

Стандартная операционная процедура по определению оптимальных условий хранения штаммов в Коллекции морских микроорганизмов

Грибные штаммы:

- Вид *Isaria felina* (Dc.) Fr., штамм КММ 4639
- *Myceliophthora thermophila* (Apinis) Oorschot, КММ 4677
- *Ochroconis musae* (G.Y. Sun & Lu Hao) Samerpitak & de Hoog, КММ 4678
- *Penicillium antarcticum* A.D. Hocking & C.F. McRae, КММ 4669
- *Penicillium attenuatum* Kirichuk & Pivkin, sp. nov., КММ 4671
- *Penicillium ochotense* Kirichuk & Pivkin, sp. nov., КММ 4670
- *Penicillium piltunense* Kirichuk & Pivkin, sp. nov., КММ 4668
- *Penicillium steckii* K.M. Zalessky, КММ 4666
- *Penicillium thomii* Maire, КММ 4645
- *Trichoderma* sp. КММ 4649

Каждый штамм гриба в КММ поддерживается на скошенном агаризированном сусле, приготовленном на натуральной морской воде, следующего состава: жидкое пивное сусло – 200 мл; морская вода – 800 мл; агар – 20 г, рН 7,8 – 8,2. Температура культивирования комнатная. Сроки культивирования 7-14 суток. Оптимальный метод консервации: агаризированный картофельно-морковный агар на натуральной морской воде, столбики; под слоем вазелинового масла. Состав среды: картофель – 20 г; морковь – 20 г; морская вода – 1 л, рН 7,8 – 8,2. Содержимое довести до кипения, варить 1 час на медленном огне, процедить, довести объем бульона до 1 литра; агар – 12-15 г. Температура культивирования комнатная. Время культивирования 7-10 дней. Срок гарантийного хранения - до 5 лет.

Длительное хранение культур в низкотемпературном холодильнике: криопробирки, образец культуры клеток (кусочек мицелия) под слоем глицерина. Температура хранения минус 80-85 °С. Гарантийный срок хранения 10 лет или более.

Оценка и анализ жизнеспособности морских штаммов грибов непосредственно после консервации и после его хранения производили путем их культивирования на «сусло-агаровой» среде. Заключение об эффективности выбранной методики консервации делали на основании сопоставления качественных характеристик развития штамма до консервации, непосредственно после консервации и после хранения в течение года. Культуры с удовлетворительными показателями жизнеспособности (наличие роста, чистота культуры) и неизменными физиологическими характеристиками закладывали на длительное хранение. Культуры с неудовлетворительными показателями

жизнеспособности (отсутствие роста) после криоконсервации хранили в пробирках, на столбиках с картофельно-морковным агаром под вазелиновым маслом и пересеваются один раз в 1-5 лет.

Весь материал, используемый в работе, а также образцы культур грибов, которые участвовали в экспертизе, после ее проведения подлежат уничтожению в автоклаве при режиме обеззараживания 132°C, 2 атм., 20 минут.

БАКТЕРИИ

Каждый штамм бактерий сохраняется теми способами, которые наиболее приемлемы для них. Определение оптимальных методов консервации для новых культур при пополнении фонда состоит из ряда последовательных процедур: проверка аутентичности, анализ имеющихся в КММ данных о методах консервации и сроках гарантированного хранения различных групп микроорганизмов. Подбор условий (состав питательной среды, температура и т.п.) и времени культивирования, обеспечивающих оптимальный рост производят по соответствующим данным, полученным с учетом опыта специалистов КММ. Оценка жизнеспособности штамма непосредственно после консервации и после его хранения в течение месяца, является основным критерием эффективности выбранной методики. Анализ жизнеспособности штамма производится путем его культивирования на адекватных питательных средах в оптимальных условиях. Предварительное заключение об эффективности выбранной методики консервации делается на основании сопоставления качественных характеристик развития штамма до консервации, непосредственно после консервации и после хранения в течение года. Культуры с удовлетворительными показателями численности жизнеспособных клеток и неизменными физиологическими характеристиками закладывают на длительное хранение. В КММ – это хранение при минус 80-85 °С (криопробирки, среда с глицерином). Культуры с неудовлетворительными показателями жизнеспособности при криоконсервации хранятся в пробирках с полужидком агаром под вазелиновым маслом и пересеваются каждый год.

Штамм бактерии *Marinicella litoralis* КММ 3900^T помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 15.06.2008 года. Суспензия клеток штамма КММ 3900^T хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус 80 °С. Клетки штамма 3900^T поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс 4-6 °С. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии *Marinicella litoralis* КММ 3900^T осуществлялся согласно

соответствующим Стандартным операционным процедурам. Определение жизнеспособности бактерий *Marinicella litoralis* КММ 3900^T показало, что хранение суспензии клеток в растворе криопротектора при температуре минус 80 °С является оптимальным для данного штамма.

Штамм бактерии *Loktanella maritima* КММ 9530^T помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 15.10.2012 года. Суспензия клеток штамма КММ 9530^T хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус 80 °С. Клетки штамма КММ 9530^T поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс 4-6 °С. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии *Loktanella maritima* КММ 9530^T в Коллекции морских микроорганизмов осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Определение жизнеспособности бактерий *Loktanella maritima* КММ 9530^T показало, что хранение суспензии клеток в растворе криопротектора при температуре минус 80 °С является оптимальным для данного штамма.

Штамм бактерии *Pseudoalteromonas agarivorans* КММ 255^T помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 15.10.2000 г. Суспензия клеток штамма КММ 255^T хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус 80 °С. Клетки штамма 255^T поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс 4-6 °С. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии *Pseudoalteromonas agarivorans* КММ 255^T осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Определение жизнеспособности бактерий *Pseudoalteromonas agarivorans* КММ 255^T показало, что хранение суспензии клеток в растворе криопротектора при температуре минус 80°С является оптимальным для данного штамма.

Штамм бактерии *Pseudomonas glareae* КММ 9500^T помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 30.10.2012 года. Суспензия клеток штамма КММ 9500^T хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при минус 80°С. Клетки штамма КММ 9500^T поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс 4-6 °С. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии *Pseudomonas glareae* КММ 9500^T в Коллекции морских микроорганизмов осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам.

Штамм бактерии *Sphingomonas molluscorum* КММ 3882^T помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 25.06.2003 года. Суспензия клеток штамма КММ 3882^T хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус 80-85 °С. Клетки штамма КММ 3882^T поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, находящимися на хранении при температуре плюс 4-6 °С. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии *Sphingomonas molluscorum* КММ 3882^T в Коллекции морских микроорганизмов осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Определение жизнеспособности бактерий *Sphingomonas molluscorum* КММ 3882^T показало, что хранение суспензии клеток в растворе криопротектора при температуре минус 80 °С является оптимальным для данного штамма.

Результаты работы показали, что жизнеспособность клеток культур штаммов *Algibacter pectinovorans* КММ 6376, *Polaribacter reichenbachii* КММ 6386^T, *Winogradskyella ulvae* КММ 6390^T, *Polaribacter* sp. КММ 6412, *Sphingobacterium* sp. КММ 6449 и *Nonlabens arenilitoris* КММ 6452 и КММ 6497 наиболее эффективно поддерживается при хранении в морском бульоне 2216 (Difco, USA) с 20% глицерина в качестве криопротектора в низкотемпературном холодильнике при температуре минус 80-85 °С.

Штамм бактерии *Cohaesibacter* sp. КММ 8009 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2009 г. Суспензия клеток штамма КММ 8009 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре -80 °С. Клетки штамма 8009 поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс 4-6 °С. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии *Cohaesibacter* sp. КММ 8009 осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Определение жизнеспособности бактерий *Cohaesibacter* sp. КММ 8009 показало, что хранение суспензии клеток в растворе криопротектора при температуре -80 °С является оптимальным для данного штамма.

Штамм бактерии *Roseobacter* sp. КММ 8017 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2009 г. Суспензия клеток штамма КММ 8017 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре -80 °С. Клетки штамма КММ 8017 поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс 4-6 °С. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии *Roseobacter* sp. КММ 8017 в Коллекции морских микроорганизмов осуществляется

согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Определение жизнеспособности бактерий *Roseobacter* sp. КММ 8017 показало, что хранение суспензии клеток в растворе криопротектора при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ является оптимальным для данного штамма.

Штамм бактерии *Formosa* sp. КММ 8021 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2009 г. Суспензия клеток штамма КММ 8021 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Клетки штамма 8021 поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс $4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии *Formosa* sp. КММ 8021 осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Определение жизнеспособности бактерий *Formosa* sp. КММ 8021 показало, что хранение суспензии клеток в растворе криопротектора при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ является оптимальным для данного штамма.

Штамм бактерии *Winogradskyella* sp. КММ 8184 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2009 г. Суспензия клеток штамма КММ 8184 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Клетки штамма КММ 8184 поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс $4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии *Winogradskyella* sp. КММ 8184 в Коллекции морских микроорганизмов осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Определение жизнеспособности бактерий *Winogradskyella* sp. КММ 8184 показало, что хранение суспензии клеток в растворе криопротектора при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ является оптимальным для данного штамма.

Штамм бактерии *Vibrio* sp. КММ 8419 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2016 г. Суспензия клеток штамма КММ 8419 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Клетки штамма КММ 8419 поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, находящимися на хранении при температуре плюс $4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии *Vibrio* sp. КММ 8419 в Коллекции морских микроорганизмов осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Определение жизнеспособности бактерий *Vibrio* sp. КММ 8419 показало, что хранение суспензии клеток в растворе криопротектора при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ является оптимальным для данного штамма.

Штамм бактерии *Pseudoalteromonas neustonica* КММ 7501 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2016 г. Суспензия клеток штамма КММ 7501 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, ВD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре -80 °С. Клетки штамма КММ 7501 поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс 4-6 °С. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии *Pseudoalteromonas neustonica* КММ 7501 осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Определение жизнеспособности бактерий *Pseudoalteromonas neustonica* КММ 7501 показывает, что хранение суспензии клеток в растворе криопротектора при температуре -80 °С является оптимальным для данного штамма.

Штамм бактерии *Marinomonas arenicola* КММ 7506 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2016 г. Суспензия клеток штамма КММ 7506 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, ВD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре -80 °С. Клетки штамма КММ 7506 поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс 4-6 °С. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии КММ 7506 осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Определение жизнеспособности бактерий *Marinomonas arenicola* КММ 7506 показывает, что хранение суспензии клеток в растворе криопротектора при температуре -80 °С является оптимальным для данного штамма.

Штамм бактерии *Marinomonas arenicola* КММ 7509 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2016 г. Суспензия клеток штамма КММ 7509 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, ВD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре -80 °С. Клетки штамма КММ 7509 поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс 4-6 °С. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии КММ 7509 осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Определение жизнеспособности бактерий *Marinomonas arenicola* КММ 7509 показывает, что хранение суспензии клеток в растворе криопротектора при температуре -80 °С является оптимальным для данного штамма.

Штамм бактерии *Pseudomonas zhaodongensis* КММ 7507 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2016 г. Суспензия клеток штамма КММ 7507 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, ВD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре -80 °С. Клетки штамма КММ 7507

поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс 4-6 °С. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии КММ 7507 осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Определение жизнеспособности бактерий *Pseudomonas zhaodongensis* КММ 7507 показывает, что хранение суспензии клеток в растворе криопротектора при температуре -80 °С является оптимальным для данного штамма.

Штамм бактерии *Pseudoalteromonas distincta* КММ 7504 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2016 г. Суспензия клеток штамма КММ 7504 хранится в криобирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре -80 °С. Клетки штамма КММ 7504 поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс 4-6 °С. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии КММ 7504 осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Определение жизнеспособности бактерий *Pseudoalteromonas distincta* КММ 7504 показывает, что хранение суспензии клеток в растворе криопротектора при температуре -80 °С является оптимальным для данного штамма.

Всего проверено 30 штаммов грибов и бактерий:

грибы *Isaria felina* КММ 4639, *Myceliophthora thermophila* КММ 4677, *Ochroconis musae* КММ 4678, *Penicillium antarcticum* КММ 4669, *Penicillium attenuatum* КММ 4671, *Penicillium ochotense* КММ 4670, *Penicillium piltunense* КММ 4668, *Penicillium steckii* КММ 4666, *Penicillium thomii* КММ 4645, *Trichoderma* sp. КММ 4649;

бактерии *Marinicella litoralis* КММ 3900^T, *Loktanella maritima* КММ 9530^T, *Pseudoalteromonas agarivorans* КММ 255^T, *Pseudomonas glareae* КММ 9500^T, *Sphingomonas molluscorum* КММ 3882^T, *Algibacter pectinovorans* КММ 6376, *Polaribacter reichenbachii* КММ 6386^T, *Winogradskyella ulvae* КММ 6390^T, *Polaribacter* sp. КММ 6412, *Sphingobacterium* sp. КММ 6449, *Nonlabens arenilitoris* КММ 6452, *N. arenilitoris* КММ 6497, *Cohaesibacter* sp. КММ 8009, *Roseobacter* sp. КММ 8017, *Formosa* sp. КММ 8021, *Winogradskyella* sp. КММ 8184, *Vibrio* sp. КММ 8419, *Pseudoalteromonas neustonica* КММ 7501, *Marinomonas arenicola* КММ 7506, *M. arenicola* КММ 7509, *Pseudomonas zhaodongensis* КММ 7507, *Pseudoalteromonas distincta* КММ 7504.

Куратор КММ чл.-корр. РАН Михайлов В.В.

