it when outside the freezer to preserve organism viability.
- **Vial Integrity**: Do not use CLEARStable if the vial appears turbid, indicating possible contamination, or if there are signs of leakage.
- **Storage Limitations**: Store organisms at the appropriate temperature specific to each strain, following the recommended guidelines for their type.
- **Certificate of Analysis**: For each production batch, a certificate of analysis is provided. A sterility test and performance test are conducted to ensure product quality and effectiveness.
- **Product Suitability**: While CLEARStable has been validated with standard collection strains, users should evaluate its effectiveness for their specific strains.
- **Color Variants**: CLEARStable provides a variety of cryovials featuring caps that coordinate with the color of the beads. Choose from an array of colors, including white, red, blue, yellow, green, or a blend of these options. Each vial is filled with the same effective cryoprotectant, guaranteeing consistent performance regardless of the color.
- **Flexible options**: Available with or without cryoprotectant, and with 1D or 2D barcoding.
- **Storage**: Before use, unused CLEARStable may be stored between 4°C and 30°C.

Linee Guida Generali per il Congelamento e la Conservazione a Lungo Termine di Colture Microbiche con CLEARStable

CLEARStable è un sistema efficiente progettato per il congelamento e la conservazione a lungo termine di colture microbiche, garantendo stabilità senza la necessità di liofilizzazione o subcolture frequenti. Il sistema è costituito da una scatola per criogenia contenente 80 criotubi sterili. Ogni criotubo contiene 20 ± 1 biglie porose immerse in 1 ± 0,1 ml di soluzione crioprotettiva con glicerolo, rendendolo ideale per la conservazione di vari microrganismi, inclusi batteri, batteri sporigeni, funghi, muffe e lieviti. CLEARStable è disponibile anche in versione dry, senza soluzione crioprotettrice. Questo sistema consente il congelamento e la conservazione efficace di microrganismi a -20°C, -80°C o in vapori di azoto liquido, preservandone la vitalità e la stabilità genetica in base alle esigenze specifiche di conservazione.

Procedura d'uso

1. Conservazione dei microrganismi:

1.1. Preparazione della coltura microbica

- Per una maggiore efficienza, assicurarsi che la coltura (in sospensione o su piastra) venga preparata il giorno prima dell'uso, consentendole di raggiungere la fase di crescita logaritmica (in genere 20-24 ore, a seconda del microrganismo).

1.2. Preparazione del criotubo

- Rimuovere un criotubo sterile dalla confezione, assicurandosi che la sterilità sia mantenuta.
- Etichettare il criotubo con il nome del ceppo microbico, la data e qualsiasi altra informazione rilevante.

1.3. Inoculo

- Dalla coltura in sospensione: utilizzando un'ansa di inoculazione sterile o una pipetta, trasferire circa 100-200 µl di coltura attivamente in crescita nel criotubo.
- Dalla coltura sulla piastra: Prendi una biglia sterile dal criotubo e strofinala delicatamente su una piastra di agar appena inoculata contenente microrganismi. Assicurati che i microrganismi aderiscano correttamente alla biglia prima di trasferirla di nuovo nel criotubo. In alternativa, puoi anche prelevare le colonie direttamente dalla piastra e trasferirle nel criotubo.

1.4. Miscelazione e distribuzione

- Tappare il criotubo e capovolgerlo delicatamente più volte per garantire che le biglie siano completamente immerse nella soluzione crioprotettiva e che i batteri siano distribuiti uniformemente. **NON utilizzare il vortex.**
- Lasciare riposare per 30-60 secondi.
- Utilizzando una pipetta sterile, rimuovere la soluzione crioprotettiva, lasciando le biglie il più possibile prive di liquido.
- Chiudere il tubo.

1.5. Congelamento del criotubo

- Conservare immediatamente il criotubo inoculato in un congelatore a -20 °C per la conservazione a breve termine o in un congelatore a -80 °C per la conservazione a lungo termine, oppure nella fase di vapore dell'azoto per una conservazione ottimale, assicurandosi che il congelamento sia ben manutenuto e monitorato per mantenere una temperatura costante.

2. Recupero del ceppo microbico:

2.1. Rimozione del criotubo dal congelatore o dalla fase di vapore dell'azoto

- Quando necessario, rimuovere rapidamente il criotubo dall' ambiente di conservazione.

2.2. Rimozione di una biglia

- Aprire il criotubo e, utilizzando pinzette sterili o uno strumento simile (ad esempio le anse della Biosigma ref BSV120), prelevare una biglia congelata. Chiudere immediatamente il criotubo e rimetterlo nel congelatore per ridurre al minimo le fluttuazioni di temperatura.

2.3. Scongelamento e inoculo

- Trasferire la biglia congelata in un terreno di coltura fresco e appropriato (ad esempio, brodo nutriente o piastra). Se si utilizza un terreno liquido, immergere la biglia nel brodo; se si utilizza un terreno solido, strisciare delicatamente la biglia sulla superficie. Incubare alla temperatura ottimale per il recupero e la crescita dei microrganismi.
- Smaltire in modo sicuro la biglia dopo l'uso, secondo le linee guida stabilite per lo smaltimento dei materiali contaminati.

Precauzioni e avvertenze:

- **Sterilità**: lavorare sempre in condizioni sterili per prevenire la contaminazione delle colture microbiche.
- **Dispositivi di protezione individuale (DPI)**: indossare DPI appropriati durante tutte le procedure di manipolazione.
- **Controllo della temperatura**: ridurre al minimo le fluttuazioni di temperatura, poiché possono compromettere la vitalità dei microrganismi. Quando si recupera una biglia, evitare di scongelare le biglie rimanenti. È possibile utilizzare un crioblocco per mantenere una temperatura stabile. Mantenere il crioblocco congelato e posizionare il critubo al suo interno quando si è fuori dal congelatore per preservare la vitalità dell'organismo.
- **Integrità del criotubo**: non utilizzare CLEARStable se il crioprotettore appare torbido, indicando una possibile contaminazione, o se ci sono segni di perdite.
- **Limitazioni di conservazione**: conservare gli organismi alla temperatura appropriata specifica per ogni ceppo, seguendo le linee guida consigliate per il loro tipo.
- **Certificato di analisi**: per ogni lotto di produzione, viene fornito un certificato di analisi. Vengono condotti un test di sterilità e un test di prestazione per garantire la qualità e l'efficacia del prodotto.
- **Idoneità del prodotto**: sebbene CLEARStable sia stato convalidato con ceppi standard, gli utenti devono valutarne l'efficacia per i loro ceppi specifici.
- **Varianti di colore**: CLEARStable fornisce una varietà di criotubi con tappi coordinati con il colore delle biglie. Possibilità di scelta tra una gamma di colori, tra cui bianco, rosso, blu, giallo, verde o colori misti. Ogni criotubo è riempito con lo stesso crioprotettore, garantendo prestazioni costanti indipendentemente dal colore.
- **Opzioni flessibili**: disponibile con o senza crioprotettore e con codice a barre 1D o 2D.
- **Conservazione**: prima dell'uso, CLEARStable non utilizzato può essere conservato tra 4°C e 30°C.

Biosigma S.p.A Dominique Dutscher Group
Via Valletta, 6 | 30010, Cona (Venezia) Italia
Tel ++39 0426 302224 | info@biosigmaeu.com
www.biosigma.it | www.biosigma.com