

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Г.Б. ЕЛЯКОВА
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» (ТИБОХ ДВО РАН)

УДК 579.84

№ госрегистрации АААА-А17-117080110039-7

Инв. №

«УТВЕРЖДАЮ»

ВрИО директора ТИБОХ ДВО РАН

кандидат биологических наук


Д.Л. Амицин

«29» января 2018 г.



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Программа фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013–2020 годы

55. Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов

ИНВЕНТАРИЗАЦИЯ И РАЗВИТИЕ КОЛЛЕКЦИИ МОРСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

(КММ) ОБЩЕБИОЛОГИЧЕСКОГО

И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО НАПРАВЛЕНИЯ

(заключительный)

Номер проекта в ИСГЗ ФАНО 0266-2017-0005

Протокол Ученого совета

№ 10 от 25.12.2017

Научный руководитель
член-корреспондент РАН

 22.12.2017
подпись, дата

В.В. Михайлов

Владивосток – 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, д-р биол. наук, проф., член-корреспондент РАН	 22.12.2017	В.В. Михайлов

	подпись, дата	
Исполнители темы		
в. н. с., д-р биол. наук	 22.12.2017	О.И. Недашковская

	подпись, дата	
в. н. с., д-р биол. наук	 22.12.2017	М.В. Пивкин

	подпись, дата	
в. н. с., д-р биол. наук	 22.12.2017	Л.А. Романенко

	подпись, дата	
с. н. с., канд. биол. наук	 22.12.2017	В.В. Куриленко

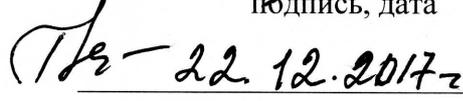
	подпись, дата	
н. с., канд. биол. наук	 22.12.2017	Ю.В. Худякова

	подпись, дата	
н. с., канд. биол. наук	 22.12.2017	Л.С. Шевченко

	подпись, дата	
ст. лаборант	 22.12.2017	М.С. Гончаренко

	подпись, дата	
ст. лаборант	 22.12.2017	Л.К. Попова

	подпись, дата	
ст. лаборант	 22.12.2017	В.А. Алимova

	подпись, дата	
ст. лаборант	 22.12.2017	Г.А. Наседкина

	подпись, дата	
инженер	 22.12.2017	А.Р. Чингизов

	подпись, дата	
нормоконтролер	 25.12.2017	И.Н. Красикова

	подпись, дата	

РЕФЕРАТ

Отчет 112 с., 1 ч., 6 рис., 1 табл., 27 источников, 3 прил.

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, МОРСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, КОЛЛЕКЦИОННОЕ ДЕЛО, МОРСКИЕ БАКТЕРИИ, МОРСКИЕ ГРИБЫ, ТАКСОНОМИЯ, БИОАКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Объект исследования – биоресурсная коллекция «Коллекция морских микроорганизмов (КММ) общебиологического и биотехнологического направления».

Цель работы – поддержание биоресурсной коллекции «Коллекция морских микроорганизмов (КММ) общебиологического и биотехнологического направления».

Результаты. В рамках выполнения дополнительного государственного задания были проведены следующие работы:

1) Создан технологический паспорт «Коллекции морских микроорганизмов (КММ) общебиологического и биотехнологического направления» ТИБОХ ДВО РАН, включающий в себя: а) описание полного набора ключевых СОПов), обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции КММ ТИБОХ ДВО РАН.

2) Технологический паспорт КММ ТИБОХ ДВО РАН размещен на интернет-сайте ТИБОХ ДВО РАН (раздел Коллекция морских микроорганизмов).

3) Проведена экспериментальная верификация пяти СОПов.

4) Результаты верификации СОПов записаны ТИБОХ ДВО РАН (раздел Коллекция морских микроорганизмов).

5) Электронный каталог коллекции КММ пополнен информацией о 30 штаммах бактерий и грибов, охарактеризованных согласно перечню СОП КММ ТИБОХ ДВО РАН.

6) Опубликованы статья в рецензируемом журнале (WoS, Scopus) и тезисы двух докладов на международной конференции на основе материалов коллекции, направлены в печать три статьи (WoS, Scopus).

7) Подготовлен календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания.

8) Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания размещен на интернет-сайте ТИБОХ ДВО РАН (раздел Коллекция морских микроорганизмов) с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

Прогноз развития объекта исследования: в дальнейшем планируются работы по поддержанию коллекции, расширению фондов и оказание услуг по запросам.

СОДЕРЖАНИЕ

Обозначения и сокращения	5
Введение	6
Основная часть	9
1. Общая информация о коллекции	–
2. Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания	–
3. Регистрация в государственных информационных системах и финансирование	10
4. Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания	–
Заключение	14
Список использованных источников	15
Приложение А. Библиографический список публикаций, полученных в результате выполнения научно-исследовательской работы	17
Приложение Б. Стандартные операционные процедуры КММ ТИБОХ ДВО РАН	33
Приложение В. Экспериментальная верификация СОПов КММ ТИБОХ ДВО РАН	45

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

КММ – Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН

СОП – стандартная операционная процедура

ЦКП – центр коллективного пользования

CBS – Коллекция дрожжей и мицелиальных грибов (Нидерланды)

IUBS - Международный союз биологических наук

IUMS - Международный союз микробиологических наук

WFCC – Всемирная федерация коллекций культур

ВВЕДЕНИЕ

Основателями современной морской микробиологии были Б. Фишер [1], Б.Л. Исаченко [2] и К. Зобелл [3]. Сейчас она быстро развивается на основе новых методов (после выдающихся экспериментов О. Эйвери, К. Маклеода, М. Маккарти [4] и К. Воуза [5]. В настоящее время окончательно утвердилась мысль Л. Пастера, С.Н. Виноградского и В.И. Вернадского о том, что Земля – микробная планета. Главной задачей микробиологии в настоящее время является всестороннее изучение биосферы и её творцов – прокариот.

Лишь немногие люди (даже и микробиологи) понимают, что в основе жизни на Земле лежат морские микроорганизмы. Мировой океан является самой большой частью биосферы. Морские микроорганизмы составляют значительную часть биомассы Земли. Они также осуществляют более половины всей глобальной поставки кислорода, и, при этом, утилизируют значительную долю углекислого газа, который ускоряет глобальное потепление. Морские микроорганизмы являются решающим компонентом системы жизнеобеспечения Земли. Поэтому любые новые сведения о морских микроорганизмах являются важными и актуальными.

Для осуществления научного процесса необходимо, чтобы описанные или упомянутые в публикациях микробные штаммы были доступны для независимого изучения. Поэтому необходимо поддерживать и сохранять описанные и другие культуры, потенциально ценные для промышленности, медицины, сельского хозяйства и научных исследований. Эти важнейшие для микробиологов задачи выполняют коллекции культур, в которых собирают и постоянно поддерживают хорошо изученные, аутентичные штаммы вирусов, прокариот, грибов, а также культуры животных и растительных клеток. Первым, кто стал обеспечивать учёных проверенными культурами, был Франтишек Крал (1846-1911), живший в Праге. В 1915 году его коллекция была переведена в Венский университет. Другая старейшая коллекция, CBS, основанная в 1904 году по решению 11-го международного Ботанического Конгресса в Вене, и поныне существует в г. Утрехт (Нидерланды). Микробные коллекции – это живые библиотеки, постоянный источник штаммов для сравнения. Коллекции культур выполняют также и роль экспертных центров в области систематики, таксономии, идентификации и хранения микроорганизмов. В знак признания важности работ в области коллекционного дела Международным союзом микробиологических наук (IUMS) и Международным союзом биологических наук (IUBS) была создана Всемирная федерация коллекций культур (WFCC). Многие страны поддерживают исследования в области морской микробиологии и биотехнологии. В России же, являющейся морской державой, такие исследования почти не ведутся. Исследования в области морской микробиологии ведутся в Тихоокеанском институте биоорганической

химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) около тридцати лет. Эти исследования всегда были объединены единой тематикой: изучением фундаментальных биологических свойств и вытекающего из них экологического и биотехнологического потенциала морских микроорганизмов. В течение этого времени основной базой для академических и прикладных работ послужила основанная в 1985 г. Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН (каталог, положение, ЦКП и другие сведения размещены на сайте Института <http://piboc.dvo.ru>), которая является единственной в России, целиком специализирующейся на морских гетеротрофных бактериях, а также грибах-микромикетах. Коллекция является членом Всемирной федерации коллекций культур (WFCC) (номер 644, официальный акроним – КММ, так пишется на всех языках) и получила международное признание. Океан является самым большим резервуаром биоты, но биоразнообразие бактерий и грибов, обитающих в нем, изучено в очень небольшой степени. К сожалению, от Уральских гор и до берегов Тихого океана нет ни одного института микробиологии Российской академии наук. Это сдерживает развитие микробиологии в России, в том числе морской. Морские микроорганизмы существенно отличаются от наземных и синтезируют различные биологически активные вещества, которые не были найдены среди почвенных микроорганизмов, несмотря на более, чем полувековую историю таких поисков. Сведения о микроорганизмах в фундаментальной связке биоразнообразие↔экология↔биотехнология позволили обнаружить ряд перспективных микробных продуцентов первичных и вторичных биоактивных метаболитов. Основной целью исследований биологического разнообразия морских микроорганизмов было изучение фено-, гено-, и филотипических свойств и признаков морских бактерий и грибов с последующим описанием новых таксонов. Изложенные выше обстоятельства свидетельствуют о том, что исследования являются актуальными, позволяющими получать новые знания о морских микроорганизмах и их жизнедеятельности.

Цель работы – поддержание и развитие коллекционного фонда и оказание услуг по работе с морскими бактериями и грибами.

Задачи:

1) Создать Технологический паспорт КММ ТИБОХ ДВО РАН, который включает в себя: а) описание полного набора ключевых СОПов, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции КММ ТИБОХ ДВО РАН.

2) Разместить Технологический паспорт КММ ТИБОХ ДВО РАН на интернет-сайте ТИБОХ ДВО РАН (раздел Коллекции морских микроорганизмов). Экспериментально

- верифицировать пять СОПов: а). Стандартная операционная процедура по определению оптимальных условий хранения штаммов Коллекции морских микроорганизмов
- б) Стандартная операционная процедура по контролю жизнеспособности культур в Коллекции морских микроорганизмов
- в). Стандартная операционная процедура для коррекции нарушений качества хранения культур в Коллекции морских микроорганизмов
- г). Стандартная операционная процедура по выделению новых штаммов бактерий и грибов в Коллекции морских микроорганизмов
- д). Стандартная операционная процедура по идентификации штаммов бактерий и грибов по морфологическим, физиологическим и молекулярно-генетическим характеристикам в Коллекции морских микроорганизмов

3) Записать результаты верификации СОПов в электронной базе КММ ТИБОХ ДВО РАН.

4) Пополнить электронный каталог коллекции КММ ТИБОХ ДВО РАН информацией о 30 штаммах бактерий и грибов.

5) Подготовить две рукописи статей в рецензируемых журналах (Scopus, WoS), на основе материалов коллекции, одна из которых должна быть опубликована, другая направлена в печать.

6) Подготовить календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания.

7) Разместить отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания на интернет-сайте ТИБОХ ДВО РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

Поставленные задачи являются базой для функционирования Коллекции морских микроорганизмов.

Настоящий отчет является заключительным по теме «Морские бактерии и грибы: систематика, экофизиология, биологически активные вещества микробного происхождения» за 2017 год.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Общая информация о коллекции

1.1 Название коллекции: «Коллекция морских микроорганизмов» (общебиологического и биотехнологического направления).

1.2 Наименование организации ФАНО России: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН).

1.3 Регистрационный номер биоресурсной коллекции в информационной системе «Парус» ФАНО России: 266.

1.4 Направление ФНИ: 55. Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов

1.5 Руководитель коллекции, поддерживающий коллекцию: Михайлов Валерий Викторович, зав. лаб., д.б.н., проф., чл.-корр. РАН, mikhailov@piboc.dvo.ru, +7-423-231-11-68, +7-914-653-4988.

1.6 Назначение коллекции: коллекционный фонд содержит морские микроорганизмы доменов *Bacteria* и *Eukaryota* (гетеротрофные бактерии и грибы-микровицеты). Это позволяет осуществлять широкий спектр прикладных и фундаментальных исследований совместно с институтами РАН и другими организациями.

1.7 Регистрация коллекции в перечне ЦКП «Современная исследовательская инфраструктура Российской Федерации»: Есть.

1.8 Наименование, реестровый номер и адрес ЦКП на сайте <http://www.ckp-rf.ru>: «Коллекция морских микроорганизмов», реестровый номер 261006, <http://ckp-rf.ru/ckp/261006/>.

1.9 Дата образования коллекции: 1985 г.

1.10 Отражение коллекционной деятельности в Уставе организации: Нет

1.11 Положение о коллекции, утвержденное на Ученом совете организации: Протокол № 10 заседания Ученого совета ТИБОХ ДВО РАН от 29 декабря 2013 г.

1.12 Адрес WEB-сайта организации, на котором представлена информация о коллекции: <http://piboc.dvo.ru/> (раздел Коллекция морских микроорганизмов).

2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного госзадания

2.1 Текст Отчета представлен на:

а) WEB-сайте организации: <http://piboc.dvo.ru/> (раздел Коллекция морских микроорганизмов).

б) Информационном портале БРК:

2.2 Содержание основных результатов работы по дополнительному госзаданию в соответствии с ПФНИ ГАН: Получение, идентификация и хранение новых штаммов морских микроорганизмов.

3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование

3.1 Регистрационный номер дополнительного госзадания по БРК в информационной системе «Парус» ФАНО России: 0266-2017-0005.

3.2 Регистрационный номер дополнительного госзадания по БРК в информационной системе ЦИТИС: АААА-А17-117080110039-7.

3.3 Отчет по дополнительному госзаданию подготовлен и загружен в систему Парус 31.01.2018.

3.4 Отчет по дополнительному госзаданию загружен в систему ЦИТИС 31.01.2018.

3.5 Объем финансирования, выделенного на выполнение ДГЗ из средств ФАНО России в 2017 году: 4,1 млн рублей, Доп. соглашение № 007-03-602/1 от 8 ноября 2017 г.

3.6 Объем финансирования, выделенного на приобретение крупного оборудования из средств ФАНО России в 2017 г. (свыше 500 000 руб.): 1142,7 тыс. рублей, Соглашение № 007-02-1892 от 13 сентября 2017 г.

4. Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания

4.1 Подготовка технологического паспорта «Коллекции морских микроорганизмов общебиологического и биотехнологического направления» ТИБОХ ДВО РАН.

Технологический паспорт КММ ТИБОХ ДВО РАН включает в себя: а) описание полного набора ключевых СОПов, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда (Приложение Б); б) научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции; в) экспериментальная верификация СОПов (Приложение В).

Технологический паспорт размещен на интернет-сайте ТИБОХ ДВО РАН <http://piboc.dvo.ru/> в разделе Коллекция морских микроорганизмов. Содержание СОПов изложено в Приложении Б, ниже приведены их названия:

- СОП КММ ТИБОХ ДВО РАН по определению оптимальных условий хранения штаммов Коллекции морских микроорганизмов.

- СОП КММ ТИБОХ ДВО РАН по контролю жизнеспособности штаммов для выбора оптимального метода хранения.

- СОП КММ ТИБОХ ДВО РАН для коррекции нарушений качества единиц хранения.
- СОП КММ ТИБОХ ДВО РАН по выделению новых штаммов бактерий и грибов.
- СОП КММ ТИБОХ ДВО РАН по идентификации штаммов бактерий и грибов по морфологическим, физиологическим и молекулярно-генетическим характеристикам.

Для обоснования смет стандартных операционных процедур и расчета общей стоимости работ, обеспечивающих развитие и поддержание Коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН, были собраны данные об оплате труда, приобретении материалов, расходах на содержание оборудования, коммунальных и иных затратах, необходимых для выполнения работ по перечисленным ниже направлениям деятельности коллекции:

- 1) Выполнение стандартных операционных процедур (СОП).
- 2) Выполнение научно-исследовательских работ.
- 3) Общее содержание коллекции.

Собранные данные были использованы для расчета стоимости выполнения 5 СОПов, величины накладных расходов на содержание коллекции и необходимого годового объема финансирования. Обобщенный пример расчета стоимости СОП приведен в таблице 1.

Таблица 1 – Расчет стоимости «СОП КММ ТИБОХ ДВО РАН по идентификации штаммов бактерий и грибов по морфологическим, физиологическим и молекулярно-генетическим характеристикам»

№, п/п	Статья расходов	Сумма, руб.
1	Оплата труда	23 488,34
2	Приобретение материалов	9 502,91
3	Иные затраты	–
4	Содержание оборудования	1 431,65
	Итого:	34 422,90

Расчеты проводились в соответствии моделью и методикой оценки, разработанными ИЦиГ СО РАН в рамках выполнения дополнительного государственного задания по теме: «Разработка модели финансового управления сохранением и рациональным использованием биоресурсов в рамках функционирования биоресурсных научных коллекций». http://www.biores.cytogen.ru/brc_finance/report. Полный набор данных представлен на портале «Биоресурсные коллекции ФАНО России» http://www.biores.cytogen.ru/brc_finance/collections/5

Итоговый объем требуемого годового финансирования коллекции рассчитан на основе предполагаемого плана работ и составил 4000100 руб., из которых 3255200 руб. запланированы для выполнения работ по содержанию и развитию коллекции, 744900 руб. запланированы для обеспечения накладных расходов на работу коллекции.

4.2 Экспериментальная верификация СОПов

Проведена экспериментальная верификация СОПов КММ ТИБОХ ДВО РАН (Приложение В).

СОП КММ ТИБОХ ДВО РАН по определению оптимальных условий хранения штаммов Коллекции морских микроорганизмов, верифицированный на 30 штаммах.

СОП КММ ТИБОХ ДВО РАН по контролю жизнеспособности штаммов для выбора оптимального метода хранения, верифицированный на 30 штаммах.

СОП КММ ТИБОХ ДВО РАН для коррекции нарушений качества единиц хранения, верифицированный на 30 штаммах.

СОП КММ ТИБОХ ДВО РАН по выделению новых штаммов бактерий и грибов, верифицированный на 30 штаммах.

СОП КММ ТИБОХ ДВО РАН по идентификации штаммов бактерий и грибов по морфологическим, физиологическим и молекулярно-генетическим характеристикам, верифицированный на 10 штаммах.

4.3 Запись результатов верификации СОПов в электронной базе КММ ТИБОХ ДВО РАН.

Результаты верификации СОПов внесены на сайт ТИБОХ ДВО РАН <http://piboc.dvo.ru/>, раздел Коллекция морских микроорганизмов.

4.4 Пополнение электронного каталога КММ ТИБОХ ДВО РАН.

Электронный каталог коллекции КММ ТИБОХ ДВО РАН пополнен информацией о 30 штаммах бактерий и грибов - <http://piboc.dvo.ru/>, раздел Коллекция морских микроорганизмов, файл каталога коллекции.

4.5 Подготовка статей в рецензируемых журналах

В соответствии с дополнительным государственным заданием на основе материалов КММ подготовлены две рукописи статей в рецензируемых журналах (Scopus, WoS), одна из которых опубликована: Nedashkovskaya O.I., Kim S.-G., Zhukova N.V., Mikhailov V.V. *Olleya*

algicola sp. nov., a new marine bacterium isolated from the green alga *Ulva fenestrata* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology//2017.V. 67. Pt. 7. P. 2205–2210. doi: 10.1099/ijsem.0.001926 (WoS, Scopus).

Дополнительно опубликованы тезисы двух докладов на международной конференции и направлено в печать три статьи (WoS, Scopus) (Приложение А).

4.6 Подготовка календарного плана работ

Подготовлен календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания:

- Создание Технологического паспорта КММ ТИБОХ ДВО РАН, 15.09.2017;
- Экспериментальная верификация трех СОПов, 28.09.2017;
- Промежуточный отчет о проделанной работе, 29.09.2017;
- Пополнение электронного каталога коллекции КММ ТИБОХ ДВО РАН, 30 штаммов бактерий и грибов, 15.12.2017;
- Направление в рецензируемые журналы (Scopus, WoS) не менее двух рукописей статей, подготовленных на основе материалов коллекции, 01.12.2017;
- Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания, 27.12.2017.

4.7 Размещение отчета о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания на интернет-сайте ТИБОХ ДВО РАН.

Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания размещен на интернет-сайте ТИБОХ ДВО РАН, раздел Коллекция морских микроорганизмов с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания (<http://piboc.dvo.ru/>) и Информационном портале БРК <http://brk.forge.sscs.ru/kollekcii/kollekcii-mikroorganizmov/kollekciya-morskih-mikroorganizmov-obshchebiologicheskogo-i>

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

«Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН» содержит около 5000 штаммов бактерий (4000) и грибов (1000), в том числе около 300 типовых штаммов бактерий и голотипов грибов-микроспоров. Представленная работа направлена на расширение биоресурсной коллекции и на экспериментальную верификацию методик поддержания коллекции. В рамках работы создан технологический паспорт коллекции, включающий в себя описание полного набора ключевых СОПов и научно-техническое обоснование смет СОПов коллекции. Также проведена экспериментальная верификация ключевых СОПов, пополнен электронный каталог коллекции, находящийся на сайте ТИБОХ ДВО РАН <http://piboc.dvo.ru/> и требуемые документы размещены на этом же сайте в разделе Коллекция морских микроорганизмов. По результатам подготовлены публикации в журналы, входящие в базы данных WoS и Scopus.

Таким образом, проведенная в рамках дополнительного государственного задания работа направлена на описание, сохранение и рациональное использование биологического разнообразия микроорганизмов и позволяет решать на базе Коллекции морских микроорганизмов задачи, представляющие как академический, так и прикладной интерес.

Поставленные задачи выполнены в полном объеме.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Fischer B. 1894. Die Bakterien des Meeres nach den Untersuchungen der Plankton-Expedition unter gleichzeitiger Berücksichtigung einiger alterer und neuerer Untersuchungen Ergebnisse der Plankton-Expedition der Humboldt-Stiftung, B. 4, S. 1–83.
2. Исаченко Б.Л. Микробиологические исследования Северного Ледовитого океана. Пг., 1914. 300 с.
3. ZoBell C.E. Marine Microbiology/Chronica Botanica Company. Waltham, USA, 1946. 240 p.
4. Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III. Journal of Experimental Medicine. 1944.V. 79. No 2. P. 137–158.
5. Woese C.R. There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself // Microbiol. Rev. 1994. V. 58, No. 1. P. 1-9.
6. Бондаревцев А.С. Шкала цветов. Пособие для биологов. М.: Изд-во АН СССР, 1954. 28 с.
7. Thom C., Raper K.B. A Manual of the *Aspergilli*. The Williams & Wilkins Co. 1945. 375 p.
8. Raper K.B., Thom C.A Manual of the *Penicillia* // Baltimore. The Williams & Wilkins Company. 1949. 875 p.
9. Халабуда Т.В. Новые виды рода *Penicillium* Link. // Новости систематики низших растений. Л. Наука, 1950. Т. 6. С. 161-169.
10. Abe S. // Studies on the classification of *Penicillia* // J. Gen. Appl. Microbiol., Tokyo. 1956. V. 2. P. 1-344.
11. Ames L.M. A Monograph of the Chaetomiaceae. Washington, 1961. 126 p.
12. Barron G.L., Cain R.F., Gilman J.C. The genus *Microascus* // Canadian Journal of Botany. 1961. V. 39. No 7. P. 1609-1641.
13. Cain R.F. Studies of coprophilous ascomycetes. VII. *Preussia* // Canadian Journal of Botany. 1961. V. 39. No 7. P. 1633-1666.
14. Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. Л.: Наука, 1967. 303 с.
15. Stolk A.G. Studies on the genus *Eupenicillium* Ludwig. I. Taxonomy and nomenclature of *Penicillia* in relation to their sclerotoid ascocarpic states // Persoonia. 1967. V. 4. Part 4. P. 391-405.

16. Stolk A.G., Scott De B. Studies on the genus *Eupenicillium* Ludwig. Taxonomy and nomenclature of *Penicillia* in relation to their sclerotoid ascocarpic states // *Persoonia*. 1967. V. 4. Pt. 4. P. 391-405.
17. Ellis M.B. Dematiaceous hyphomycetes. Kew: CMI, 1971. 608 p.
18. Stolk A.G., Samson R.A. The genus *Thalaromyces*. Studies on *Thalaromyces* and related genera. *Studies in mycology*. 1972. 264 p.
19. Милько А.А. Определитель мукооральных грибов. Киев. Наукова думка. 1974. 303 с.
20. Ellis M.B. More dematiaceous hyphomycetes // Kew: CMI. 1976. 507 p.
21. Билай В.И. Фузариин. Киев: Наукова думка, 1977. 442 с.
22. Кириленко Т.С. Определитель почвенных сумчатых грибов. К.: Наукова думка, 1978. 264 с.
23. Pitt J.I. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces* // Academic Press Inc. (London) Ltd. 1979. 634 p.
24. Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. Marine Mycology. Higher Fungi // N.Y. 1979. 690 p.
25. Ramirez C. Manual and atlas of the *Penicillia* // Elsevier Biomedical Press NY. 1982. 874 p.
26. Егорова Л.Н. Почвенные грибы Дальнего Востока. Гифомицеты. Л.: Наука, 1986. 192 с.
27. Билай В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы. Киев: Наук. Думка, 1988. 204 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Библиографический список публикаций, полученных в результате выполнения научно-исследовательской работы

Статья

1. Nedashkovskaya O.I., Kim S.-G., Zhukova N.V., Mikhailov V.V. *Olleya algicola* sp. nov., a new marine bacterium isolated from the green alga *Ulva fenestrata* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology//2017.V. 67. Pt. 7. P. 2205–2210. doi: 10.1099/ijsem.0.001926 WoS, Scopus

Olleya algicola sp. nov., a marine bacterium isolated from the green alga *Ulva fenestrata*

Olga I. Nedashkovskaya,^{1,2*} Song-Gun Kim,³ Natalia V. Zhukova^{2,4} and Valery V. Mikhailov^{1,2}

Abstract

A strictly aerobic, Gram-stain-negative, rod-shaped, motile by gliding and yellow-pigmented bacterium, designated strain 3Alg 18^T, was isolated from the Pacific green alga *Ulva fenestrata*. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that the novel strain was affiliated to the family *Flavobacteriaceae* of the phylum *Bacteroidetes*, being most closely related to the type strains of recognized species of the genus *Olleya*, with 16S rRNA gene sequence similarity of 97.9–99.3%. Strain 3Alg 18^T grew in the presence of 0.5–5% (w/v) NaCl and at 4–37 °C, and hydrolysed aesculin, casein, gelatin, starch and Tweens 20, 40 and 80. The prevalent fatty acids were iso-C_{15:0}, iso-C_{15:1} G, iso-C_{15:0} 3-OH, iso-C_{16:0} 2-OH, iso-C_{17:0} 3-OH, summed feature 3, iso-C_{16:0} 3-OH, anteiso-C_{15:0} and C_{15:0}. The polar lipid profile contained phosphatidylethanolamine, three unidentified aminolipids and four unidentified lipids. The major respiratory quinone was menaquinone MK-6. The genomic DNA G+C content was 34.6 mol%. On the basis of 16S rRNA gene sequence data, and chemotaxonomic and phenotypic characteristics, strain 3Alg 18^T represents a novel species of the genus *Olleya*, for which the name *Olleya algicola* sp. nov. is proposed. The type strain is 3Alg 18^T (=KCTC 22024^T=KMM 6133^T).

The genus *Olleya* was first proposed by Mancuso Nichols *et al.* [1] to accommodate strictly aerobic, Gram-negative, rod-shaped, gliding and orange–yellow marine bacteria affiliated with the family *Flavobacteriaceae*. The genus description was later emended by Lee *et al.* [2] and Lee *et al.* [3] on the basis of newly obtained phenotypic and genomic data. At the time of writing, the genus *Olleya* comprises three species with validly published names (www.bacterio.net/olleya.html). The type strain of the type species of the genus, *Olleya marilimosa*, was isolated from a particulate material sampled from the Southern Ocean [1]. *Olleya aquimaris* and *Olleya namhaensis* were isolated from seawater and wood fall samples, respectively, collected from coastal areas of the Korean peninsula [2, 3]. Strains of the genus *Olleya* exhibit a variety of biological activities and adaptations to the surrounding environment. Thus, strain *Olleya* sp. TH-K4, associated with the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, caused significant disturbance to embryonic development of the host organism, with 72–96% of the analysed embryos remaining spherical in shape or in growth arrest [4]. *Olleya* strains have also been recovered from the fishes *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis* during a survey of

pathogenic bacteria in a recirculating aquaculture system [5]. Furthermore, strains associated with the brown alga *Desmarestia anceps* and isolated from surface seawater in Antarctic marine environments produced extracellular pectinases and CM-cellulases [6]. The ability of *Olleya* strains to grow and degrade naphthalene, phenanthrene and pyrene was found during a study of microbial communities living in oil-polluted sediments in Caleta Cordova, Patagonia, Argentina [7]. Interestingly, while all recognized species of the genus *Olleya* were recovered from marine habitats, the isolation of strains affiliated with this genus from alpine glacier cryoconites and that grow only below 20 °C has also been reported [8].

During the course of a survey of bacterial diversity of the green alga *Ulva fenestrata*, a heterotrophic, aerobic, yellow-pigmented strain, designated 3Alg 18^T, was isolated. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences revealed that the novel isolate belonged to the family *Flavobacteriaceae* and clustered with members of the genus *Olleya*, in which it formed a distinct lineage. The aim of the present study was to define the taxonomic position of the novel strain belonging to the genus *Olleya* on the basis of its phylogenetic, genotypic and phenotypic characteristics.

Author affiliations: ¹G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Prospekt 100 Let Vladivostoku 159, 690022, Vladivostok, Russia; ²Far Eastern Federal University, Sukhanova St. 8, 690950, Vladivostok, Russia; ³Korean Collection for Type Cultures, Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 181 Ipsin-gil, Jeongeup-si, Jeollabuk-do 56212, Republic of Korea; ⁴A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Palchevskogo St. 17, 690032, Vladivostok, Russia.

*Correspondence: Olga I. Nedashkovskaya, olganedashkovska@piboc.dvo.ru or olganedashkovska@yahoo.com

Keywords: marine bacteria; Bacteroidetes; phylogeny; taxonomy; *Ulva fenestrata*.

The GenBank/EMBL/DBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of *Olleya algicola* sp. nov. 3Alg 18^T is KY341922.

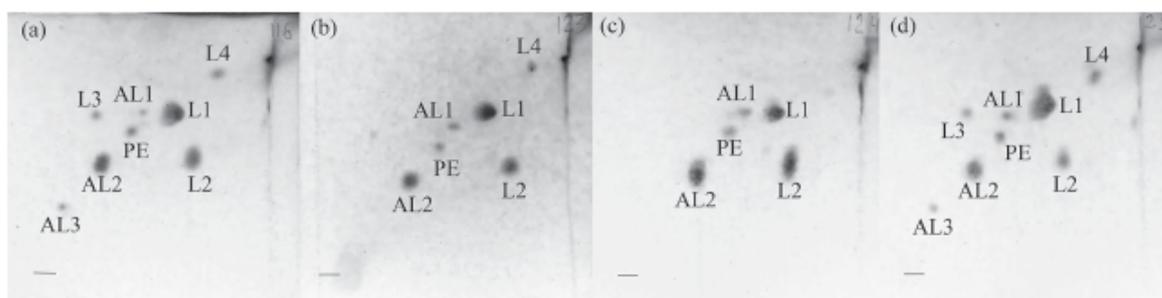


Fig. 2. Two-dimensional TLC of polar lipids of strain 3Alg 18^T (a), *O. maritimoso* CIP 108537^T (b), *O. aquimaris* KCTC 22661^T (c) and *O. namhaensis* KCTC 23673^T (d). PE, phosphatidylethanolamine; AL1, AL2 and AL3, unidentified aminolipids; L1, L2, L3 and L4, unidentified lipids.

D-glucose, D-mannose, mannitol, maltose, gluconate and adipate. In API 50CH, positive results are obtained for D-xylose, D-glucose, aesculin, maltose and glycogen. None of the substrates in the API ID 32GN gallery are utilized. In the API ZYM gallery, alkaline phosphatase, esterase lipase (C8), leucine arylamidase, cystine arylamidase, valine arylamidase, trypsin, α -chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α -glucosidase and β -glucosidase activities are present, but esterase (C4), lipase (C14), α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, *N*-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase and α -fucosidase activities are absent. The predominant fatty acids (>5%) are iso-C_{15:0}, iso-C_{15:1} G, iso-C_{15:0} 3-OH, iso-C_{16:0} 2-OH, iso-C_{17:0} 3-OH, summed feature 3, iso-C_{16:0} 3-OH, anteiso-C_{15:0} and C_{15:0}. The polar lipid profile consists of phosphatidylethanolamine, three unidentified aminolipids and four unidentified lipids. The major respiratory quinone is MK-6.

The type strain, 3Alg 18^T (=KCTC 22024^T=KMM 6133^T), was isolated from the green alga *Ulva fenestrata* collected from Troitsa Bay, Gulf of Peter the Great, Sea of Japan (also is known as East Sea), Pacific Ocean, Russia. The DNA G+C content of the type strain is 34.6 mol%.

Funding information

We thank for funding this work through the Program for Support and Development of Bioresource Collections of FASO Russia.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Nichols CM, Bowman JP, Guezennec J. *Olleya maritimoso* gen. nov., sp. nov., an exopolysaccharide-producing marine bacterium from the family Flavobacteriaceae, isolated from the Southern Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:1557–1561.
- Lee SY, Park S, Oh TK, Yoon JH. Description of *Olleya aquimaris* sp. nov., isolated from seawater, and emended description of the genus *Olleya* Mancuso Nichols et al. 2005. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;60:887–891.
- Lee MH, Jung YT, Park S, Yoon JH. *Olleya namhaensis* sp. nov., isolated from wood falls, and emended description of the genus

Olleya Mancuso Nichols et al. 2005 emend. Lee et al. 2010. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63:1610–1615.

- Kiselev KV, Ageenko NV, Kurilenko VV. Involvement of the cell-specific pigment genes *pks* and *sulf* in bacterial defense response of sea urchins *Strongylocentrotus intermedius*. *Dis Aquat Organ* 2013;103:121–132.
- Martins P, Cleary DFR, Pires ACC, Rodrigues AM, Quintino V et al. Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*. *PLoS One* 2013;8:e80847.
- Tropeano M, Vazquez S, Silvia Coria S, Turianski A, Cicero D et al. Extracellular hydrolytic enzyme production by proteolytic bacteria from the Antarctic. *Polar Res* 2013;34:253–267.
- Isaac P, Sánchez LA, Bourguignon N, Cabral ME, Ferrero MA. Indigenous PAH-degrading bacteria from oil-polluted sediments in Caleta Cordova, Patagonia Argentina. *Int Biodeterior Biodegr* 2013;82:207–214.
- Lee YM, Kim SY, Jung J, Kim EH, Cho KH et al. Cultured bacterial diversity and human impact on alpine glacier cryoconite. *J Microbiol* 2011;49:355–362.
- Nedashkovskaya OI, Kukhlevskiy AD, Zhukova NV, Kim SB. *Amylibacter ulvae* sp. nov., a new alphaproteobacterium isolated from the Pacific green alga *Ulva fenestrata*. *Arch Microbiol* 2016;198:251–256.
- Nedashkovskaya OI, Kukhlevskiy AD, Zhukova NV, Kim SJ, Rhee SK et al. *Winogradskyella litoreviva* sp. nov., isolated from coastal seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:3652–3657.
- Fautz E, Reichenbach H. A simple test for flexirubin-type pigments. *FEMS Microbiol Lett* 1980;8:87–91.
- Sasser M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *USFCC News* 1990;20:1–6.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911–917.
- Collins MD, Shah HN. Fatty acid, menaquinone and polar lipid composition of *Rothia dentocariosa*. *Arch Microbiol* 1984;137:247–249.
- Komagata K, Suzuki K-I. Lipid and cell wall analysis in bacterial systematics. *Methods Microbiol* 1987;19:161–207.
- Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol* 1961;3:208–218.
- Marmur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* 1962;5:109–118.
- De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem* 1970;12:133–142.

Downloaded from www.microbiologyresearch.org by

IP: 211.2209.220.73

On: Thu, 28 Sep 2017 02:26:09

Рисунок А.1 – Страницы первая и с разделом «Благодарности» с указанием источника финансирования статьи Nedashkovskaya O.I., Kim S.-G., Zhukova N.V., Mikhailov V.V. *Olleya*

algicola sp. nov., a new marine bacterium isolated from the green alga *Ulva fenestrata* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology//2017.V. 67. Pt. 7. P. 2205–2210. doi: 10.1099/ijsem.0.001926 WoS, Scopus

Тезисы докладов

Leshchenko E.V., Pivkin M.V., Ngoc N.T.D, Afiyatullof Sh. Sh. Chemical and biotechnological potential of marine plant-derived fungi of Russian and Vietnamese waters. //Marine Fungal Metabolites and their Bioactivities [Electronic Resource] : 1st Russian-Vietnamese Workshop, Nha Trang, October 31, 2017 : Book of abstracts / Ed.: Dr. Shamil Sh. Afiyatullof and Dr. Anton N. Yurchenko. – Electron. Data. – Vladivostok : Publishing House of the Far Eastern Federal University, 2017. – URL: http://piboc.dvo.ru/conf/Russviet_worksop.php. – ISBN 978-5-7444-4114-2.

Chemical and Biotechnological Potential of Marine Plant-Derived Fungi of Russian and Vietnamese Waters

Elena V. Leshchenko^{1,2}, Mikhail V. Pivkin¹, Ngo Thi Duy Ngoc³, Shamil Sh. Afiyatullo¹

¹*G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok, Russia*

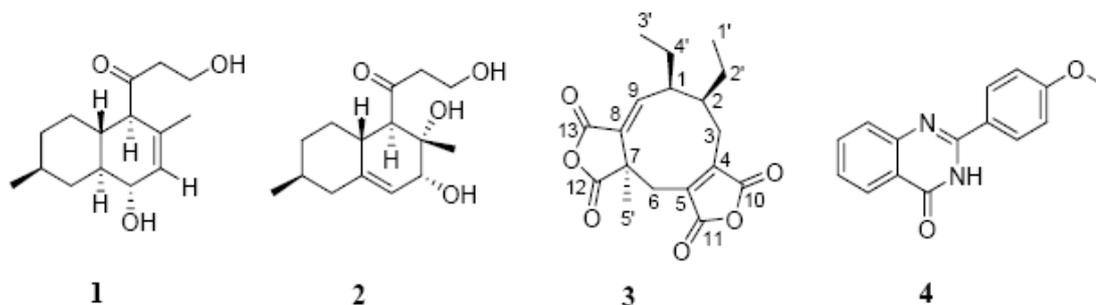
²*Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia*

³*Nhatrang Institute of Technology Research and Application, Vietnam Academy of Science and Technology, 02 Hung Vuong, Nha Trang*

E-mail: bykadorovachem@gmail.com

In recent years, a considerable number of new secondary metabolites have been isolated from marine-derived fungi. The total number of new natural products from this object currently more than 1500 and this number continues to increase every year. One of the most important sources for discovery of new bioactive compounds are marine plant-derived fungi including mangrove-associated fungi [1-4].

In previous works, we have been isolated five new eudesmane-type sesquiterpenes thomimarinines A-E from fungus *Penicillium thomii* KMM 4667, associated with seagrass *Zostera marina* (Sea of Japan), and 12 new polyketides zosteropenillines A-L from *P. thomii* KMM 4674, associated with the same seagrass. In addition, we isolated two new zosteropenillines (1,2) from *P. thomii* KMM 4679 associated with *Z. marina*. During our ongoing search, we screened extracts of 33 strains of marine fungi associated with leaves, foams, trunks and sediments of mangrove plants (Vietnam). The strains were identified based on morphological properties and molecular mycology methods. All strains were cultivated on agar medium and their EtOAc extracts were analyzed by TLC. The six perspective strains of fungi were selected for further research based on obtained data. Preliminary work was carried out to isolate and establish the structure of secondary metabolites from fungi *Talaromyces funiculosus* and *Penicillium oxalicum*. From *T. funiculosus* was isolated glaucanic acid (3) [5]. From *P. oxalicum* was isolated known synthetic quinazoline 2-(4-methoxyphenyl)quinazolin-4(3H)-one (4) [6]. The structures of isolated compounds were established based on spectroscopic methods and comparison with literature data.



The study was supported by Federal Agency for Scientific Organizations program for support the bioresource collections and the program «Far East» of the presidium of RAS (project VANT16-004) and by Vietnam Academy of Science and Technology (project VAST.HTQT.NGA.13/16-17).

1. Rateb M.E., Ebel R. // Nat. Prod. Rep. 2011. V. 28. P. 290-344.
2. Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H.G., Prinsep M.R. // Nat. Prod. Rep. 2017. V. 34. P. 235-294.
3. Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H.G., Prinsep M.R. // Nat. Prod. Rep. 2016. V. 33. P. 382-431.
4. Liming Jin, Chunshan Quan, Xiyuan Hou, Shengdi Fan // Mar. Drugs 2016. V. 14, 76; doi:10.3390/md14040076
5. Neiminen S., Tamm Ch. // Helv. Chim. Acta. 1981. V. 64. P. 2791-2801.
6. Hu Y., Chen L., Li B. // RSC Adv. 2016. V. 6. P. 65196-65204.

Рисунок А.2 – Страницы первая и с разделом «Благодарности» с указанием источника финансирования тезисов Leshchenko E.V., Pivkin M.V., Ngoc N.T.D, Afiyatullo Sh. Sh.

Chemical and biotechnological potential of marine plant-derived fungi of Russian and Vietnamese waters. //Marine Fungal Metabolites and their Bioactivities [Electronic Resource] : 1st Russian-Vietnamese Workshop, Nha Trang, October 31, 2017 : Book of abstracts / Ed.: Dr. Shamil Sh. Afiyatulloev and Dr. Anton N. Yurchenko. – Electron. Data. – Vladivostok : Publishing House of the Far Eastern Federal University, 2017. – URL: http://piboc.dvo.ru/conf/Russviet_worksop.php. – ISBN 978-5-7444-4114-2.

Sobolevskaya M.P., Leshchenko E.V., Trinh P.T.H, Dyshlovoy S.A., Kirichuk N.N., Berdyshev D.V., Pislyagin E.A., Popov R.S., Afiyatulloev Sh. Sh. Pallidopenillines: polyketides from the alga-derived fungus *Penicillium thomii* Maire KMM 4675. *Ibidem*.

**Pallidopenillines: Polyketides from the Alga-Derived Fungus *Penicillium thomii* Maire
KMM 4675**

Maria P. Sobolevskaya¹, Elena V. Leshchenko^{1,2}, Phan Thi Hoai Trinh^{3,4}, Sergey A. Dyshlovoy^{1,2,5},
Natalya N. Kirichuk¹, Dmitrii V. Berdyshev¹, Evgeny A. Pislyagin¹, Roman S. Popov¹, Shamil Sh.
Afiyatullof¹

¹*G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok, Russia*

²*Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia*

³*Nhatrang Institute of Technology Research and Application, Vietnam Academy of Science and
Technology, 02 Hung Vuong, Nha Trang*

⁴*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18
Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Ha Noi*

⁵*Department of Oncology, Hematology and Bone Marrow Transplantation with Section Pneumology,
Hubertus Wald-Tumorzentrum, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany
E-mail: afiyat@piboc.dvo.ru*

Eleven new polyketides, pallidopenillines **1–11**, were isolated from the alga-derived fungus *Penicillium thomii*. The fungal strain was isolated from superficial mycobiota of the brown alga *Sargassum pallidum* (Novik Bay, Russky Island, the Sea of Japan). The structures of these compounds were established based on spectroscopic methods. The absolute configuration of pallidopenilline A (**1**) as 4*R*, 5*S*, 8*S*, 9*R*, 10*R*, 13*R* was established using a combination of the modified Mosher's method, X-ray analysis, and NOESY data. The absolute configurations of **2–5** were determined by time-dependent density functional theory (TD-DFT) calculations of the ECD spectra, ECD and NOESY data.

Compounds **1**, **5**, **7–11** were examined for their cytotoxic activity against the human prostate cancer 22Rv1, PC-3, and LNCaP cell lines. Pallidopenilline G (**10**) exhibited cytotoxicity against the 22Rv1 cell line with an IC₅₀ value of 9.8 μM. The activity of these pallidopenillines with respect to the formation and growth of 22Rv1 cell colonies was also studied using the soft agar method. The compounds 1-acetyl-pallidopenilline A (**2**) and pallidopenilline G (**10**) were shown to inhibit the colony growth of these cells by 40% at 2 and 1 μM, respectively. Pallidopenillines **1–5** were assayed for their cytotoxic activity against the MEL-28 and HCT-116 cell lines. None of the compounds exhibited cytotoxicity (IC₅₀ > 100 μM).

The compounds 15-deacetyl-pallidopenilline B (**4**), pallidopenilline E (**8**) and pallidopenilline G (**10**) at a concentration of 10 μM induced a significant down-regulation of ROS production in macrophages stimulated with LPS. The ROS level in these cells was decreased by 27±1 (p < 0.01), 37±3 (p < 0.01) and 36±2 (p < 0.01) percent, respectively, compared to control cells pretreated with LPS.

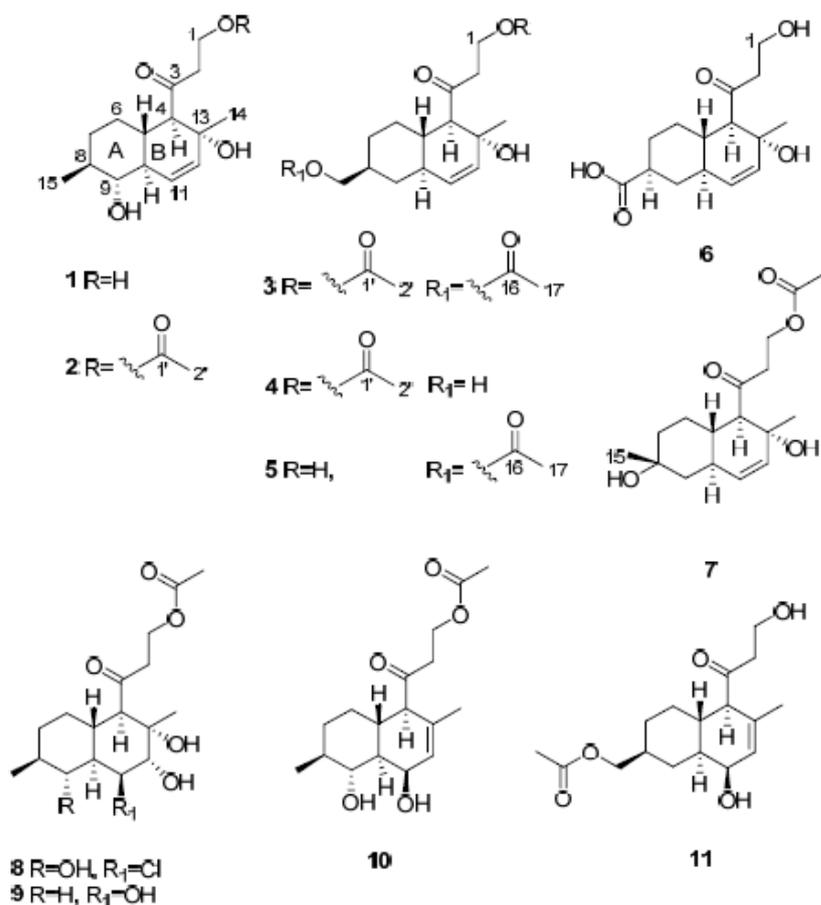


Figure 1. Metabolites of the *Penicillium thomii*: pallidopenilline A (1), 1-acetyl-pallidopenilline A (2), pallidopenilline B (3), 15-deacetyl-pallidopenilline B (4), 1-deacetyl-pallidopenilline B (5), pallidopenilline C (6), pallidopenilline D (7), pallidopenilline E (8), pallidopenilline F (9), pallidopenilline G (10), pallidopenilline H (11)

The authors are grateful to the Far Eastern Center of Structural Researches for the X-ray investigation. This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (15-29-02572), and by the program «Far East» of the presidium of RAS (project VANT16-004) and by Vietnam Academy of Science and Technology (project VAST.HTQT.NGA.13/16-17). The fungal strain was provided by G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry collection of marine microorganisms (KMM) developed within project 0266-2017-0005.

Kirichuk N.N., Berdyshev D.V., Pislyagin E.A., Popov R.S., Afiyatullof Sh. Sh. Pallidopenillines: polyketides from the alga-derived fungus *Penicillium thomii* Maire KMM 4675. *Ibidem*.

Направлено в печать

Nedashkovskaya O.I., Kim S.-G., Balabanova L.A., Zhukova N.V., Bakunina I.Y., Mikhailov V.V. *Polaribacter staleyi* sp. nov., a polysaccharide-degrading marine bacterium isolated from the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Номер в IJSEM - Ms. No. IJSEM-D-17-00866R1

1 ***Polaribacter staleyi* sp. nov., a polysaccharide-degrading marine bacterium isolated from**
2 **the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis***

3

4 Olga I. Nedashkovskaya¹, Song-Gun Kim², Larissa A. Balabanova^{1,3}, Natalia V. Zhukova^{3,4}
5 Irina Y. Bakunina¹, and Valery V. Mikhailov^{1,3}

6

7

8 ¹ G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far-Eastern Branch of the
9 Russian Academy of Sciences, Pr. 100 Let Vladivostoku 159, 690022, Vladivostok, Russia

10 ² Korean Collection for Type Cultures, Biological Resource Center, Korea Research Institute
11 of Bioscience and Biotechnology, 181 Ipsin-gil, Jeongeup, Jeollabuk-do 56212, Republic of
12 Korea

13 ³ Far Easten Federal University, Sukhanova St. 8, 690950, Vladivostok, Russia.

14 ⁴ National Scientific Center of Marine Biology, Russian Academy of Science, Palchevskogo
15 17, Vladivostok 690041, Russia

16

17 **Author for correspondence:** Olga I. Nedashkovskaya. Tel: +7 4232 311168. Fax: +7 4232
18 314050. e-mail: olganedashkovska@piboc.dvo.ru or olganedashkovska@yahoo.com

19

20 **Subject category:** New Taxa – *Bacteroidetes*

21 **The GenBank/EMBL/DDBJ accession number** for the 16S rRNA gene sequence of
22 *Polaribacter staleyi* 10Alg 139^T is MF527139.

23 **Keywords:** *Polaribacter staleyi*, *Flavobacteriaceae*, marine bacteria, seaweed *Ahnfeltia*
24 *tobuchiensis*

25 **Running title:** Description of *Polaribacter staleyi* sp. nov.

265 galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, *N*-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase
266 and α -fucosidase activities are absent. No flexirubins are formed. Nitrate is not reduced.
267 Hydrogen sulphide, indole and acetoin are not produced. Susceptible to ampicillin,
268 carbenicillin, cefalexin, chloramphenicol, erythromycin, doxycycline, lincomycin, nalidixic
269 acid, ofloxacin, oleandomycin, rifampicin, tetracycline and vancomycin; and resistant to
270 benzylpenicillin, cefazolin, gentamicin, kanamycin, neomycin, oxacillin, polymyxin and
271 streptomycin. The prevalent fatty acids are iso-C_{13:0}, iso-C_{15:0}, C_{15:0}, C_{15:1 ω 6c}, iso-C_{15:0} 3-OH
272 and C_{15:0} 3-OH. The polar lipid profile consists of phosphatidylethanolamine, two unknown
273 aminolipids and four unknown lipids. The main respiratory quinone is menaquinone 6 (MK-
274 6). The DNA G + C content of the type strain is 31.8 mol%.

275 The type strain, 10Alg 139^T (= KCTC 52773^T = KMM 6729^T), was isolated from the red alga
276 *Ahnfeltia tobuchiensis* collected from Troitsa Bay, the Sea of Japan, Russia.

277

278 **Funding information**

279 We thank for funding this work through the Federal Agency for Scientific
280 Organizations (FASO Russia) program for support the bioresource collections. NVZ
281 thanks the Russian Science Foundation (Contract no. 14-50-00034) for support in the
282 fatty acids and polar lipids analyses.

283

284 **Conflict of Interest**

285

286 The authors declare no conflict of interest.

287

288

289

290

bacterium isolated from the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. WoS, Scopus

Elena V. Ivanets, Anton N. Yurchenko, Olga F. Smetanina, Anton B. Rasin, Mikhail V. Pivkin, Roman S. Popov, Sergey A. Dyshlovoy, Gunhild von Amsberg, Shamil Sh. Afiyatulloev
Asperindoles A-D and *p*-terphenyl derivative from the ascidian-derived fungus *Aspergillus candidus* Link KMM 4676 // Marine Drugs WoS, Scopus

Asperindoles A-D and *p*-Terphenyl Derivative from the Ascidian-Derived Fungus *Aspergillus candidus*

Link KMM 4676

Elena V. Ivanets,^{†,1} Anton N. Yurchenko,^{†,‡,1} Olga F. Smetanina,[†] Anton B. Rasin,[†] Mikhail V. Pivkin,[†] Roman S. Popov,[†] Sergey A. Dyshlovoy,^{§,†,‡} Gunhild von Amsberg,[§] Shamil Sh. Afiyatulloev[†]*

[†]G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Prospect 100-letiya Vladivostoka, 159, Vladivostok 690022, Russian Federation

[‡]Far Eastern Federal University, Sukhanova St., 8, Vladivostok 690000, Russian Federation

[§]Department of Oncology, Hematology and Bone Marrow Transplantation with Section Pneumology, Hubertus Wald-Tumorzentrum, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

¹These authors contributed equally to the manuscript.

Cytotoxicity Assay. The *in vitro* cytotoxicity of individual substances was evaluated using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, which was performed as previously described¹¹.

Cell cycle and apoptosis induction analysis. The cell cycle distribution as well as apoptosis was analyzed by flow cytometry using PI staining as described before with slight modifications¹². In brief, cells were pre-incubated overnight in 6-well plates (2×10^5 cells/well in 2 mL/well). The medium was changed to fresh medium containing different concentrations of the substances. After 48 h of treatment, cells were harvested with a trypsin-EDTA solution, fixed, stained, and analyzed by FACS. The results were quantitatively analyzed using Cell Quest Pro software. Cells appeared at sub-G1 peak were assumed as apoptotic.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. ¹H, ¹³C, DEPT, COSY-45, HSQC, HMBC and ROESY spectra of new compounds **1-4** are available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* Tel/Fax: +7(423)2314050. E-mail: yurchant@ya.ru.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENT

This chemical study was supported by the Grant of President of Russia (mk-3895.2018.4), fungal material used in the study was provided by G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry collection of marine microorganisms «KMM», developed within project 0266-2017-0005. The

molecular genetic investigation of the fungal strain was supported by Russian Foundation for Basic Research (grant № 15-29-02572).

Рисунок А5. Страницы первая и с разделом «Благодарности» с указанием источника финансирования статьи Elena V. Ivanets, Anton N. Yurchenko, Olga F. Smetanina, Anton B. Rasin, Mikhail V. Pivkin, Roman S. Popov, Sergey A. Dyshlovoy, Gunhild von Amsberg, Shamil Sh. Afiyatulloev Asperindoles A-D and *p*-terphenyl derivative from the ascidian-derived fungus *Aspergillus candidus* Link KMM 4676 // Marine Drugs WoS, Scopus

Kokoulin M., Kalinovsky A., Sokolova E., Romanenko L., Mikhailov V., Komandrova N. 5-Acetamido-3,5-dideoxy-L-glycero-L-manno-non-2-ulosonic acid containing lipopolysaccharide from marine bacterium *Pseudomonas glareae* KMM 9500^T: Partial structure and immunology // Carbohydrate Polymers.

5-Acetamido-3,5-dideoxy-L-glycero-L-manno-non-2-ulosonic acid containing lipopolysaccharide from marine bacterium *Pseudomonas glareae* KMM 9500^T: Partial structure and immunology.

Maxim S. Kokoulin¹, Anatoly I. Kalinovsky¹, Ekaterina V. Sokolova¹, Lyudmila A. Romanenko¹, Valery V. Mikhailov^{1,2}, Nadezhda A. Komandrova¹

¹G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, 100 Let Vladivostoku Prosp., 159, 690022, Vladivostok, Russian Federation

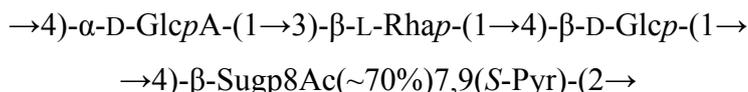
²Far Eastern Federal University, Suhanova St., 8, 690950, Vladivostok, Russian Federation

Abstract

The partial structure and immunological properties of the lipopolysaccharide (LPS) of *Pseudomonas glareae* KMM 9500^T, a bacterium isolated from a sediment sample collected from the Sea of Japan seashore, was studied. The O-polysaccharide was built up of linear tetrasaccharide repeating units constituted by D-glucuronic acid (D-GlcA), L-rhamnose (L-Rha), D-glucose (D-Glc)

¹ Fax: +7 4232 314050; E-mail: maxchem@mail.ru (M.S. Kokoulin)

and 5-N-acetyl-7,9-O-[(S)-1-carboxyethylidene]-3,5-dideoxy-L-glycero-L-manno-non-2-ulosonic acid (Sugp8Ac(~70%)7,9(S-Pyr)), partially substituted by an O-acetyl group at position 8 (~70%):



The lipid A fraction consisted mainly of symmetric hexa-acylated, penta-acylated and tetra-acylated components in which 3-hydroxydecanoyl and 3-hydroxydodecanoyl residues were linked as primary acyl substituents to the classical bisphosphorylated D-glucosamine disaccharide, while secondary substitutions of N-acyl fatty acids were presented only as dodecanoyl residues. From biological point of view, the *P. glareae* KMM 9500^T LPS showed to possess a low pro-inflammatory capacity and a significant antagonistic activity toward hexa-acylated *Escherichia coli* LPS in human blood *in vitro*.

Keywords: Marine bacterium; *Pseudomonas glareae*; Lipopolysaccharide; 5-acetamido-3,5-dideoxy-L-glycero-L-manno-non-2-ulosonic acid

structure: $\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-Sugp8Ac(~70\%)\text{7,9(S-Pyr)-(2}\rightarrow$, where Sug is 5-N-acetyl-3,5-dideoxy-L-glycero-L-manno-non-2-ulosonic acid. Similar higher sugar with *lyxo* configuration of the C4-C6 fragment previously was found in *Rhodococcus equi* serotype 4 capsular polysaccharide and was designated as rhodaminic acid (Severn & Richards, 1999). Unfortunately, the authors did not describe the configuration of the chiral center at C-8, so it is not clear whether these are the same sugars or not. The presence of 7,9-O-(1-carboxyethylidene)-derivative of another sialic acid (neuraminic acid) was reported for *Bordetella trematum* OPS (Vinogradov & Caroff, 2005). In addition, it should be noted that the trisaccharide fragment of the *P. glareae* KMM 9500^T OPS $\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$ previously was found in the capsular polysaccharide of *Klebsiella* sp. serotype K17 (Dutton & Folkman, 1980) and in the exopolysaccharide of *Burkholderia brasiliensis* (Mattos, Jones, Heise, Previato & Mendonca-Previato, 2001).

Therefore, the O-antigens of marine microorganisms continue to be a source of a rare derivative of monosaccharides and contribute to the structural chemistry of microbial polysaccharides.

Acknowledgments

The research was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) No. 15-04-03207 and Federal Agency for Scientific Organizations program for support the bioresource collections No. 0266-2017-0005. The authors thank Dr. S.D. Anastyuk for help with ESI-MS analysis. The authors also thank the Bacterial Carbohydrate Structure Database (<http://csdb.glycoscience.ru/bacterial>).

Рисунок А6. Страницы первая и с разделом «Благодарности» с указанием источника финансирования статьи Kokoulin M., Kalinovsky A., Sokolova E., Romanenko L., Mikhailov V., Komandrova N. 5-Acetamido-3,5-dideoxy-L-glycero-L-manno-non-2-ulosonic acid containing lipopolysaccharide from marine bacterium *Pseudomonas glareae* KMM 9500^T: Partial structure and immunology // Carbohydrate Polymers. WoS, Scopus.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Стандартные операционные процедуры КММ ТИБОХ ДВО РАН

Все СОПы составлены: В.В. Михайлов, чл.-корр. РАН, куратор КММ

Содержание и назначение: обеспечивают развитие и поддержание коллекционного фонда КММ ТИБОХ ДВО РАН

Местонахождение: ТИБОХ ДВО РАН

Пересмотр через: 1 год

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

Каждый штамм бактерий и грибов в КММ сохраняется теми способами, которые наиболее приемлемы для них (также учитывается стоимость способа). 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.

Стандартная операционная процедура по контролю жизнеспособности культур в «Коллекции морских микроорганизмов»

Контроль жизнеспособности культур в Коллекции морских микроорганизмов осуществляется следующим образом.

Он состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих СОП:

- Стандартная операционная процедура по выделению культур
- Стандартная операционная процедура по пересеву культур
- Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур
- Стандартная операционная процедура по подготовке к криоконсервации культур

1. Контроль жизнеспособности культур, находящихся на хранении при температуре -80-85 °С.

1.1. Пробирки, находившиеся на хранении, размораживают максимально быстро.

1.2. Из пробирки с суспензией клеток в растворе криопротектора, отбирают аликвоту 100 мкл и производят посев на соответствующую питательную среду в чашки Петри.

1.3. После посева чашки Петри помещают в термостат.

1.4. Чашки выдерживают в термостате в течение 3-14 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

1.5. Выросшие изолированные колонии при необходимости снова переносят в раствор криопротектора и ставят на хранение в низкотемпературный холодильник или используют для работы.

1.6. В некоторых случаях, если рост на агаризованной среде не наблюдается, производят посев в соответствующую жидкую среду и ставят на качалку и проводят описанные выше процедуры.

1.7. Одновременно проводят контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

2. Контроль жизнеспособности культур после хранения при +4-+6 °С.

2.1. С поверхности скошенной агаризованной среды или столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящихся на хранении при температуре +4-+6 °С производится посев на соответствующую питательную среду в чашки Петри.

2.2. После посева чашки Петри помещают в термостат.

2.3. Чашки выдерживают в термостате в течение 3-4 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

- 2.4. Выросшие изолированные колонии отсевают бактериальной петлей или крючком на поверхность скошенной плотной среды.
- 2.5. Пробирки с выросшими по штриху колониями ставят на хранение при температуре +4-+6 °С.
- 2.6. Одновременно проводят контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.
- 2.7. В некоторых случаях, если рост на агаризованной среде не наблюдается, производят посев в соответствующую жидкую среду и проводят процедуры, описанные выше.
- 2.8 Одновременно проводят контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

Контроль жизнеспособности культур осуществляется с использованием следующего оборудования: ламинарные боксы, автоклавы, термостаты, термостатируемые качалки, микроскопы, наборы микропипеток, источники питания, холодильники, центрифуги, вытяжные шкафы и др.

Стандартная операционная процедура для коррекции нарушений качества хранения культур в Коллекции морских микроорганизмов

Метод коррекции нарушений качества единиц хранения коллекционных культур представляет собой своевременное выявление и замену некачественных единиц хранения качественными (аутентичными) культурами, отвечающими видовым и паспортным свойствам, требованиям чистоты и жизнеспособности. Метод обеспечивает надлежащее качество поддерживаемого коллекционного фонда, гарантированное сохранение жизнеспособности и стабилизацию первоначальных свойств чистых идентифицированных детально охарактеризованных культур бактерий и грибов.

1. Проверка коллекционной культуры на аутентичность в соответствии с требованиями СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда бактерий и грибов.
2. При выявлении несоответствия признаков выбранного образца коллекционной культуры видовым и паспортным свойствам, требованиям чистоты и жизнеспособности проводится повторная экспертиза идентичного образца культуры, взятого из другой криопробирки и составляется протокол об этом происшествии.
3. При выявлении несоответствия признаков повторного идентичного образца коллекционной культуры видовым и паспортным свойствам, требованиям чистоты и жизнеспособности проводится экспертиза образца данной культуры, взятого из другой партии (способа) хранения.
4. При выявлении соответствия признаков проверяемого образца культуры видовым и паспортным свойствам, требованиям чистоты и жизнеспособности данный образец закладывается на хранение, а образцы культуры, не прошедшие проверку снимаются с хранения и в дальнейшем не используются в работе.

Стандартная операционная процедура по выделению новых штаммов бактерий и грибов в Коллекции морских микроорганизмов

Выделение новых штаммов в «Коллекции морских микроорганизмов» осуществляется следующим образом.

Выделение чистой культуры микроорганизмов состоит из ряда последовательных процедур: Рассев (из разведений или нет) посевного материала методом Коха на агаризованную среду МА 1226 (иногда другие среды) в чашках Петри.

Выделение культуры из выросших колоний.

Определение чистоты выделенного штамма.

Выделение чистой культуры.

Выделение чистой культуры проводится из отдельной колонии (иногда из отдельной клетки).

Метод выделения чистой культуры из отдельной колонии применим для аэробных и микроаэрофильных и, иногда, для факультативно-анаэробных микроорганизмов, которые растут на плотных средах.

На поверхность застывшей среды наносят каплю посевного материала распределяют её по поверхности плотной среды в чашке Петри шпателем Дригальского. Далее этим же шпателем протирают поверхность среды последовательно по второй, третьей и четвертой чашках (иногда и пятой чашки Петри). Иногда используется метод истощающего штриха. После посева чашки Петри помещают в термостат (обычно при 28 °С). Чашки выдерживают в термостате в течение 3-14 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов. Выросшие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенной плотной среды в пробирке или в жидкую среду или на поверхность агаризованной среды в чашке Петри штрихом.

Определение чистоты выделенной культуры осуществляется несколькими способами: визуальным, микроскопическим контролем и высевом на ряд питательных сред и, иногда, молекулярно-биологическими методами.

Выделение культур осуществляется с использованием соответствующего (ламинарные боксы, автоклавы, термостаты и др.) оборудования.

Стандартная операционная процедура по идентификации штаммов бактерий и грибов по морфологическим, физиологическим и молекулярно-генетическим характеристикам в Коллекции морских микроорганизмов

Бактерии

Макроморфологические признаки

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

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

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).

Грибы

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

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

Молекулярно-генетические характеристики

Идентификация культур молекулярно-биологическими методами в «Коллекции морских микроорганизмов» состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

- «Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур»
- «Стандартная операционная процедура по выделению новых штаммов бактерий и грибов в Коллекции морских микроорганизмов»

Идентификация культур молекулярно-биологическими методами по последовательности гена 16S rRNA бактерий состоит из ряда последовательных процедур, включающих в себя выделение геномной ДНК, амплификацию гена 16S rRNA, визуализацию при помощи горизонтального гель-электрофореза, подготовку полученных ампликонов и получению информации о последовательности с использованием программы Sequence Scanner v1.0.

1. Выделение геномной ДНК

С помощью одноразовой стерильной микробиологической петли 5-10 мг микробной культуры переносится в стерильную пробирку на 1.5 мл. Выделение геномной ДНК проводится с использованием коммерческих наборов для выделения ДНК «GeneJET Gel Extraction Kit» или «MaqJET Plant Genomic DNA Kit» (ThermoScientific), согласно инструкции производителя.

2. Амплификация гена 16S rRNA.

На одну реакцию берется 25 мкл набора для проведения ПЦР «Dream Taq Green PCR Master Mix (2X)» (ThermoScientific), по 5 мкл 5 μ M раствора прямого и обратного праймера, 3 мкл раствора ДНК, 10 мкл ddH₂O. Пробирки с готовой смесью ставятся в амплификатор «DNA Engine Tetrad 2 peltier Thermal Cycler» (BioRad). Выставляется температура первичной денатурации 95°C на 10 мин., затем основная программа, состоящая из 30 циклов: 94°C – 30 сек, 55°C – 30 сек, 72°C – 1,5 мин. После последнего цикла, образцы выдерживаются при 70°C в течение 7 мин для заполнения выступающих 5 штрих концов ПЦР продуктов комплементарной цепью.

3. Электрофоретический анализ образцов

Визуализация продуктов амплификации проводится методом горизонтального гель-электрофореза в присутствии бромистого этидия. Гель-электрофорез проводится с использованием буферного раствора TAE в 1% агарозном геле. Концентрированный 50x буферный раствор разводится дистиллированной водой из расчета 1 мл на 50 мл до 1x конечного раствора. Для получения 1% - го геля используется 1 гр. агарозы, 75 мл дистиллированной воды и 1,5 мл концентрированного буферного раствора TAE. Периодически перемешивая, смесь нагревается в микроволновой печи до полного

растворения агарозы. Не доводя до кипения, гель вынимается из микроволновой печи и остывает приблизительно до 40-50⁰С. Далее в него добавляется 1,5 мкл бромистого этидия и заливается в форму. Для образования ячеек вставляются гребешки и гель оставляется на 20-30 минут для полимеризации.

В первую ячейку геля наносится 5 мкл ДНК-маркера «FastRuler™ Middle Range DNA Ladder» (Fermentas), в последующие ячейки каждый из продуктов ПЦР. Электрофорез проводится при напряжении в 100 В в течении 40 минут. Результат определяется под ультрафиолетом на гель-документирующей системе «VersaDoc XR Sistem» (BioRad).

4. Подготовка образцов для проведения секвенирования.

4.1 Очистка продуктов амплификации

Очистка продуктов амплификации проводится с использованием набора для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей «Cleanup Standart» (Евроген) согласно инструкции производителя.

4.2 Постановка реакции Сенгера.

Для постановки реакции Сэнгера используется коммерческий набор «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems). Подготавливается мастер-микс: 20 мкл воды, 6 мкл Buffer 5x, 1 мкл Big Dye, 1 мкл. Смесь перемешивается на вортексе «Microspin FV-2400» (BIOSAN) и сбрасываются капли. В тонкостенные пробирки мастер-микс аликвотируется по 28 мкл, затем добавляется 2 мкл продукта ПЦР. Образцы перемешиваются на вортексе и сбрасываются капли. На амплификаторе «AB 2720 Thermal Cycler» (BioRad) выставляется программа р.Сенгера: 95⁰С – 3 мин, 98⁰С – 8 сек, 54⁰С – 10 сек, 60⁰С – 4 мин, 60⁰С – 10 мин. Хранение - 4⁰С. Всего 30 циклов.

4.3 Очистка продуктов реакции Сенгера

Пробирки после хранения на -20⁰С прогрели при 98⁰С в течении 5мин. В 1.5 мл пробирки добавляется 2 мкл 0.5М ЭДТА, 30 мкл продуктов р.Сенгера и 92 мкл перегнанного этанола. Тщательно перемешивается на вортексе и оставляется на 10 мин при комнатной температуре. Центрифугируется 20 мин при 13200 об/мин на центрифуге «5804R» (Eppendorf). С помощью автоматической пипетки удаляется супернатант. Добавляется 180 мкл 75% этанола. Центрифугируется 3 мин при 13200 об/мин. Удаляется супернатант и образцы сушатся в сушильном шкафу «E 28» (BINDER) при 70⁰С 10-15 мин.

5. Секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей

Определения нуклеотидной последовательности образцов ДНК проводится на секвенаторе «3130xl Genetic Analyzer» (Applied Biosystems).

Обработка и анализ полученных данных проводится с использованием программного обеспечения Sequence Scanner v1.0. Полученные на автоматическом секвенаторе нуклеотидные последовательности фрагментов 16S рДНК редактируют с помощью программы Mega v. 6.0. Как фрагменты 16S рДНК, так и полные нуклеотидные последовательности 16S рДНК могут сравниваться с имеющимися в базах данных (GenBank) нуклеотидными последовательностями. Для этого используется программа BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Идентификация культур по последовательности гена 16S rRNA осуществляется с использованием следующего оборудования.

А. Оборудование для выделения геномной ДНК из образцов микробных культур

- боксированное помещение
- горелка спиртовая
- одноразовая стерильная микробиологическая петля
- пробирки объемом 1,5 мл, 0,2 мл
- вортекс MS 3 (ИКА)
- дозаторы емкостью 0,5-5 мкл, 5-50 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (Thermo Scientific, Ленпипет)
- центрифуга MiniSpin plus (Eppendorf)
- термостат TDB-120 (BioSan)

В. Оборудование для проведения гель-электрофореза

- основной блок питания «Эльф-8» (ДНК-технология)
- камера для горизонтального гель-электрофореза
- гель-документирующая система VersaDoc XR Sistem(BioRad)

Г. Оборудование для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР)

- амплификатор DNA Engine Tetrad 2 peltier Thermal Cyclер (BioRad)
- дозаторы емкостью 0,5-5 мкл, 5-50 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (Thermo Scientific, Ленпипет)

Д. Оборудование для очистки продуктов ПЦР

- центрифуга MiniSpin plus (Eppendorf)
- вортекс MS 3 (ИКА)

Е. Оборудование для постановки р.Сенгера

- автоматические пипетки емкостью 1-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл (Eppendorf, Германия),

- амплификатор AB 2720 Thermal Cycler (BioRad)

- вортексе Microspin FV-2400 (BioSan)

Ж. Оборудование для очистки продуктов р.Сенгера

- вортекс Microspin FV-2400 (BioSan)

- центрифуге 5804R (Eppendorf)

- сушильный шкаф E 28 (BINDER)

3. Оборудование для проведения секвенирования и анализа результатов

- секвенаторе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

- персональный компьютер, работающий под управлением Windows XP с установленным программным обеспечением.

Уточнение таксономической принадлежности и филогенетического положения грибов проводится на основе изучения молекулярно-генетических признаков с использованием метода мультилокусного анализа (генов ITS, бета-тубулина и калмодулина) с последующим nBLAST-анализом полученных результатов в базе данных NCBI ([www.http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). Для амплификации генов ITS используются праймеры ITS1 и ITS4, бета-тубулина – праймеры Bt2a и Bt2b, калмодулина – Cmd5 и Cmd6.

Для выделения геномной ДНК 0,5 г клеток культуры гриба разрушают жидким азотом и экстрагируют в 5 мл 4М гуанидина изотиоцианата и разделяют на 2 пробирки. В каждую пробирку добавляют равный объем смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1, перемешивают, центрифугируют 10 мин при 13000 об/мин. К водной фазе добавляют 1/10 объема 3М ацетата натрия (рН 5.2) и равный объем изопропанола (для осаждения). Осадок ДНК собирают центрифугированием в течение 10 мин при 13000 об/мин, несколько раз промывают 70%-ным этанолом, затем один раз 96%-ным этанолом (чтобы быстрее высушить), высушивают при комнатной температуре, либо в термостате при 37 °С, и растворяют в 500-1000 мкл бидистиллированной воды.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Экспериментальная верификация СОПов КММ ТИБОХ ДВО РАН

1. 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. Zalesky, 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, pH 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, pH 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 «суло-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 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, ВD 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, ВD 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, ВD 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 pectinovorus* 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 °С 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 °С. Клетки штамма 8021 поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс 4-6 °С. 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 °С 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 °С. Клетки штамма КММ 8184 поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс 4-6 °С. 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 °С 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 °С. Клетки штамма КММ 8419 поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, находящимися на хранении при температуре плюс 4-6 °С. 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 °С 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, BD 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, BD 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, BD 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, BD 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 криопробирках 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.

2. Стандартная операционная процедура по контролю жизнеспособности культур морских грибов в Коллекции морских микроорганизмов

Грибные штаммы:

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

Контроль жизнеспособности грибных культур в «Коллекции морских микроорганизмов» осуществляется следующим образом.

Он состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих СОП:

- Стандартная операционная процедура по выделению культур
- Стандартная операционная процедура по пересеву культур
- Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур
- Стандартная операционная процедура по подготовке к криоконсервации культур

1. Контроль жизнеспособности культур, находящихся на хранении при температуре -80-85°C.

1.1. Пробирки, находившиеся на хранении, размораживали максимально быстро.

1.2. Из пробирки с мицелиальной культурой в растворе криопротектора, отбирали аликвоту 100 мкл или часть мицелия и производили посев на питательную «сусло-агаровую» среду в чашки Петри.

1.3. После посева чашки Петри оставляли в условиях микробиологического бокса, при комнатной температуре.

1.4. Чашки выдерживали при комнатной температуре в течение 7-14 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

1.5. Выросшие колонии гриба при необходимости снова переносили в раствор криопротектора (контрольный пересев) и ставили на хранение в низкотемпературный холодильник или использовали для работы.

1.6. В некоторых случаях, если рост на агаризованной среде не наблюдался, производили посев в среду с жидким пивным сусликом, приготовленной на натуральной морской воде и ставили на качалку без термостатирования, культивируют 7 дней, скорость вращения 170 об/мин и проводили описанные выше процедуры. Состав среды: жидкое пивное суслик – 20 мл; морская вода – 80 мл, pH 7,8 – 8,2.

1.7. Одновременно проводили контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

2. Контроль жизнеспособности культур после хранения при +4-+6 °С.

2.1. С поверхности скошенной агаризованной среды или столбика с картофельно-морковным агаром под минеральным маслом, находящихся на хранении при температуре +4-+6 °С производили пересев на суслик-агаровую питательную среду в чашки Петри.

2.2. После посева чашки Петри оставляли в условиях бокса.

2.3. Чашки выдерживали при комнатной температуре в течение 7–14 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

2.4. Выросшие изолированные колонии отсеивали микологическим крючком на поверхность скошенной плотной суслик-агаровой среды.

2.5. Пробирки с выросшими колониями грибов помещали на хранение при температуре +4-+6°С или оставляли при комнатной температуре в условиях бокса. Поддерживали культуру на той же среде, пересеивая на свежеприготовленную среду 1 раз в 3-4 недели.

2.6. Одновременно проводили контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

2.7. В некоторых случаях, если рост на агаризованной среде не наблюдался, производили посев в жидкую среду и проводили процедуры, описанные выше (см. п. 1.6).

2.8 Одновременно проводили контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

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°С 20 минут.

Контроль жизнеспособности культур осуществляется с использованием следующего оборудования и материалов: микробиологический бокс, автоклав, качалка, микроскоп, наборы микропипеток с дозаторами, крючок, спиртовая горелка, чашки Петри, стеклянные пробирки, конические колбы, плита, источники питания, штативы, холодильник; другая лабораторная посуда, расходные материалы и питательные среды.

БАКТЕРИИ

Контроль жизнеспособности культур в Коллекции морских микроорганизмов осуществляется следующим образом.

Он состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих СОП:

- Стандартная операционная процедура по выделению культур
- Стандартная операционная процедура по пересеву культур
- Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур
- Стандартная операционная процедура по подготовке к криоконсервации культур

1. Проводили контроль жизнеспособности 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, находящихся на хранении при температуре -80-85 °С.

1.1. Пробирки, находившиеся на хранении, размораживали максимально быстро.

1.2. Из пробирки с суспензией клеток в растворе криопротектора, отбирали аликвоту 100 мкл и производили посев на питательную среду Морской агар 2216 (Difco, USA) в чашки Петри.

1.3. После посева чашки Петри помещали в термостат при 28°С.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 2 суток.

1.5. Выросшие изолированные колонии снова переносили в раствор криопротектора и ставили на хранение в низкотемпературный холодильник или использовали для работы.

1.6. Одновременно проводили контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

2. Проводили контроль жизнеспособности 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 после хранения при +4-+6 °С.

2.1. С поверхности скошенной агаризованной среды или столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящихся на хранении при температуре +4-+6 °С производили пересев на питательную среду Морской агар 2216 (Difco, USA) в чашки Петри.

2.2. После посева чашки Петри помещали в термостат при 28°С.

2.3. Чашки выдерживали в термостате в течение 2 суток.

2.4. Выросшие изолированные колонии отсевали бактериальной петлей на поверхность скошенной плотной среды.

2.5. Пробирки с выросшими по штриху колониями ставили на хранение при температуре +4-+6 °С.

2.6. Одновременно проводили контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП. Контроль жизнеспособности культуры 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 осуществляли с использованием следующего оборудования: ламинарные боксы, автоклавы, термостаты, термостатируемые качалки, микроскопы, наборы микропипеток, источники питания, холодильники, центрифуги, вытяжные шкафы и др.

1. Контроль жизнеспособности культур, находящихся на хранении при температуре -80-85 °С.

Штамм бактерии *Marinicella litoralis* КММ 3900^T помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 15.06.2008 г. 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.

1.1. Криопробирку с суспензией клеток штамма КММ 3900^T в растворе криопротектора размораживали 15-20 мин.

1.2. Из криопробирки отбирали аликвоту 100 мкл суспензии клеток штамма КММ 3900^T и производили посев на питательную агаризованную среду Морской Агар 2216 в чашки Петри.

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещали в термостат.

1.4. Чашки выдерживают в термостате в течение 3 суток.

1.5. Выросшие изолированные колонии бактерий КММ 3900^T переносили в раствор криопротектора и ставят на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре минус 80 °С.

1.6. Бактерии КММ 3900^T дают хороший рост на твердой среде Морской Агар 2216, поэтому посев в соответствующую жидкую среду не проводили.

1.7. Контроль чистоты культуры проводят согласно соответствующей СОП. Чистота культуры КММ 3900^T подтверждена визуальным и микроскопическим контролем.

2. Контроль жизнеспособности бактерий КММ 3900^T после хранения при +4-+6 °С.

2.1. Бактериальные клетки КММ 3900^T отбирали из столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящегося на хранении при температуре плюс 6 °С, и пересеивали на твердую питательную среду SWM в чашки Петри.

2.2. После посева чашки Петри помещали в термостат.

2.3. Чашки выдерживали в термостате в течение 3-4.

2.4. Выросшие на Морском Агаре 2216 изолированные колонии бактерий КММ 3900^T отсевали бактериальной петлей в столбик с полужидким агаром.

2.5. В пробирки с выросшими в полужидком агаре бактериями КММ 3900^T добавляли минеральное масло и ставли на хранение при температуре плюс 6 °С.

2.6. Одновременно проводили контроль чистоты культуры бактерий КММ 3900^T согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Loktanella maritima* КММ 9530^T помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 15.10.2012 г. 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.

1.1. Криопробирку с суспензией клеток штамма КММ 9530^T в растворе криопротектора размораживали 15-20 мин.

1.2. Из криопробирки отбирали аликвоту 100 мкл суспензии клеток штамма КММ 9530^T и производили посев на питательную агаризованную среду Морской Агар 2216 в чашки Петри.

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещали в термостат.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

1.5. Выросшие изолированные колонии бактерий КММ 9530^T переносили в раствор криопротектора и ставят на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре минус 80 °С.

1.6. Бактерии КММ 9530^T дают хороший рост на твердой среде Морской Агар 2216, поэтому посев в соответствующую жидкую среду не проводили.

1.7. Контроль чистоты культуры проводили согласно соответствующей СОП. Чистота культуры КММ 9530^T подтверждена визуальным и микроскопическим контролем.

2. Контроль жизнеспособности бактерий КММ 9530^T после хранения при +4-+6 °С.

2.1. Бактериальные клетки КММ 9530^T отбирали из столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящегося на хранении при температуре плюс 6 °С, и пересеивали на твердую питательную среду SWM в чашки Петри.

2.2. После посева чашки Петри помещают в термостат.

2.3. Чашки выдерживали в термостате в течение 3-4.

2.4. Выросшие на Морском Агаре 2216 изолированные колонии бактерий КММ 9530^T отсевали бактериальной петлей в столбик с полужидким агаром.

2.5. В пробирки с выросшими в полужидком агаре бактериями бактерий КММ 9530^T добавляли минеральное масло и ставят на хранение при температуре плюс 6 °С.

2.6. Одновременно проводят контроль чистоты культуры бактерий КММ 9530^T согласно соответствующей СОП.

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 (MB 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

1.1. Криопробирку с суспензией клеток штамма КММ 255^T в растворе криопротектора размораживали 15-20 мин.

1.2. Из криопробирки отбирали аликвоту 100 мкл суспензии клеток штамма КММ 255^T и производили посев на питательную агаризованную среду Морской Агар 2216 в чашки Петри.

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещали в термостат.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

1.5. Выросшие изолированные колонии бактерий КММ 255^T переносили в раствор криопротектора и ставят на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре минус 80 °С.

1.6. Бактерии КММ 255^T дают хороший рост на твердой среде Морской Агар 2216, поэтому посев в соответствующую жидкую среду не проводили.

1.7. Контроль чистоты культуры проводили согласно соответствующей СОП. Чистота культуры КММ 255^T подтверждена визуальным и микроскопическим контролем.

2. Контроль жизнеспособности бактерий КММ 255^T после хранения при +6 °С.

2.1. Бактериальные клетки КММ 255^T отбирали из столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящегося на хранении при температуре плюс 6 °С, и пересеивали на твердую питательную среду SWM в чашки Петри.

2.2. После посева чашки Петри помещают в термостат.

2.3. Чашки выдерживали в термостате в течение 3-4.

2.4. Выросшие на Морском Агаре 2216 изолированные колонии бактерий КММ 255^T отсеивали бактериальной петлей в столбик с полужидким агаром.

2.5. В пробирки с выросшими в полужидком агаре бактериями КММ 255^T добавляли минеральное масло и ставили на хранение при температуре плюс 6 °С.

2.6. Одновременно проводили контроль чистоты культуры бактерий КММ 255^T согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Pseudomonas glareae* КММ 9500^T помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 30.10.2012 г. Суспензия клеток штамма КММ

9500^T хранится в криобирках с морским бульоном 2216 (MB 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

1.1. Криобирку с суспензией клеток штамма КММ 9500^T в растворе криопротектора размораживали 12-20 мин.

1.2. Из криобирки отбирали аликвоту 100 мкл суспензии клеток штамма КММ 9500^T и производили посев на питательную агаризованную среду с морской водой, SWM, следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт - 2,5; NaCl - 5,0; глюкоза - 1,0; K₂HPO₄ - 0,2; MgSO₄ - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, агар - 15,0.

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещали в термостат.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

1.5. Выросшие изолированные колонии бактерий КММ 9500^T переносили в раствор криопротектора и ставили на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре минус 80 °С.

1.6. Бактерии КММ 9500^T дают хороший рост на твердой среде SWM и Морском Агаре 2216, поэтому посев в соответствующие жидкие среды не проводили.

1.7. Контроль чистоты культуры проводят согласно соответствующей СОП. Чистота культуры КММ 9500^T подтверждена визуальным и микроскопическим контролем.

2. Контроль жизнеспособности бактерий КММ 9500^T после хранения при +4-+6 °С.

2.1. Бактериальные клетки КММ 9500^T отбирали из столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящегося на хранении при температуре плюс 6 °С, и пересеивали на твердую питательную среду SWM в чашки Петри.

2.2. После посева чашки Петри помещали в термостат.

2.3. Чашки выдерживали в термостате в течение 3-4 суток до появления и сформирования колоний.

2.4. Выросшие на среде SWM изолированные колонии бактерий КММ 9500^T отсеивали бактериальной петлей в столбик с полужидким агаром.

2.5. В пробирки с выросшими в полужидком агаре бактериями КММ 9500^T добавляли минеральное масло и ставили на хранение при температуре плюс 6 °С.

2.6. Одновременно проводили контроль чистоты культуры бактерий КММ 9500^T согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерий *Sphingomonas molluscorum* КММ 3882^T помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 25.6.2003 г. Суспензия клеток штамма КММ

3882^T хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (MB 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

1.1. Криопробирку с суспензией клеток штамма КММ 3882^T в растворе криопротектора размораживали 12-20 мин.

1.2. Из криопробирки с суспензией клеток штамма КММ 3882^T отбирали аликвоту 100 мкл и производили посев на питательную агаризованную среду с морской водой, SWM, следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт - 2,5; NaCl - 5,0; глюкоза - 1,0; K₂HPO₄ - 0,2; MgSO₄ - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, агар - 15,0.

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещали в термостат.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

1.5. Выросшие изолированные колонии бактерий КММ 3882^T переносили в раствор криопротектора и ставили на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре минус 80 °С.

1.6. Бактерии КММ 3882^T дают хороший рост на твердой среде SWM и Морском Агаре 2216, поэтому посев в соответствующие жидкие среды не проводили.

1.7. Контроль чистоты культуры проводили согласно соответствующей СОП. Чистота культуры КММ 3882^T подтверждена визуальным и микроскопическим контролем.

2. Контроль жизнеспособности бактерий КММ 3882^T после хранения при +4-+6 °С.

2.1. Бактериальные клетки КММ 3882^T отбирали из столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящегося на хранении при температуре плюс 6 °С, производили пересев на твердую питательную среду SWM в чашки Петри.

2.2. После посева чашки Петри помещали в термостат.

2.3. Чашки выдерживали в термостате в течение 2-3 суток до появления и сформирования колоний.

2.4. Выросшие на среде SWM изолированные колонии бактерий КММ 3882^T отсеивали бактериальной петлей в столбик с полужидким агаром.

2.5. В пробирки с выросшими в полужидком агаре бактериями КММ 3882^T добавляли минеральное масло и ставят на хранение при температуре плюс 6 °С.

2.6. Одновременно проводят контроль чистоты культуры бактерий КММ 3882^T согласно соответствующей СОП.

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 (MB 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

1.1. Криопробирку с суспензией клеток штамма КММ 8009 в растворе криопротектора размораживают 15-20 мин.

1.2. Из криопробирки отбирали аликвоту 100 мкл суспензии клеток штамма КММ 8009 и производили посев на питательную агаризованную среду морской агар 2216 в чашки Петри.

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещали в термостат.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

1.5. Выросшие изолированные колонии бактерий КММ 8009 переносили в раствор криопротектора и ставили на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре минус 80 °С.

1.6. Бактерии КММ 8009 дают хороший рост на твердой среде морской агар 2216, поэтому посев в соответствующую жидкую среду не проводили.

1.7. Контроль чистоты культуры проводят согласно соответствующей СОП. Чистота культуры КММ 8009 подтверждена визуальным и микроскопическим контролем.

2. Контроль жизнеспособности бактерий КММ 8009 после хранения при +4-+6 °С.

2.1. Бактериальные клетки КММ 8009 отбирали из столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящегося на хранении при температуре плюс 6 °С, и пересеивали на твердую питательную среду морской агар 2216 в чашки Петри.

2.2. После посева чашки Петри помещают в термостат.

2.3. Чашки выдерживают в термостате в течение 3-4.

2.4. Выросшие на морском агаре 2216 изолированные колонии бактерий КММ 8009 отсеивали бактериальной петлей в столбик с полужидким агаром.

2.5. В пробирки с выросшими в полужидком агаре бактериями КММ 8009 добавляют минеральное масло и ставят на хранение при температуре плюс 6 °С.

2.6. Одновременно проводят контроль чистоты культуры бактерий КММ 8009 согласно соответствующей СОП.

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 (MB 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

1.1. Криопробирку с суспензией клеток штамма КММ 8017 в растворе криопротектора размораживали 15-20 мин.

- 1.2. Из криопробирки отбирали аликвоту 100 мкл суспензии клеток штамма КММ 8017 и производили посев на питательную агаризованную среду морской агар 2216 в чашки Петри.
- 1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещают в термостат.
- 1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.
- 1.5. Выросшие изолированные колонии бактерий КММ 8017 переносили в раствор криопротектора и ставят на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре минус 80 °С.
- 1.6. Бактерии КММ 8017 дают хороший рост на твердой среде морской агар 2216, поэтому посев в соответствующую жидкую среду не проводили.
- 1.7. Контроль чистоты культуры проводят согласно соответствующей СОП. Чистота культуры КММ 8017 подтверждена визуальным и микроскопическим контролем.

2. Контроль жизнеспособности бактерий КММ 8017 после хранения при +4-+6 °С.

- 2.1. Бактериальные клетки КММ 8017 отбирали из столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящегося на хранении при температуре плюс 6 °С, и пересевают на твердую питательную среду морской агар 2216 в чашки Петри.
- 2.2. После посева чашки Петри помещают в термостат.
- 2.3. Чашки выдерживали в термостате в течение 3-4.
- 2.4. Выросшие на морском агаре 2216 изолированные колонии бактерий КММ 8017 отсеивали бактериальной петлей в столбик с полужидким агаром.
- 2.5. В пробирки с выросшими в полужидком агаре бактериями КММ 8017 добавляли минеральное масло и ставят на хранение при температуре плюс 6 °С.
- 2.6. Одновременно проводят контроль чистоты культуры бактерий КММ 8017 согласно соответствующей СОП.

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 (MB 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

- 1.1. Криопробирку с суспензией клеток штамма КММ 8021 в растворе криопротектора размораживали 15-20 мин.
- 1.2. Из криопробирки отбирали аликвоту 100 мкл суспензии клеток штамма КММ 8021 и производили посев на питательную агаризованную среду морской агар 2216 в чашки Петри.
- 1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещают в термостат.
- 1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

1.5. Выросшие изолированные колонии бактерий КММ 8021 переносят в раствор криопротектора и ставят на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре минус 80 °С.

1.6. Бактерии КММ 8021 дают хороший рост на твердой среде морской агар 2216, поэтому посев в соответствующую жидкую среду не проводили.

1.7. Контроль чистоты культуры проводят согласно соответствующей СОП. Чистота культуры КММ 8021 подтверждена визуальным и микроскопическим контролем.

2. Контроль жизнеспособности бактерий КММ 8021 после хранения при +6 °С.

2.1. Бактериальные клетки КММ 8021 отбирали из столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящегося на хранении при температуре плюс 6 °С, и пересевают на твердую питательную среду морской агар 2216 в чашки Петри.

2.2. После посева чашки Петри помещают в термостат.

2.3. Чашки выдерживали в термостате в течение 3-4.

2.4. Выросшие на морском агаре 2216 изолированные колонии бактерий КММ 8021 отсеивали бактериальной петлей в столбик с полужидким агаром.

2.5. В пробирки с выросшими в полужидком агаре бактериями КММ 8021 добавляли минеральное масло и ставят на хранение при температуре плюс 6 °С.

2.6. Одновременно проводят контроль чистоты культуры бактерий КММ 8021 согласно соответствующей СОП.

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 температуре минус -80 °С.

1.1. Криопробирку с суспензией клеток штамма КММ 8184 в растворе криопротектора размораживали 12-20 мин.

1.2. Из криопробирки отбирают аликвоту 100 мкл суспензии клеток штамма КММ 8184 и производили посев на питательную агаризованную среду морской агар 2216 в чашки Петри.

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещают в термостат.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

1.5. Выросшие изолированные колонии бактерий КММ 8184 переносили в раствор криопротектора и ставили на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре минус 80 °С.

1.6. Бактерии КММ 8184 дают хороший рост на морском агаре 2216, поэтому посев в соответствующие жидкие среды не проводили.

1.7. Контроль чистоты культуры проводят согласно соответствующей СОП. Чистота культуры КММ 8184 подтверждена визуальным и микроскопическим контролем.

2. Контроль жизнеспособности бактерий КММ 8184 после хранения при +4-+6 °С.

2.1. Бактериальные клетки КММ 8184 отбирали из столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящегося на хранении при температуре плюс 6 °С, и пересевают на твердую питательную среду морской агар 2216 в чашки Петри.

2.2. После посева чашки Петри помещают в термостат.

2.3. Чашки выдерживали в термостате в течение 3-4 суток до появления и формирования колоний.

2.4. Выросшие на среде изолированные колонии бактерий КММ 8184 отсеивали бактериальной петлей в столбик с полужидким агаром.

2.5. В пробирки с выросшими в полужидком агаре бактериями КММ 8184 добавляют минеральное масло и ставят на хранение при температуре плюс 6 °С.

2.6. Одновременно проводят контроль чистоты культуры бактерий КММ 8184 согласно соответствующей СОП.

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 (MB 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

1.1. Криопробирку с суспензией клеток штамма КММ 8419 в растворе криопротектора размораживали 12-20 мин.

1.2. Из криопробирки с суспензией клеток штамма КММ 8419 отбирают аликвоту 100 мкл и производят посев на питательную агаризованную среду морской агар 2216 в чашки Петри.

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещают в термостат.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

1.5. Выросшие изолированные колонии бактерий КММ 8419 переносили в раствор криопротектора и ставят на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре минус 80 °С.

1.6. Бактерии КММ 8419 дают хороший рост на твердой среде морской агар 2216, поэтому посев в соответствующие жидкие среды не проводили.

1.7. Контроль чистоты культуры проводят согласно соответствующей СОП. Чистота культуры КММ 8419 подтверждена визуальным и микроскопическим контролем.

2. Контроль жизнеспособности бактерий КММ 8419 после хранения при +4-+6 °С.

2.1. Бактериальные клетки КММ 8419 отбирали из столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящегося на хранении при температуре плюс 6 °С, производится пересев на твердую питательную среду морской агар 2216 в чашки Петри.

2.2. После посева чашки Петри помещают в термостат.

2.3. Чашки выдерживали в термостате в течение 2-3 суток до появления и сформирования колоний.

2.4. Выросшие на среде изолированные колонии бактерий КММ 8419 отсевают бактериальной петлей в столбик с полужидким агаром.

2.5. В пробирки с выросшими в полужидком агаре бактериями КММ 8419 добавляют минеральное масло и ставят на хранение при температуре плюс 6 °С.

2.6. Одновременно проводили контроль чистоты культуры бактерий КММ 8419 согласно соответствующей СОП.

Всего проверено 30 штаммов грибов и бактерий.

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

3. Стандартная операционная процедура для коррекции нарушений качества хранения культур в Коллекции морских микроорганизмов

Грибные штаммы:

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

Метод коррекции нарушений качества единиц хранения коллекционных грибных культур представляет собой своевременное выявление и замену некачественных единиц хранения качественными (аутентичными) культурами, отвечающими видовым и паспортным свойствам, требованиям чистоты и жизнеспособности. Метод обеспечивает надлежащее качество поддерживаемого коллекционного фонда, гарантированное сохранение жизнеспособности и стабилизацию первоначальных свойств чистых идентифицированных детально охарактеризованных культур грибов.

1. Проверка коллекционной культуры на аутентичность в соответствии с требованиями СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда бактерий и грибов.
2. При выявлении несоответствия признаков выбранного образца коллекционной культуры видовым и паспортным свойствам, требованиям чистоты и жизнеспособности проводится повторная экспертиза идентичного образца культуры, взятого из другой криопробирки и составляется протокол об этом происшествии.
3. При выявлении несоответствия признаков повторного идентичного образца коллекционной культуры видовым и паспортным свойствам, требованиям чистоты и жизнеспособности проводится экспертиза образца данной культуры, взятого из другой партии (способа) хранения.
4. При выявлении соответствия признаков проверяемого образца культуры видовым и паспортным свойствам, требованиям чистоты и жизнеспособности данный образец закладывается на хранение, а образцы культуры, не прошедшие проверку снимаются с

хранения и в дальнейшем не используются в работе. 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 20 минут.

БАКТЕРИИ

Метод коррекции нарушений качества единиц хранения коллекционных культур представляет собой своевременное выявление и замену некачественных единиц хранения качественными (аутентичными) культурами, отвечающими видовым и паспортным свойствам, требованиям чистоты и жизнеспособности. Метод обеспечивает надлежащее качество поддерживаемого коллекционного фонда, гарантированное сохранение жизнеспособности и стабилизацию первоначальных свойств чистых идентифицированных детально охарактеризованных культур бактерий и грибов.

Проверка коллекционных 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 на аутентичность проводилась в соответствии с требованиями СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда бактерий и грибов.

Образцы коллекционных 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 соответствовали всем признакам видовых и паспортных свойств, требованиям чистоты и жизнеспособности и были заложены на хранение.

Проверка коллекционных культур бактерий *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 на аутентичность в соответствии с требованиями СОП не выявила несоответствия признаков указанных штаммов бактерий видовым и паспортным свойствам, требованиям чистоты и жизнеспособности, поэтому Стандартная операционная процедура для коррекции нарушений качества хранения культур не проводилась для данных штаммов.

Проверка коллекционных культур бактерий *Cohaesibacter* sp. КММ 8009, *Roseobacter* sp. КММ 8017, *Formosa* sp. КММ 8021, *Winogradskyella* sp. КММ 8184, *Vibrio* sp. КММ 8419 на аутентичность в соответствии с требованиями СОП не выявила несоответствия признаков указанных штаммов бактерий видовым и паспортным свойствам, требованиям чистоты и жизнеспособности.

Проверка коллекционных культур бактерий *Pseudoalteromonas neustonica* КММ 7501, *Marinomonas arenicola* КММ 7506, *Pseudomonas zhaodongensis* КММ 7507, *Marinomonas arenicola* КММ 7509, *Pseudoalteromonas distincta* КММ 7504 на аутентичность в соответствии с требованиями СОП не выявила несоответствия признаков указанных штаммов бактерий видовым и паспортным свойствам, требованиям чистоты и жизнеспособности.

Всего проверено 30 штаммов грибов и бактерий.

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

4. Стандартная операционная процедура по выделению новых штаммов грибов в Коллекции морских микроорганизмов

Грибные штаммы:

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

Выделение новых штаммов грибов в «Коллекции морских микроорганизмов» осуществляется следующим образом.

Выделение чистой культуры микроорганизмов состоит из ряда последовательных процедур: Рассев (из разведений или нет) посевного материала методом Коха, преимущественно на сусло-агаровую среду (иногда другие среды) в чашках Петри, с добавлением антибиотиков в стерильные среды после автоклавирования. Из расчета 500 000 ед. пенициллина и 0,5/1 грамм стрептомицина на 1 литр среды. Если используются образцы растений и животных, их кусочки раскладываются равномерно на поверхности чашки со средой.

Выделение культуры из выросших колоний.

Определение чистоты выделенного штамма.

Выделение чистой культуры.

Выделение чистой культуры проводится из отдельной колонии (иногда из отдельной клетки).

Метод выделения чистой культуры из отдельной колонии применим для аэробных и микроаэрофильных и, иногда, для факультативно-анаэробных микроорганизмов, которые растут на плотных средах.

На поверхность застывшей среды в каждую чашку наносят 1-3 капли посевного материала (или его разведения) и распределяют их по поверхности плотной среды в чашке Петри

шпателем Дригальского. Далее (или в том числе) этим же шпателем протирают поверхность среды последовательно по второй, третьей и четвертой чашках (иногда и пятой чашки Петри). Иногда используется метод титрования суспензии посевного материала. После посева чашки Петри помещают в термостат (обычно при 28°C) или оставляют при комнатной температуре в условиях бокса. Чашки выдерживают в термостате или при комнатной температуре в течение 3-7 дней в зависимости от скорости роста микроорганизмов. Выросшие изолированные колонии отсевают микологическим крючком на поверхность скошенной плотной среды (преимущественно сусло-агар) в пробирке или на поверхность агаризованной среды в чашке Петри.

Определение чистоты выделенной культуры осуществляется несколькими способами: визуальным, микроскопическим контролем и высевом на ряд питательных сред и, иногда, молекулярно-биологическими методами.

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 20 минут.

Выделение культур осуществляется с использованием соответствующего оборудования и материалов: боксированное помещение, автоклавы, термостат, лабораторная посуда и питательные среды.

Бактерии

Выделение чистой культуры микроорганизмов состоит из ряда последовательных процедур: Рассев (из разведений или нет) посевного материала методом Коха на агаризованную среду МА 2216 (иногда другие среды) в чашках Петри.

Выделение культуры из выросших колоний.

Определение чистоты выделенного штамма.

Выделение чистой культуры.

Выделение чистых культур проводили из гомогенатов талломов зелёных водорослей *Ulva fenestrata* (штаммы *Algibacter pectinovorans* KMM 6376, *Polaribacter reichenbachii* KMM 6386^T, *Winogradskyella ulvae* KMM 6390^T, *Polaribacter* sp. KMM 6412, *Sphingobacterium* sp. KMM 6449 и *Nonlabens arenilitoris* KMM 6452) и *Cladophora stimpsonii* (штамм *Nonlabens*

arenitoris КММ 6497) собранных в прибрежной зоне б. Троицы зал. Петра Великого Японского моря Тихого океана,

Метод выделения чистых культур из отдельной колонии применим для аэробных и микроаэрофильных и, иногда, для факультативно-анаэробных микроорганизмов, которые растут на плотных средах.

На поверхность застывшей среды нанесли каплю посевного материала и распределили её по поверхности плотной среды в чашке Петри шпателем Дригальского. Далее этим же шпателем протёрли поверхность среды последовательно по второй, третьей и четвертой чашках. После посева чашки Петри поместили в термостат при 28 °С. Чашки выдерживали в термостате в течение 7 суток. Выросшие изолированные колонии отсеяли петлей на поверхность агаризованной среды в чашки Петри штрихом.

Определение чистоты выделенных культур осуществляли несколькими способами: визуальным, микроскопическим контролем и высевом на ряд питательных сред.

Выделение культур осуществляли с использованием соответствующего оборудования (ламинарные боксы, автоклавы, термостаты и др.).

Штамм бактерии *Marinicella litoralis* КММ 3900^T

Штамм бактерии *Marinicella litoralis* КММ 3900^T был выделен 10.06.2008 г. из образца грунта, собранного в прибрежной зоне Залива Петра Великого Японского моря на глубине 2 м. Штамм КММ 3900^T выделен методом прямого посева 50 мкл суспензии гомогенизированного грунта (1 см³) с добавлением морской воды на среду Морской агар 2216 (МА 2216 BD Difco) в 4-х чашках Петри с использованием шпателя Дригальского. Инокулированные чашки Петри инкубировали в термостате при 28 °С в течении 10 дней. Штамм КММ 3900^T получен путем посева отдельной колонии, выбранной из выросших колоний на 3-ей чашке Петри на среде Морской агар 2216. Чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и посевом на агаризованной среде МА 2216.

Штамм бактерии *Loktanella maritima* КММ 9530^T

Штамм бактерии *Loktanella maritima* КММ 9530^T был выделен 10.10.2012 г. из образца грунта, собранного в прибрежной зоне Залива Петра Великого Японского моря на глубине 0,5 м. Штамм КММ 9530^T выделен методом прямого посева 30 мкл суспензии гомогенизированного грунта (1 см³) с добавлением морской воды на среду Морской агар

2216 (MA 2216 BD Difco) в 4-х чашках Петри с помощью шпателя Дригальского. Инокулированные чашки Петри инкубировали в термостате при 28 °С в течении 5 дней. Штамм КММ 9530^T получен путем посева отдельной колонии, и чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и рассевом на агаризованной среде MA 2216.

Штамм бактерии *Pseudoalteromonas agarivorans* КММ 255^T

Штамм бактерии *Pseudoalteromonas agarivorans* КММ 255^T был выделен 10.2.1988 г. из образца колониальной асцидии *Polysyncraton* sp., отобранного в Тихом Океане. Штамм КММ 255^T выделен методом посева 50 мкл гомогената асцидии с добавлением морской воды на агаризованную среду (SWM) следующего состава, (г/л): пептон - 5.0; дрожжевой экстракт - 2.5; глюкоза - 1.0; K₂HPO₄ - 0.2; MgSO₄ - 0.05; 250 мл дистиллированной воды, 750 мл морской воды; агар - 15.0. в 5-х чашках Петри с помощью шпателя Дригальского. Инокулированные чашки Петри инкубировали в термостате при 25 °С в течении 5 дней. Штамм КММ 255^T получен путем посева отдельной колонии, выбранной из выросших колоний на 3-ей чашке Петри на среде SWM. Чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и рассевом на агаризованной среде MA 2216 и среде SWM.

Штамм бактерии *Pseudomonas glareae* КММ 9500^T

Штамм бактерии *Pseudomonas glareae* КММ 9500^T был выделен 10.10.2012 г. из образца грунта, собранного в прибрежной зоне залива Петра Великого Японского моря на глубине 0,5 м. Штамм КММ 9500^T выделен методом прямого посева 100 мкл суспензии гомогенизированного грунта (1 см³) с добавлением морской воды на агаризованную среду R2A (R2A Agar BD Difco) в 4-х чашках Петри с помощью шпателя Дригальского. Инокулированные чашки Петри инкубировали в термостате при 28 °С в течении 7 дней. Штамм КММ 9500^T получен путем посева отдельной колонии, выбранной из выросших колоний на 2-ой чашке Петри и чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и рассевом на ряд питательных агаризованных сред, R2A Агар (BD Difco), Морской Агар 2216 (BD Difco), Триптиказо-соевый агар (BD Difco), глюкозо-пептонную среду следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт - 2,5; NaCl - 5,0; глюкоза - 1,0; K₂HPO₄ - 0,2; MgSO₄ - 0,05; 1000 мл дистиллированной воды, агар -15,0.

Штамм бактерии *Sphingomonas molluscorum* КММ 3882^T

Штамм бактерии *Sphingomonas molluscorum* КММ 3882^T был выделен из двустворчатого моллюска *Anadara broughtoni*, отобранного в прибрежной зоне залива Петра Великого Японского моря в 6.06.2003 г. Штамм КММ 3882^T выделен методом прямого посева 50 мкл межтканевой жидкости моллюска с добавлением морской воды на агаризованную среду следующего состава, (г/л): пептон - 5.0; дрожжевой экстракт - 2.5; глюкоза - 1.0; K₂HPO₄ - 0.2; MgSO₄ - 0.05; 250 мл дистиллированной воды, 750 мл морской воды; агар - 15.0 в 4-х чашках Петри с использованием шпателя Дригальского. Инокулированные чашки Петри инкубировали в термостате при 28 °С в течение 7 дней. Штамм КММ 3882^T получен путем посева отдельной колонии отдельной колонии, выбранной из выросших колоний на 2-ой чашке Петри. Чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и посевом на ряд питательных агаризованных сред: Триптиказо-соевый агар (BD Difco), R2A Агар (BD Difco), Морской Агар 2216 (BD Difco), глюкозо-пептонная среда с использованием морской воды.

Штамм бактерии *Cohaesibacter* sp. КММ 8009 был выделен в 2008 г. из бурой водоросли *Fucus evanescens*, собранной в бухте Кратерная на острове Янкича, Курильские острова, Россия, в ходе экспедиционного рейса № 38 на НИС «Академик Опарин» в августе 2008 года. Кусок таллома водоросли размером 2x2 см поместили в колбы с жидкой, стерильной питательной средой (100 мл), следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт - 1; глюкоза - 1,0; K₂HPO₄ - 0,2; MgSO₄ - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, pH 7,8. Колбы выдерживали при комнатной температуре в течение 2 месяцев, периодически перемешивая. Через 2 месяца по 100 мкл раствора наносили на поверхность застывшей среды (морской агар 2216) и распределяли по поверхности плотной среды в чашке Петри шпателем Дригальского. Далее этим же шпателем протирали поверхность среды последовательно по второй и третьей чашкам. После посева чашки Петри помещали в термостат (обычно при 28 °С). Чашки выдерживали в термостате в течение 3-7 суток. Выросшие изолированные колонии отсеивали петлей на поверхность агаризованной среды в чашке Петри штрихом. Определение чистоты выделенной культуры осуществляли согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Roseobacter* sp. КММ 8017 был выделен в 2008 г. из бурой водоросли *Fucus evanescens*, собранной в бухте Кратерная на острове Янкича, Курильские острова, Россия, в ходе экспедиционного рейса № 38 на НИС «Академик Опарин» в августе 2008 года. Кусок таллома водоросли размером 2x2 см поместили в колбы с жидкой, стерильной питательной средой (100 мл), следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт - 1; глюкоза -

1,0; K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4$ - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, рН 7,8. Колбы выдерживали при комнатной температуре в течение 2 месяцев, периодически перемешивая. Через 2 месяца по 100 мкл раствора наносили на поверхность застывшей среды (морской агар 2216) и распределяли по поверхности плотной среды в чашке Петри шпателем Дригальского. Далее этим же шпателем протирали поверхность среды последовательно по второй и третьей чашках. После посева чашки Петри помещали в термостат (обычно при 28 °С). Чашки выдерживали в термостате в течение 3-7 суток. Выросшие изолированные колонии отсевали петлей на поверхность агаризованной среды в чашке Петри штрихом. Определение чистоты выделенной культуры осуществляли согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Formosa* sp. КММ 8021 был выделен в 2008 г. из бурой водоросли *Fucus evanescens*, собранной в бухте Кратерная на острове Янкича, Курильские острова, Россия, в ходе экспедиционного рейса № 38 на НИС «Академик Опарин» в августе 2008 года. Кусок таллома водоросли размером 2x2 см поместили в колбы со стерильной морской водой. Колбы выдерживали при комнатной температуре в течение 2 месяцев, периодически перемешивая. Через 2 месяца по 100 мкл раствора наносили на поверхность застывшей среды (морской агар 2216) и распределяли по поверхности плотной среды в чашке Петри шпателем Дригальского. Далее этим же шпателем протирали поверхность среды последовательно по второй и третьей чашках. После посева чашки Петри помещали в термостат (обычно при 28 °С). Чашки выдерживали в термостате в течение 3-7 суток. Выросшие изолированные колонии отсевали петлей на поверхность агаризованной среды в чашке Петри штрихом. Определение чистоты выделенной культуры осуществляли согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Winogradskyella* sp. КММ 8184 был выделен в 2008 г. из бурой водоросли *Laminaria saccharina*, собранной в бухте Кратерная на острове Янкича, Курильские острова, Россия, в ходе экспедиционного рейса № 38 на НИС «Академик Опарин» в августе 2008 года. Кусок таллома водоросли размером 1x1 см гомогенизировали в 3 мл стерильной морской воды. По 100 мкл гомогената наносили на поверхность застывшей среды (морской агар 2216) и распределяли по поверхности плотной среды в чашке Петри шпателем Дригальского. Далее этим же шпателем протирали поверхность среды последовательно по второй и третьей чашках. После посева чашки Петри помещали в термостат (обычно при 28 °С). Чашки выдерживали в термостате в течение 3-7 суток. Выросшие изолированные колонии отсевали петлей на поверхность агаризованной среды в чашке Петри штрихом. Определение чистоты выделенной культуры осуществляли согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Vibrio* sp. КММ 8419 был выделен в 2016 г. из биолюминесцентной полихеты *Chaetopterus variopedatus*, собранной в бухте Троица залива Петра Великого с помощью водолазной техники. Кусок ловчей сети полихеты около 1 г гомогенизировали в 5 мл стерильной морской воды. По 100 мкл гомогената наносили на поверхность застывшей среды (75% (v/v) морская вода и 25% (v/v) дистиллированная вода, pH 8.5: 0.12 мМ CaCl₂, 0.15 мМ MgSO₄•7H₂O, 0.09 мМ K₂HPO₄•3H₂O, 8.8 мМ NaNO₃, 0.19 мМ Na₂CO₃, 0.0013 мМ EDTA, 0.014 мМ лимонной кислоты, 0.015 мМ цитрат FeNH₄, 1% агар) и распределяли по поверхности плотной среды в чашке Петри шпателем Дригальского. Далее этим же шпателем протирали поверхность среды последовательно по второй и третьей чашкам. После посева чашки Петри помещали в термостат (обычно при 28 °С). Чашки выдерживали в термостате в течение 3-7 суток. Выросшие изолированные колонии отсеивали петлей на поверхность агаризованной среды в чашке Петри штрихом. Определение чистоты выделенной культуры осуществляли согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Pseudoalteromonas neustonica* КММ 7501. был выделен из морской воды залива Восток (Приморский край, Японское море) зимой 2015 г. с целью выявления нефтеокисляющих микроорганизмов. Пробы воды из поверхностного слоя воды в количестве 0,5 мл внесли в несколько пробирок, содержащих по 4,5 мл стерильной минеральной среды следующего состава (г/л): (NH₄)₂SO₄ - 1,0; K₂HPO₄ - 1,0; KH₂PO₄ - 1,0; MgSO₄ - 0,2; CaCl₂ - 0,02; NaCl - 20,0; FeCl₃ - 0,03 мл насыщенного раствора; 0,02 мл стерильной нефти; 1000 мл дистиллированной воды, pH 7,8. Пробирки встряхивали на качалке (200 об/мин) при комнатной температуре в течение 7 суток. Затем из пробирок с деградированной нефтью сделали высев по 0,1 мл микробного бульона на агаровую среду того же состава и распределяли суспензию по агаризованной поверхности чашек Петри шпателем Дригальского, растирая последовательно поверхность второй и третьей чашки. Все чашки выдерживали в термостате при 28 °С в течение 3-5 суток. Выросшие изолированные колонии отсеивали петлей штрихом на поверхность агаризованной среды в чашке Петри следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт - 1,0; глюкоза - 1,0; K₂HPO₄ - 0,2; MgSO₄ - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, pH 7,8. Штамм КММ 7501 получен путем рассева отдельной колонии. Определение чистоты выделенной культуры осуществляли согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Marinomonas arenicola* КММ 7506₂ был выделен из морской воды залива Восток (Приморский край, Японское море) зимой 2015 г. с целью выявления нефтеокисляющих микроорганизмов. Пробы воды из придонного слоя на глубине 15 см в количестве 0,5 мл внесли в несколько пробирок, содержащих по 4,5 мл стерильной минеральной среды следующего состава (г/л): (NH₄)₂SO₄ - 1,0; K₂HPO₄ - 1,0; KH₂PO₄ - 1,0;

MgSO₄ - 0,2; CaCl₂ – 0,02; NaCl – 20,0; FeCl₃ - 0,03 мл насыщенного раствора; 0,02 мл стерильной нефти; 1000 мл дистиллированной воды, pH 7,8. Пробирки встряхивали на качалке (200 об/мин) при комнатной температуре в течение 7 суток. Затем из пробирок с деградированной нефтью делали отсев по 0,1 мл микробного бульона на агаровую среду того же состава и распределяли суспензию по агаризованной поверхности чашек Петри шпателем Дригальского, растирая последовательно поверхность второй и третьей чашки. Все чашки выдерживали в термостате при 28 °С в течение 3-5 суток. Выросшие изолированные колонии отсевали петлей штрихом на поверхность агаризованной среды в чашке Петри следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0; глюкоза - 1,0; K₂HPO₄ – 0,2; MgSO₄ - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, pH 7,8. Штамм КММ 7506 получен путем рассева отдельной колонии. Определение чистоты выделенной культуры осуществляли согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Pseudomonas zhaodongensis* КММ 7507. был выделен из морской воды и грунта залива Восток (Приморский край, Японское море) зимой 2015 г. с целью выявления нефтеокисляющих микроорганизмов. Пробы воды, смешанные с грунтом на глубине 10 см, в количестве 0,5 мл внесли в несколько пробирок, содержащих по 4,5 мл стерильной минеральной среды следующего состава (г/л): KNO₃ - 1,0; K₂HPO₄ – 1,0; KH₂PO₄ – 1,0; MgSO₄ - 0,2; CaCl₂ – 0,02; NaCl – 20,0; FeCl₃ - 0,03 мл насыщенного раствора; 0,02 мл стерильной нефти; 1000 мл дистиллированной воды, pH 7,8. Пробирки встряхивали на качалке (200 об/мин) при комнатной температуре в течение 7 суток. Затем из пробирок с деградированной нефтью делали отсев по 0,1 мл микробного бульона на агаровую среду того же состава и распределяли суспензию по агаризованной поверхности чашек Петри шпателем Дригальского, растирая последовательно поверхность второй и третьей чашки. Все чашки выдерживали в термостате при 28 °С в течение 3-5 суток. Выросшие изолированные колонии отсевали петлей штрихом на поверхность агаризованной среды в чашке Петри следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0; глюкоза - 1,0; K₂HPO₄ – 0,2; MgSO₄ - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, pH 7,8. Штамм КММ 7507 получен путем рассева отдельной колонии. Определение чистоты выделенной культуры осуществляли согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Marinomonas arenicola* КММ 7509. был выделен из морской воды и грунта залива Восток (Приморский край, Японское море) зимой 2015 г. с целью получения штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов. Пробы воды, смешанные с грунтом на глубине 30 см, в количестве 0,5 мл внесли в несколько пробирок, содержащих по 4,5 мл стерильной минеральной среды следующего состава (г/л): KNO₃ - 1,0; K₂HPO₄ – 1,0; KH₂PO₄ – 1,0; MgSO₄ - 0,2; CaCl₂ – 0,02; NaCl – 20,0; FeCl₃ - 0,03мл насыщенного раствора; 0,02 мл

стерильной нефти; 1000 мл дистиллированной воды, рН 7,8. Пробирки встряхивали на качалке (200 об/мин) при комнатной температуре в течение 7 суток. Затем из пробирок с деградированной нефтью делали отсев по 0,1 мл микробного бульона на агаровую среду того же состава и распределяли суспензию по агаризованной поверхности чашек Петри шпателем Дригальского, растирая последовательно поверхность второй и третьей чашки. Все чашки выдерживали в термостате при 28 °С в течение 3-5 суток. Выросшие изолированные колонии отсевали петлей штрихом на поверхность агаризованной среды в чашке Петри следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0; глюкоза - 1,0; K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4$ - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, рН 7,8. Штамм КММ 7509 получен путем рассева отдельной колонии. Определение чистоты выделенной культуры осуществляли согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Pseudoalteromonas distincta* КММ 7504 был изолирован из морской воды бухты Попова (Приморский край, Японское море) зимой 2015 г. с целью получения нефтеокисляющих микроорганизмов. Пробы воды, взятые с поверхности, в количестве 0,5 мл внесли в несколько пробирок, содержащих по 4,5 мл стерильной минеральной среды следующего состава (г/л): KNO_3 - 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4$ - 0,2; $CaCl_2$ – 0,02; $NaCl$ – 20,0; $FeCl_3$ - 0,03 мл насыщенного раствора; 0,02 мл стерильной нефти; 1000 мл дистиллированной воды, рН 7,8. Пробирки встряхивали на качалке (200 об/мин) при комнатной температуре в течение 7 суток. Затем из пробирок с деградированной нефтью сделали высев по 0,1 мл микробного бульона на агаровую среду того же состава и распределяли суспензию по агаризованной поверхности чашек Петри шпателем Дригальского, растирая последовательно поверхность второй и третьей чашки. Все чашки выдерживали в термостате при 28 °С в течение 3-5 суток. Выросшие изолированные колонии отсевали петлей штрихом на поверхность агаризованной среды в чашке Петри следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0; глюкоза - 1,0; K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4$ - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, рН 7,8. Штамм КММ 7504 получен путем рассева отдельной колонии. Определение чистоты выделенной культуры осуществляли согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Pseudoalteromonas distincta* КММ 7504

Штамм бактерии *Pseudoalteromonas distincta* КММ 7504 был изолирован из морской воды бухты Попова (Приморский край, Японское море) зимой 2015 г. с целью получения нефтеокисляющих микроорганизмов. Пробы воды, взятые с поверхности, в количестве 0,5 мл внесли в несколько пробирок, содержащих по 4,5 мл стерильной минеральной среды следующего состава (г/л): KNO_3 - 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4$ - 0,2; $CaCl_2$ – 0,02;

NaCl – 20,0; FeCl₃ - 0,03мл насыщенного раствора; 0,02 мл стерильной нефти; 1000 мл дистиллированной воды, рН 7,8. Пробирки встряхивали на качалке (200 об/мин) при комнатной температуре в течение 7 суток. Затем из пробирок с деградированной нефтью сделали высев по 0,1 мл микробного бульона на агаровую среду того же состава и распределяли суспензию по агаризованной поверхности чашек Петри шпателем Дригальского. Выросшие изолированные колонии отсеивали петлей на поверхность агаризованной среды в чашке Петри следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0; глюкоза - 1,0; K₂HPO₄ – 0,2; MgSO₄ - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, рН 7,8. Штамм КММ 7504 получен путем посева отдельной колонии. Определение чистоты выделенной культуры осуществляли согласно соответствующей СОП.

Макроморфологические признаки

Штамм бактерии *Pseudoalteromonas distincta* КММ 7504 растет на морском агаре 2216 и в морском бульоне 2216 (BD). На морском агаре 2216 бактерии штамма КММ 7504 образует круглые, желтовато-кремовые, выпуклые, блестящие, гладкие колонии с ровным краем, однородной структуры, мягкой консистенции, 3-5 мм в диаметре. Рост бактерий в жидких питательных средах проявляется в виде однородного помутнения.

Микроморфологические признаки

Штамм *Pseudoalteromonas distincta* КММ 7504 представляет собой грамотрицательные, оксидазоположительные, каталазоположительные, подвижные с полярным жгутикованием палочки 0,5-0,8 мкм в диаметре и 1,5-2,0 мкм в длину.

Физиолого-биохимические свойства

Бактерии *Pseudoalteromonas distincta* КММ 7504 - аэробные микроорганизмы, которые растут при содержании хлористого натрия в среде 0-5%. Температурный интервал роста определен между 4 и 30 °С (оптимум 28 °С). Оптимум рН 6,5-7,5. Штамм КММ 7504 не гидролизует желатин, казеин, крахмал. Не утилизирует глюкозу, фруктозу, мальтозу. лактозу, галактозу, мелибиозу, ксилозу, маннозу, арабинозу, трегалозу, инозит. Окисляет нефть и нефтепродукты

Штамм КММ 7504 проявляет чувствительность к антибиотикам гентамицину (10 мкг/диск), канамицину (30 мкг/диск), неомицину (30 мкг/диск), олеандомицину (15 мкг/диск), офлоксацину (5 мкг/диск), стрептомицину, (30 мкг/диск), тетрациклину (30

мкг/диск), полимиксину (300 ЕД) и устойчив к ампициллину (10 мкг), бензилпенициллину (10 ЕД), линкомицину (15 мкг), эритромиину (15 мкг).

Молекулярно-генетические характеристики

Экстракцию геномной ДНК, амплификацию 16S рибосомного РНК гена посредством ПЦР-обработки и секвенирование ПЦР продуктов проводили согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Полученная нуклеотидная последовательность 16S рРНК гена штамма бактерии КММ 7504 и сравнение с известными последовательностями в базах данных позволила отнести данный штамм к виду *Pseudoalteromonas distincta*

Сиквенс шт. *Pseudoalteromonas distincta* КММ 7504

```
СТАСАСАТGCaAGTCGAGCGGTAACAGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCTGACGAGCG
GCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAACAGTTGG
AAACGACTGСТААТАССGCАТААТGTCTACGGACCAAGGGGGCTTCGGCTCTCGC
STTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC
GACGATCCCTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG
ATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTC
AGGAGGAAAGGTTAGTAGTTAATACCTGCTARCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAG
CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCC
CCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAACTGGCAAACCTAGAGTGTGATAGAGGG
TGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATG
GCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGGAGC
AAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTAGAAGCTC
GGAGCCTCGGTTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACSTTACCTACACTTGACATACAGAG
AACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGATACAGGTGCTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCC
TATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAАCTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGCGCАТАCAGAGTGCTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCGAAT
CACTTAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCG
GAATCGCTAGTAATCGCGTATCAGAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCCGTCAACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCC
CTCGGGAGGACGTtACCACGGA
```

Штамм бактерии. КММ 7504 депонирован в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2016 г. Суспензия клеток штамма КММ 7504 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, ВD) в 30% растворе глицерина при температуре -80-85 °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 в Коллекции морских

микроорганизмов осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам.

Штамм бактерии *Marinomonas arenicola* КММ 7506

Штамм бактерии *Marinomonas arenicola* КММ 7506 был выделен из морской воды залива Восток (Приморский край, Японское море) зимой 2015 г. с целью получения нефтеокисляющих микроорганизмов. Пробы воды из придонного слоя на глубине 15 см в количестве 0,5 мл внесли в несколько пробирок, содержащих по 4,5 мл стерильной минеральной среды следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; MgSO_4 - 0,2; CaCl_2 – 0,02; NaCl – 20,0; FeCl_3 - 0,03 мл насыщенного раствора; 0,02 мл стерильной нефти; 1000 мл дистиллированной воды, pH 7,8. Пробирки встряхивали на качалке (200 об/мин) при комнатной температуре в течение 7 суток. Затем из пробирок с деградированной нефтью делали высев по 0,1 мл микробного бульона на агаровую среду того же состава и распределяли суспензию по агаризованной поверхности чашек Петри шпателем Дригальского. Выросшие изолированные колонии отсеивали петлей на поверхность агаризованной среды в чашке Петри следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0; глюкоза - 1,0; K_2HPO_4 – 0,2; MgSO_4 - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, pH 7,8. Штамм КММ 7506 получен путем посева отдельной колонии. Чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и посевом на агаризованной среде морской агар 2216.

Макроморфологические признаки

Штамм бактерии *Marinomonas arenicola* КММ 7506_растет на морском агаре 2216 и в морском бульоне 2216 (BD). На морском агаре 2216 бактерии штамма КММ 7506 образуют круглые, непигментированные, выпуклые, полупрозрачные, блестящие, гладкие колонии с ровным краем, однородной структуры, мягкой консистенции, 2-3 мм в диаметре. Рост бактерий в жидких питательных средах проявляется в виде однородного помутнения.

Микроморфологические признаки

Штамм *Marinomonas arenicola* КММ 7506 представляет собой грамотрицательные, подвижные палочки 0,5-0,8 мкм в диаметре и 1,5-2,0 мкм в длину.

Физиолого-биохимические свойства

Бактерии *Marinomonas arenicola* КММ 7506 - аэробные микроорганизмы, которые растут

при содержании хлористого натрия в среде 0,5-8 %С. Температурный интервал роста определен между 4 - 37 °С (оптимум 28 °С). Оптимум рН 6,5-7,5. Штамм КММ 7506 оксидазоотрицательный, каталазоположительный, не гидролизует, казеин желатин, крахмал, твин 80. Не утилизирует глюкозу, фруктозу, мальтозу, галактозу, лактозу, ксилозу, сахарозу, мелибиозу, арабинозу, трегалозу, маннозу, маннит, глицерин. Окисляет нефть и нефтепродукты

Штамм КММ 7506 проявляет чувствительность к антибиотикам гентамицину (10 мкг/диск), канамицину (30 мкг/диск), неомицину (30 мкг/диск), олеандомицину (15 мкг/диск), офлоксацину (5 мкг/диск), стрептомицину (30 мкг/диск), карбенициллину (100 мкг/диск), тетрациклину (30 мкг/диск) и эритромицину (15 мкг/диск) и устойчив к следующим антибиотикам: бензилпенициллину (10 ЕД/диск), ванкомицину (30 мкг/диск), налидиксовой кислоте (30 мкг/диск), оксациллину (10 мкг/диск), полимиксину (300 ЕД/диск).

Молекулярно-генетические характеристики

Экстракцию геномной ДНК, амплификацию 16S рибосомного РНК гена посредством ПЦР-обработки и секвенирование ПЦР продуктов проводили согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Полученная нуклеотидная последовательность 16S рРНК гена штамма бактерии КММ 7506 и сравнение с известными последовательностями в базах данных позволила отнести данный штамм к виду *Marinomonas arenicola*.

Сиквенс шт. *Marinomonas arenicola* КММ 7506

```
GCGGCTACCATGCAaGTCGAGCGGAACGATGATAGCTTGCTATCAGGCGTCGAGC
GGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGACAACATGT
GAAACGCATGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGGAGGGGATCTTCG
GACCTTTCGCTATTAGATGAGCCTGCGTAAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGG
CCTACCAAGGCGACGATCTTTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGTCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT
GGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTA
AAGCACTTTCAGGGGTGAGGAAGGGTGATAGCTTAATACGTTATCATCTTGACGT
TAGCCCCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGA
GGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTT
AAGTCGGATGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGAATGGCACCCGATACTGGCAG
GCTAGAGTATGGTAGAGGGGTGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
TATAGGAAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGACACCCTGGACTAATACTGACACTG
AGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGTTGTAATGACTTAGTGGCGCAGCTAACGCA
ATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGA
CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGA
ACSTTACCTACTCTTGACATCCAGTGAATTTAGCAGAGATGCTTTAGTGCCTTCGG
GAACACTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGG
GTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTATCCTTATTTGCCAGCACTTCGGGTGGG
AACTTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAG
```

TCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAGAG
GGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCACAAAGTACGTTCGTAGTCCGGATT
GGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAA
TGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA
GTTGATTGCTCCAGAAGTAGCTAGCTTAACCTTtCGGGGATGGCGGTACCTCGGAG
TTC

Штамм бактерии. КММ 7506 депонирован в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2016 г. Суспензия клеток штамма КММ 7506 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, ВД) в 30% растворе глицерина при температуре -80-85 °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 в Коллекции морских микроорганизмов осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам.

Штамм бактерии *Marinomonas arenicola* КММ 7509

Штамм бактерии *Marinomonas arenicola* КММ 7509 был выделен из морской воды залива Восток (Приморский край, Японское море) зимой 2015 г. с целью получения нефтеокисляющих микроорганизмов. Пробы воды, смешанные с грунтом на глубине 30 см, в количестве 0,5 мл внесли в несколько пробирок, содержащих по 4,5 мл стерильной минеральной среды следующего состава (г/л): KNO₃ - 1,0; K₂HPO₄ - 1,0; KH₂PO₄ - 1,0; MgSO₄ - 0,2; CaCl₂ - 0,02; NaCl - 20,0; FeCl₃ - 0,03 мл насыщенного раствора; 0,02 мл стерильной нефти; 1000 мл дистиллированной воды, pH 7,8. Пробирки встряхивали на качалке (200 об/мин) при комнатной температуре в течение 7 суток. Затем из пробирок с деградированной нефтью делали высев по 0,1 мл микробного бульона на агаровую среду того же состава и распределяли суспензию по агаризованной поверхности чашек Петри шпателем Дригальского. Выросшие изолированные колонии отсеивали петлей на поверхность агаризованной среды в чашке Петри следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт - 1,0; глюкоза - 1,0; K₂HPO₄ - 0,2; MgSO₄ - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, pH 7,8. Штамм КММ 7509 получен путем посева отдельной колонии. Чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и посевом на агаризованной среде морской агар 2216.

Макроморфологические признаки

Штамм бактерии *Marinomonas arenicola* КММ 7509 растет на морском агаре 2216 и в морском бульоне 2216 (BD). На морском агаре 2216 бактерии штамма КММ 7509 образуют круглые, непигментированные, выпуклые, полупрозрачные, блестящие, гладкие колонии с ровным краем, однородной структуры, мягкой консистенции, 2-3 мм в диаметре. Рост бактерий в жидких питательных средах проявляется в виде однородного помутнения.

Микроморфологические признаки

Штамм *Marinomonas arenicola* КММ 7509 представляет собой грамотрицательные, подвижные палочки 0,5-0,8 мкм в диаметре и 1,5-2,0 мкм в длину.

Физиолого-биохимические свойства

Бактерии *Marinomonas arenicola* КММ 7509 - аэробные микроорганизмы, растут при содержании хлористого натрия в среде 0,5-8,0 %С. Температурный интервал роста определен между 4 - 30 °С (оптимум 28 °С). Оптимум рН 6,5-7,5. Штамм КММ 7509 оксидазоотрицательный, каталазоположительный, не гидролизует, казеин желатин, крахмал, твин 80. Утилизирует мальтозу, мелибиозу, арабинозу, маннит. Не утилизирует глюкозу, фруктозу, галактозу, лактозу, ксилозу, сахарозу, глицерин. Окисляет нефть и нефтепродукты.

Штамм КММ 7509 проявляет чувствительность к антибиотикам гентамицину (10 мкг/диск), канамицину (30 мкг/диск), неомицину (30 мкг/диск), олеандомицину (15 мкг/диск), офлоксацину (5 мкг/диск), стрептомицину (30 мкг/диск), карбенициллину (100 мкг/диск), тетрациклину (30 мкг/диск), бензилпенициллину (10 ЕД/диск), налидиксовой кислоте (30 мкг/диск), эритромицину (15 мкг/диск) и устойчив к следующим антибиотикам: оксациллину (10 мкг/диск), полимиксину (300 ЕД/диск).

Молекулярно-генетические характеристики

Экстракцию геномной ДНК, амплификацию 16S рибосомного РНК гена посредством ПЦР-обработки и секвенирование ПЦР продуктов проводили согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Полученная нуклеотидная последовательность 16S рРНК гена штамма бактерии КММ 7506 и сравнение с известными последовательностями в базах данных позволила отнести данный штамм к виду *Marinomonas arenicola*.

Сиквенс шт. *Marinomonas arenicola* КММ 7509

GgCTACCATGCAaGTCGAGCGGAACGATGATAGCTTGCTATCAGGCGTCGAGCGGC
GGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGACAACATGTGGAA

ACGCATGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGGAGGGGATCTTCGGACCTT
TCGCTATTAGATGAGCCTGCGTAAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCA
AGGCGACGATCTTTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGTCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAG
CCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTC
AGGGGTGAGGAAGGGTGATAGCTTAATACGTTATCATCTTGACGTTAGCCCCAGAA
GAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGGTGGTTTTGTTAAGTCCGGATGTGAA
ATCCCAGGGCTCAACCTTGGGAATGGCACCCGATACTGGCAGGCTAGAGTATGGTAG
AGGGGTGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACATC
AGTGGCGAAGGCGACACCCTGGACTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGCC
GTTGGGTTGTAATGACTTAGTGGCGCAGCTAACGCAATAAGTAGACCGCCTGGGGA
GTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCA
GTGAATTTAGCAGAGATGCTTTAGTGCCTTCGGGAACACTGAGACAGGTGCTGCAT
GGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAAC
CCTTATCCTTATTTGCCAGCACTTCGGGTGGGAACTTTAAGGAGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGCGTATACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGA
ATCCCACAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGT
CGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGATTGCTCCAGAAGTAGCTAGCTTAA
CCTTtCGGGgATGGCGGTACcTC

Штамм бактерии. КММ 7509 депонирован в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2016 г. Суспензия клеток штамма КММ 7509 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, ВД) в 30% растворе глицерина при температуре -80-85 °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 в Коллекции морских микроорганизмов осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам.

Верифицированы 30 штаммов грибов и бактерий.

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

5. Стандартная операционная процедура по идентификации штаммов бактерий и грибов по морфологическим, физиологическим и молекулярно-генетическим характеристикам в Коллекции морских микроорганизмов

Верификация на 10 штаммах

Грибы

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

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 раствор глицерин:вода:этатол в равных частях, 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

Морфологические признаки изучали методом микроскопирования. Цвет колоний, конидий и мицелия определяли согласно шкале А.С. Бондарцева [6]. Определение грибов проводили по стандартным ключам и определителям [7-27] и другим оригинальным авторским статьям.

Фамилии авторов таксонов грибов приведены по П. Кирку и А. Анселлу <http://www.cambridge.org/>.

Поддержание культур проводилось на среде «сусло-агар на морской воде». Хранение чистых культур грибов осуществлялось на «полужидкой картофельно-морковной среде» под минеральным маслом при комнатной температуре.

Молекулярно-генетические характеристики

Идентификация культур молекулярно-биологическими методами в «Коллекции морских микроорганизмов» состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

- «Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур»

- «Стандартная операционная процедура по выделению новых штаммов бактерий и грибов в Коллекции морских микроорганизмов»

Уточнение таксономической принадлежности и филогенетического положения грибов проводится на основе изучения молекулярно-генетических признаков с использованием метода мультилокусного анализа (генов ITS, бета-тубулина и в ряде случаев калмодулина) с последующим nBLAST-анализом полученных результатов в базе данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для амплификации генов ITS используют праймеры ITS1 и ITS4, бета-тубулина – праймеры Bt2a и Bt2b, калмодулина – Cmd5 и Cmd6.

6. Выделение геномной ДНК

Для выделения геномной ДНК 0,5 г клеток культуры гриба помещали в жидкий азот и разрушали механическим способом и экстрагировали в 5 мл 4М гуанидина изотиоцианата и разделяли на 2 пробирки. В каждую пробирку добавляли равный объем смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1, перемешивали, центрифугировали 10 мин при 13000 об/мин. К водной фазе добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия (рН 5.2) и равный объем изопропанола (для осаждения). Осадок ДНК собирали центрифугированием в течение 10 мин при 13000 об/мин, несколько раз промывали 70% этанолом, затем один раз 96% этанолом, высушивали при комнатной температуре, либо в термостате при 37°C, и растворяли в 500-1000 мкл бидистиллированной воды.

Выделение геномной ДНК может проводиться с использованием коммерческих наборов для выделения ДНК «GeneJET Gel Extraction Kit» или «MaqJET Plant Genomic DNA Kit» (ThermoScientific), согласно инструкции производителя.

7. Амплификация генов ITS.

Для амплификации генов ITS используют праймеры ITS1 и ITS4, бета-тубулина – праймеры Bt2a и Bt2b, калмодулина – Cmd5 и Cmd6.

На одну реакцию берется 25 мкл набора для проведения ПЦР «Dream Taq Green PCR Master Mix (2X)» (ThermoScientific), по 5 мкл 5 μМ раствора прямого и обратного праймера, 3 мкл раствора ДНК, 10 мкл ddH₂O. Пробирки с готовой смесью ставятся в амплификатор «DNA Engine Tetrad 2 peltier Thermal Cycler» (BioRad). Выставляется температура первичной денатурации 95°C на 10 мин., затем основная программа, состоящая из 30 циклов: 94°C – 30 сек, 55°C – 30 сек, 72°C – 1,5 мин. После последнего цикла, образцы выдерживаются при 70°C в течение 7 мин для заполнения выступающих 5 штрих концов ПЦР продуктов комплементарной цепью.

8. Электрофоретический анализ образцов

Визуализация продуктов амплификации проводится методом горизонтального гель-электрофореза в присутствии бромистого этидия. Гель-электрофорез проводится с использованием буферного раствора ТАЕ в 1% агарозном геле. Концентрированный 50х буферный раствор разводится дистиллированной водой из расчета 1 мл на 50 мл до 1х конечного раствора. Для получения 1% - го геля используется 1 гр. агарозы, 75 мл дистиллированной воды и 1,5 мл концентрированного буферного раствора ТАЕ. Периодически перемешивая, смесь нагревается в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Не доводя до кипения, гель вынимается из микроволновой печи и остывает приблизительно до 40-50⁰С. Далее в него добавляется 1,5 мкл бромистого этидия и заливается в форму. Для образования ячеек вставляются гребешки и гель оставляется на 20-30 минут для полимеризации.

В первую ячейку геля наносится 5 мкл ДНК-маркера «FastRuler™ Middle Range DNA Ladder» (Fermentas), в последующие ячейки каждый из продуктов ПЦР. Электрофорез проводится при напряжении в 100 В в течении 40 минут. Результат определяется под ультрафиолетом на гель-документирующей системе «VersaDoc XR Sistem» (BioRad).

9. Подготовка образцов для проведения секвенирования.

9.1 Очистка продуктов амплификации

Очистка продуктов амплификации проводится с использованием набора для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей «Cleanup Standart» (Евроген) согласно инструкции производителя.

9.2 Постановка реакции Сенгера.

Для постановки реакции Сэнгера используется коммерческий набор «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems). Подготавливается мастер-микс: 20 мкл воды, 6 мкл Buffer 5x, 1 мкл Big Dye, 1 мкл. Смесь перемешивается на вортексе «Microspin FV-2400» (BIOSAN) и сбрасываются капли. В тонкостенные пробирки мастер-микс аликвотируется по 28 мкл, затем добавляется 2 мкл продукта ПЦР. Образцы перемешиваются на вортексе и сбрасываются капли. На амплификаторе «AB 2720 Thermal Cycler» (BioRad) выставляется программа р.Сенгера: 95⁰С – 3 мин, 98⁰С – 8 сек, 54⁰С – 10 сек, 60⁰С – 4 мин, 60⁰С – 10 мин. Хранение - 4⁰С. Всего 30 циклов.

9.3 Очистка продуктов реакции Сенгера

Пробирки после хранения на -20⁰С прогрели при 98⁰С в течении 5мин. В 1.5 мл пробирки добавляется 2 мкл 0.5М ЭДТА, 30 мкл продуктов реакции Сенгера и 92 мкл перегнанного этанола. Тщательно перемешивается на вортексе и оставляется на 10 мин при комнатной температуре. Центрифугируется 20 мин при 13200 об/мин на центрифуге «5804R»

(Eppendorf). С помощью автоматической пипетки удаляется супернатант. Добавляется 180 мкл 75% этанола. Центрифугируется 3 мин при 13200 об/мин. Удаляется супернатант и образцы сушатся в сушильном шкафу «Е 28» (BINDER) при 70°C 10-15 мин.

10. Секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей

Определения нуклеотидной последовательности образцов ДНК проводится на секвенаторе «3130xl Genetic Analyzer» (Applied Biosystems).

Обработка и анализ полученных данных проводится с использованием программного обеспечения Sequence Scanner v1.0. Полученные на автоматическом секвенаторе нуклеотидные последовательности генов ITS редактируют с помощью программы Mega v. 6.0. Как фрагменты генов ITS, так и полные нуклеотидные последовательности генов ITS могут сравниваться с имеющимися в базах данных (GenBank) нуклеотидными последовательностями. Для этого используется программа BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Идентификация культур по последовательности генов ITS осуществляется с использованием следующего оборудования.

А. Оборудование для выделения геномной ДНК из образцов грибных культур

- боксированное помещение
- горелка спиртовая
- стерильный крючок
- пробирки объемом 1,5 мл, 0,2 мл
- вортекс MS 3 (ИКА)
- дозаторы емкостью 0,5-5 мкл, 5-50 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (Thermo Scientific, Ленпипет)
- центрифуга MiniSpin plus (Eppendorf)
- термостат TDB-120 (BioSan)

В. Оборудование для проведения гель-электрофореза

- основной блок питания «Эльф-8» (ДНК-технология)
- камера для горизонтального гель-электрофореза
- гель-документирующая система VersaDoc XR Sistem(BioRad)

Г. Оборудование для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР)

- амплификатор DNA Engine Tetrad 2 peltier Thermal Cyclер (BioRad)

- дозаторы емкостью 0,5-5 мкл, 5-50 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (Thermo Scientific, Ленпипет)

Д. Оборудование для очистки продуктов ПЦР

- центрифуга MiniSpin plus (Eppendorf)

- вортекс вортекс MS 3 (ИКА)

Е. Оборудование для постановки р.Сенгера

- автоматические пипетки емкостью 1-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл (Eppendorf, Германия),

- амплификатор AB 2720 Thermal Cycler (BioRad)

- вортексе Microspin FV-2400 (BioSan)

Ж. Оборудование для очистки продуктов р.Сенгера

- вортекс Microspin FV-2400 (BioSan)

- центрифуге 5804R (Eppendorf)

- сушильный шкаф Е 28 (BINDER)

З. Оборудование для проведения секвенирования и анализа результатов

- сиквенаторе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

- персональный компьютер, работающий под управлением Windows XP с установленным программным обеспечением.

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 20 минут.

***Penicillium attenuatum* КММ 4671**

СYA 25 °C: колонии 3.7–4.5 см в диаметре, хлопьевидные, позже слегка фазикюлятные, радиально-складчатые. Спороношение слабое, с оливково-серым оттенком. Мицелий белый. Реверзум кремовый. Экссудат и пигмент отсутствуют.

СYA 30 °C: колонии 0.9–1.0 см в диаметре в центре приподнятые. Спороношение скудное. Мицелий желтоватый. Реверзум желтый. Экссудат и пигмент отсутствуют.

СYA 37 °C: нет роста.

MEA: колонии 3.6–3.8 см в диаметре, с развитым воздушным мицелием, радиально-складчатые, тускло-серо-зеленые. Мицелий белый. Реверзум бежевый. Экссудат скудный, прозрачный. Пигмент отсутствует.

YES: колонии 4.5–4.8 см в диаметре, с развитым воздушным мицелием, слегка радиально-складчатые, голубовато-серые. Реверзум желтый. Экссудат скудный, прозрачный. Пигмент отсутствует.

Конидиеносцы тонкие, неокрашенные, обычно бивертициллярные, реже моновертициллярные или с субтерминальной веточкой с мутовкой фиалид. Ножки (40)100–250 × 2.5–3.0 μm, гладкие, иногда слегка шероховатые. Метулы в мутовках по 2–3, 7.5–10.5 × 2.5–3.0 μm, гладкие, прижатые. Фиалиды ампуловидные, с короткой шейкой, 9–10.5 × 2.0–2.2 μm. Конидии шаровидные или почти шаровидные, шероховатые, 2.0–3.0 μm.

ITS

```
ATGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACC
GAGCGAGGATTC
TCTCGAATCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTC
ACGGCCGCCG
GGGGGCATCTGCCCCGGGCCCCGCGCCCCGCCGAAGACACCTTGAACCTCTGTATGAAAA
TTGCAGTCTGAG
TCTAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGA
AGAACGCAGCG
AAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCCC
TGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTG
TGTTGGGTCTC
GTCCCCCTCCCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTC
GAGCGTATGGGG
CTTTGTC
```

Тубулин

```
TACACTGAAGGTACGCCGTGACCGCTTCGTTTTCTGATTGAGCGAACCGCTCGGGTAAT
ATATCTCTTCA
CCAAGGGTCACTACACTGAGGGTAGTTGTGGTGGATTGGGCAACTGATATCTCGTTAG
GTACAACGGTAC
TTCCGACCTCCAGCTCGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACCATGTGAGTACAGGACAA
TGAAATTGGCTA
TCTCGACATTATCTGATTGTTATGTTTTGACCGCTCAGGCCACGGTGACAAGTACGTT
CCCCGTGCCGT
CCTCGTCGACTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCTTTCGGCAAGC
TCTTCCGCCCC
GACAACTTCGTCTTTGGTCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTACA
CTGAGGGTA
```

Калмодулин

```
ATTGAGTTGTGGTAGCTGGACAACATACTGACGGCTTTGTTGCGAACAGGACAAGGA
TGCGCATGGTAA
GTGTGACSTTGCCCGACAGCCCAGTTGAACTGGCAGCAGTTTGCTTGATCCCAAATTGA
AAAAGAACGAG
ATGCTAAGACCGATCCTACCTCCAGGACAAATCACCACCAAGGAGCTTGGCACCGTCA
TGCGCTCGCTAG
GCCAGAACCCTCCGAGTCTGAGCTGCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAA
CAACGGCACCAT
TGACTTCCCCGGTACTTTCCCGTGTTCCCTAGATCCACCAGCGAGACGGATATTGACCG
GCCGATAGAGT
TCTTGACCATGATGGCCCGCAAGATGAAGGACACAGATTCCGAGGAGGAGATTGCGGA
GGCATTCAAGGT
```

GTTCGACCGCGACAACAACGGTTTCATCTCCGCTGCTGAGCTGCGCCACGTTATGACCT
STATCGG

***Penicillium ochotense* KMM 4670**

СУА 25 °С: колонии 3.6–4.3 см в диаметре, бархатистые, радиально-складчатые, с широким белым краем, 1-2 мм, голубовато-серые. Мицелий желтоватый. Реверзум коричневато-оливковый. Экссудат скудный, бледно-желтый. Пигмент отсутствует.

СУА 30 °С: колонии 2.5–2.8 см в диаметре, бархатистые, радиально-складчатые, в центре приподнимающиеся, голубовато-серо-зеленые. Реверзум пурпурно-коричневый. Экссудат и пигмент отсутствуют.

СУА 37 °С: нет роста.

МЕА: колонии 4.3–4.5 см в диаметре, бархатистые, радиально-складчатые, голубовато-серые. Мицелий желтый. Реверзум коричневатый. Экссудат и пигмент отсутствуют.

YES: колонии 4.5–5.5 см в диаметре, бархатистые, радиально-складчатые, серо-голубые, с бирюзовым оттенком по краю. Мицелий желтый. Реверзум желтый. Экссудат и пигмент отсутствуют.

Конидиеносцы обычно бивертициллярные, реже тривертициллярные, с субтерминальной веточкой с мутовкой метул и фиалид. Ножки 70–300 × 3.0–3.5 μm, гладкие, иногда шероховатые. Метулы в мутовках по 3-5, гладкие, иногда слегка расширяются кверху, 9.0–13.5 × 2.5–3.0 μm. Фиалиды ампуловидные, по 6–8(10) в мутовке, прижатые, почти параллельные, с узкой, иногда длинной шейкой, 7.5–12.0 × 2.5–3.0 μm. Конидии сферические, гладкие до шероховатых, 2.5–3.5 μm.

ITS

AGGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACC
GAGCGAGGATTC
TCTCGAATCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTC
ACGGCCGCCG
GGGGGCATCTGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACACCTTGAACCTCTGTATGAAAA
TTGCAGTCTGAG
TCTAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGA
AGAACGCAGCG
AAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCCC
TGGTATTCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTG
TGTTGGGTCTC
GTCCCCCTCCCCGGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTC
GAGCGTATGGGG
CTTTGTCACCCTCTCAGTAGGGGCGGGAGGCTCGAACTAATAATCGGAGAAGGGGCTT
ATCAATAACCGG
GGGTAGGGTTG

Тубулин

ATGATCGACGGTGAGAACGTCGCCCTGGCGCGTCGTTTTCTGCTTGAGCGAACCGCTCG
GGTAGTAGATC
TCTTCGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTATTCGGTCCGTGTGCCACTGATCTCTACA
CAGAGGGTCCG
TCCTTCCGACCTCCAGCTCGAGCGCATGAACGTTTACTTCAACCATGTGAGTACGGGAC
AATGAAATTGG
STATCTCGACATTATCTGATTGTTATGTTTTGACCGCTCAGGCCACGGTGACAAGTAC
GTTCCCCGTGC
CGTCCTCGTCGACTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCTTTCGGCA
AGCTCTTCCGC
CCCGACAACCTCGTCTTTGGTCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTA
CACTGAGGGTA

Калмодулин

TTGAAGTTGTGGTAGCTGGACAACATACTGACGGCTTTGTTGCGAACAGGACAAGGA
TGGCGATGGTAA
GTGTGACCTTGCCCGACAGCCCAGTTGAACTGGCAGCAGTTTGCTTGATCCCAAATTGA
AAAAGAACGAG
ATGCTAAGACCGATCCTACCTCCAGGACAAATCACCACCAAGGAGCTTGGCACCGTCA
TGCGCTCGCTAG
GCCAGAACCCTCCGAGTCTGAGCTGCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAA
CAACGGCACCAT
TGACTTCCCCGGTACTTTCCCGTGTTCCTAGATCCACCAGCGAGACGGATATTGACCG
GCCGATAGAGT
TCTTGACCATGATGGCCCGCAAGATGAAGGACACAGATTCCGAGGAGGAGATTCGCGA
GGCATTCAAGGT
GTTTCGACCGCGACAACAACGGTTTCATCTCCGCTGCTGAGCTGCGCCACGTTATGCCTT
CTA

***Penicillium piltunense* КММ 4668**

СУА 25 °С: колонии 3.5–4.8 см в диаметре, бархатистые, радиально-складчатые, голубовато-серо-зеленые, край белый. Реверзум желто-коричневый или коричневый. Экссудат скудный, желтый. Пигмент отсутствует.

СУА 30 °С: колонии 2.5–2.8 см в диаметре, бархатистые, радиально-складчатые, в центре приподнятые, голубовато-зеленые. Реверзум пурпурно-коричневый. Экссудат коричневый. Пигмент коричневатый.

СУА 37 °С: нет роста.

МЕА: колонии 3.6–4.0 см в диаметре, бархатистые, слегка радиально-складчатые, голубовато-серые, местами с белым воздушным мицелием. Реверзум желтовато-бежевый. Пигмент отсутствует.

YES: колонии 4.5–5.5 см в диаметре, бархатистые, радиально-складчатые, в центре скрученные, серовато-зеленые, мицелий желтоватый. Реверзум желтый, с оливково-зеленым оттенком. Экссудат и пигмент отсутствуют.

GCTAGGCCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTGCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCC
GACAACAACGGC
ACCATTGACTTCCCCGGTACTTTCCCGTGTTCCCTAGATCCACCAGCGAGACGGATATT
GACCGGCCGAT
AGAGTTCTTGACCATGATGGCCCGCAAGATGAAGGACACAGATTCCGAGGAGGAGATT
CGCGAGGCATTC
AAGGTGTTTCGACCGCGACAACAACGGTTTCATCTCCGCTGCTGAGCTGCGCCACGTTAT

Бактерии

Макроморфологические признаки

Штаммы *Algibacter pectinovorans* КММ 6376, *Nonlabens arenilitoris* КММ 6452 и КММ 6497

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

при росте на поверхности агаризованных сред:

размер колонии: 2-3 мм

форма колоний: круглая

поверхность колоний: гладкая

профиль колоний: выпуклый

наличие блеска и прозрачности колоний: блестящая, непрозрачная

цвет колонии: оранжевый

окраска питательной среды при наличии: нет

строение края и центра колоний: край ровный, центр гладкий

структура колоний: однородная

консистенция колоний: маслянистая

Рост в жидких питательных средах проявляется в виде помутнения и образования осадка..

Штаммы *Polaribacter reichenbachii* КММ 6386^T, *Winogradskyella ulvae* КММ 6390^T, *Polaribacter* sp. КММ 6412 и *Sphingobacterium* sp. КММ 6449

при росте на поверхности агаризованных сред:

размер колонии: 2-3 мм

форма колоний: круглая

поверхность колоний: гладкая

профиль колоний: выпуклый

наличие блеска и прозрачности колоний: блестящая, непрозрачная

цвет колонии: жёлтый

окраска питательной среды при наличии: нет

строение края и центра колоний: край ровный, центр гладкий

структура колоний: однородная

консистенция колоний: маслянистая

Рост в жидких питательных средах проявляется в виде помутнения и образования осадка..

Микроморфологические признаки

Морфологические признаки бактерий выявляли при световой микроскопии. Для исследования готовили препарат, для чего на предметное стекло наносили каплю физраствора, помещали в нее исследуемый материал. Препарат покрывали покровным стеклом и микроскопировали.

Основными диагностическими микроморфологическими признаками штамма *Algibacter pectinovorans* КММ 6376 являлись:

форма клеток : палочковидная

размер клеток: 0.4-0.6 мкм x 0.9-2.6 мкм

при наличии спор: форма, диаметр спор, расположение спор в клетке: не обнаружено

наличие подвижности клеток: неподвижные

тип жгутикования: отсутствуют

наличие включений и их описание: не обнаружено.

Основными диагностическими микроморфологическими признаками штамма *Polaribacter reichenbachii* КММ 6386^T являлись:

форма клеток : палочковидная

размер клеток: 0.3-0.4 мкм x 1.1-2.5 мкм

при наличии спор: форма, диаметр спор, расположение спор в клетке: не обнаружено

наличие подвижности клеток: неподвижные

тип жгутикования: отсутствуют

наличие включений и их описание: не обнаружено.

Основными диагностическими микроморфологическими признаками штамма *Winogradskyella ulvae* КММ 6390^T являлись:

форма клеток : палочковидная

размер клеток: 0.4-0.5 мкм x 1.2-2.7 мкм

при наличии спор: форма, диаметр спор, расположение спор в клетке: не обнаружено

наличие подвижности клеток: неподвижные

тип жгутикования: отсутствуют

наличие включений и их описание: не обнаружено

Основными диагностическими микроморфологическими признаками штамма *Polaribacter* sp. КММ 6412 являлись:

форма клеток : палочковидная

размер клеток: 0.3-0.4 мкм x 1.2-2.5 мкм

при наличии спор: форма, диаметр спор, расположение спор в клетке: не обнаружено

наличие подвижности клеток: неподвижные

тип жгутикования: отсутствуют

наличие включений и их описание: не обнаружено

Основными диагностическими микроморфологическими признаками штамма *Sphingobacterium* sp. КММ 6449 являлись:

форма клеток : палочковидная

размер клеток: 06-07 мкм x 1.0-2.5 мкм

при наличии спор: форма, диаметр спор, расположение спор в клетке: не обнаружено

наличие подвижности клеток: неподвижные

тип жгутикования: отсутствуют

наличие включений и их описание: не обнаружено

Основными диагностическими микроморфологическими признаками штаммов *Nonlabens arenilitoris* КММ 6452 и КММ 6497 являлись:

форма клеток : палочковидная

размер клеток: 0.2-0.4 мкм x 0.5-5.5 мкм

при наличии спор: форма, диаметр спор, расположение спор в клетке: не обнаружено

наличие подвижности клеток: неподвижные

тип жгутикования: отсутствуют

наличие включений и их описание: не обнаружено

Физиолого-биохимические свойства

Характеристика физиолого-биохимических свойств бактерий при проверке аутентичности культур включает в себя набор тестов, являющихся идентификационными для каждого представителя. Результаты тестирования показали, что штаммы *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 были способны использовать различные соединений углерода, азота и серы, отношение к молекулярному кислороду: штаммы *Algibacter pectinovorans* КММ 6376, *Polaribacter reichenbachii* КММ 6386^T, *Polaribacter* sp. КММ 6412, *Sphingobacterium* sp. КММ 6449 и *Nonlabens arenilitoris* КММ 6452 и КММ 6497 относились к аэробам, а штамм *Winogradskyella ulvae* КММ 6390^T был факультативно-анаэробным организмом, отношение к NaCl: штаммы *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 были галофильными организмами.

ферментативная активность по отношению к определенным субстратам 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: присутствуют каталаза, желатиназа, липазы, щелочная и кислая фосфатазы и оксидаза.

Дополнительно, штаммы *Polaribacter reichenbachii* КММ 6386^T и *Winogradskyella ulvae* КММ 6390^T продуцировали агаразу, амилазу, казеиназу и ДНК-азу. Присутствие амилазы и ДНК-азы отмечено в клетках штаммов *Polaribacter* sp. КММ 6412 и *Sphingobacterium* sp. КММ 6449. Штаммы *Nonlabens arenilitoris* КММ 6452 и КММ 6497 синтезировали ДНК-азу, а штамм *Nonlabens arenilitoris* КММ 6497 амилазу.

потребность в факторах роста для штаммов *Algibacter pectinovorans* КММ 6376,

Polaribacter reichenbachii KMM 6386^T, *Winogradskyella ulvae* KMM 6390^T, *Polaribacter* sp. KMM 6412, *Sphingobacterium* sp. KMM 6449 и *Nonlabens arenilitoris* KMM 6452 и KMM 6497: не обнаружена

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

Молекулярно-генетические характеристики

Идентификация культур молекулярно-биологическими методами в «Коллекции морских микроорганизмов» состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

- «Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур»
- «Стандартная операционная процедура по выделению новых штаммов бактерий и грибов в Коллекции морских микроорганизмов»

Идентификация культур молекулярно-биологическими методами по последовательности гена 16S rRNA состоит из ряда последовательных процедур, включающих в себя выделение геномной ДНК, амплификацию гена 16S rRNA, визуализацию при помощи горизонтального гель-электрофореза, подготовку полученных ампликонов и получению информации о последовательности с использованием программы Sequence Scanner v1.0.

11. Выделение геномной ДНК

С помощью одноразовой стерильной микробиологической петли 5-10 мг микробной культуры штамма KMM 6452 переносили в стерильную пробирку на 1.5 мл. Выделение геномной ДНК проводили с использованием коммерческих наборов для выделения ДНК «GeneJET Gel Extraction Kit» или «MaqJET Plant Genomic DNA Kit» (ThermoScientific), согласно инструкции производителя.

12. Амплификация гена 16S rRNA.

На одну реакцию брали 25 мкл набора для проведения ПЦР «Dream Taq Green PCR Master Mix (2X)» (ThermoScientific), по 5 мкл 5 μM раствора прямого и обратного праймера, 3 мкл раствора ДНК, 10 мкл ddH₂O. Пробирки с готовой смесью ставили в амплификатор «DNA Engine Tetrad 2 peltier Thermal Cycler» (BioRad). Выставляли температуру первичной денатурации 95°C на 10 мин., затем основную программу, состоящую из 30 циклов: 94°C –

30 сек, 55°C – 30 сек, 72°C – 1,5 мин. После последнего цикла, образцы выдерживали при 70°C в течение 7 мин для заполнения выступающих 5 штрих концов ПЦР продуктов комплементарной цепью.

13. Электрофоретический анализ образцов

Визуализация продуктов амплификации проводили методом горизонтального гель-электрофореза в присутствии бромистого этидия. Гель-электрофорез проводили с использованием буферного раствора ТАЕ в 1% агарозном геле. Концентрированный 50х буферный раствор разводили дистиллированной водой из расчета 1 мл на 50 мл до 1х конечного раствора. Для получения 1% - го геля использовали 1г агарозы, 75 мл дистиллированной воды и 1,5 мл концентрированного буферного раствора ТАЕ. Периодически перемешивая, смесь нагревали в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Не доводя до кипения, гель вынимали из микроволновой печи и остужали приблизительно до 40-50⁰С. Далее в него добавляли 1,5 мкл бромистого этидия и заливали в форму. Для образования ячеек вставляли гребешки и гель оставляли на 20-30 минут для полимеризации.

В первую ячейку геля наносили 5 мкл ДНК-маркера «FastRuler™ Middle Range DNA Ladder» (Fermentas), в последующие ячейки - каждый из продуктов ПЦР. Электрофорез проводится при напряжении в 100В в течении 40 минут. Результат определяли под ультрафиолетом на гель-документирующей системе «VersaDoc XR Sistem» (BioRad).

14. Подготовка образцов для проведения секвенирования.

14.1 Очистка продуктов амплификации

Очистка продуктов амплификации проводили с использованием набора для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей «Cleanup Standart» (Евроген) согласно инструкции производителя.

14.2 Постановка реакции Сэнгера.

Для постановки реакции Сэнгера использовали коммерческий набор «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems). Подготавливали мастер-микс: 20 мкл воды, 6 мкл Buffer 5x, 1 мкл Big Dye. Смесь перемешивали на вортексе «Microspin FV-2400» (BIOSAN) и сбрасывали капли. В тонкостенные пробирки мастер-микс аликвотили по 28 мкл, затем добавляли 2 мкл продукта ПЦР. Образцы перемешивали на вортексе и сбрасывали капли. На амплификаторе «AB 2720 Thermal Cycler» (BioRad) выставляли программу р.Сэнгера: 95°C –

3 мин, 98°C – 8 сек, 54°C – 10 сек, 60°C – 4 мин, 60°C – 10 мин. Хранение - 4°C. Всего 30 циклов.

14.3 Очистка продуктов реакции Сэнгера

Пробирки после хранения на -20°C прогревали при 98°C в течении 5мин. В 1.5 мл пробирки добавляли 2 мкл 0.5М ЭДТА, 30 мкл продуктов р.Сэнгера и 92 мкл перегнанного этанола. Тщательно перемешивали на вортексе и оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Центрифугировали 20 мин при 13200 об/мин на центрифуге «5804R» (Eppendorf). С помощью автоматической пипетки удаляли супернатант. Добавляли 180 мкл 75% этанола и центрифугировали 3 мин при 13200 об/мин. Удаляли супернатант и образцы сушили в сушильном шкафу «E 28» (BINDER) при 70°C 10-15 мин.

15. Секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей

Определения нуклеотидной последовательности образцов ДНК проводили на сиквенаторе «3130xl Genetic Analyzer» (Applied Biosystems).

Обработка и анализ полученных данных проводили с использованием программного обеспечения Sequence Scanner v1.0. Полученные на автоматическом секвенаторе нуклеотидные последовательности фрагментов 16S рДНК редактировали с помощью программы Mega v. 6.0. Как фрагменты 16S рДНК, так и полные нуклеотидные последовательности 16S рДНК могут сравниваться с имеющимися в базах данных (GenBank) нуклеотидными последовательностями. Для этого использовали программу BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). На основании полученных результатов штамм КММ 6376 был отнесен к валидно описанному виду рода *Algibacter*, *A. pectinovorans*, сем. *Flavobacteriaceae* класса *Flavobacteriia* филума *Bacteroidetes*.

Нуклеотидная последовательность гена 16S рДНК штамма *Algibacter pectinovorans* КММ 6376

GATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAACATAGAGTGCTTG
CATCTGATGACGACCGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATAGAATCTACCTTACACTG
AGGGATAGCCTTTGGAAACGAAGATTAATACCTCATAGTATACATGCTTCTCATGAAG
CTTGATTAAGGTTACGGTGTAAGATGACTATGCGTCCTATTAGCTAGATGGTAAGGT
AACGGCTTACCATGGCGACGATAGGTAGGGGCCCTGAGAGGGGGATCCCCACACTGG
TACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATG
GAGGCAACTCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACTGCCCTATGGGTTGTA AAC
TGCTTTTATACAGGAAGAAACATCTCTACGTGTAGAGACTTGACGGTACTGTAAGAAT
AAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATC

CGGAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGTGGATAATTAAGTCAGAGGTGAAAGTTT
GCAGCTCAACTGTAAAATTGCCTTTGATACTGGTTATCTTGAATTATTGTGAAGTAGTT
AGAATATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACATAGAATACCAATTGCGAAG
GCAGATTACTAACAAATCAATTGACACTGATGGACGAAAGCGTAGGTTAGCGAACGGGAT
TAGATACCCCGGTAGTCTACGCCGTAACGATGGATACTAGCTGTTGGACTTCGGTTCA
GTGGCTAAGCGAAAGTGATAAGTATCCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGAT
ACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAATGTAGATTGACAGGTTTAGAGATAGACTTTT
CTTCGGACAATTTACAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCAG
GTTAAGTCCTATAACGAGCGCAACCCCTGTTGTTAGTTGCCAGCGAGTCAAGTCGGGA
ACTCTAACAAGACTGCCAGTGCAAACCTGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC
ACGGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTAGGGACAGAGAGCAGCCA
CTGGGCGACCAGGAGCGAATCTATAAACCCCTATCACAGTTCGGATCGGAGTCTGCAAC
TCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCATATCAGCCATGATGCGGTGAATA
CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGGAAGCTGGGAGTGCCTGAAG
TCCGTCACCGTAAGGAGCGGCCTAGGGTAAAATCGGTAACTAGGGCT

Штамм *Polaribacter reichenbachii* КММ 6386^T был описан как типовой штамм нового вида рода *Polaribacter*, *P. reichenbachii* sp. nov., сем. *Flavobacteriaceae* класса *Flavobacteriia* филума *Bacteroidetes*. Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма КММ 6386^T была депонирована в базу данных ГенБанка под номером [HQ891656](#).

Штамм КММ 6412 был отнесен к роду *Polaribacter* сем. *Flavobacteriaceae* класса *Flavobacteriia* филума *Bacteroidetes*.

Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма *Polaribacter* sp. КММ 6412

GATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAACATTGTGCTTGCA
CAGATGACGACCGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATAGAACCTACCTTTTACAGAGGG
ATAGCCTTTAGAAATGAAGATTAATACCTCATAGTATTGCGATTTGGCATCAAGTTGTA
ATTAAAGATTTATCGGTAAAAGATGGCTATGCGTCCTATTAGTTAGTTGGTAAGGTAAC
GGCTTACCAAGACATCGATAGGTAGGGGTCTGAGAGGGAGATCCCCCACTGGTAC
TGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATGGAG
GGAACCTCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACTGCCCTATGGGTGT
AAACTGCTTTTATACAGGAAGAAACACTAGTACGTGTA_gCTT_{gac}GGTACTGTAAGA
ATAAGGACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTCCGAGCGTTA

TCCGGAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGCAGGCGGTTCGATTAAGTCAGAGGTGAAATC
CCATAGCTTAACTATGGAAGTGCCTTTGATACTGGTTGACTTGAGTCATATGGAAGTAG
ATAGAATGTGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACACAGAATACCGATTGCGA
AGGCAGTCTACTACGTATGTACTGACGCTCATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGACACTAGTTGTTGGGATTTATCT
CAGTGAATAAGCGAAAGTGATAAGTGTCCACCTGGGGAGTACGATCGCAAGATTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATG
ATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAATGTAGTATGACAGGTTTAGAGATAGACTT
TTCTTCGGACATATTACAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTC
AGGTTAAGTCCTATAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAGTTGCCAGCATGTAAAGATGG
GGAATAACGAGACTGCCGGTGCAAACCGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC
ATCACGGCCCTTACGTCCTGGGCCACACACGTGCTACAATGG
TATGGACAATGAGCAGCCATCTGGCAACAGAGAGCGAATCTATAAACCATATCACAGT
TCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGGATATC
AGCCATGATCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGG
AAGCTGGGAGTGCCTGAAGTCGGTCACCGCAAGGAGCCGCCTAGGGTAAACTGGTA
ACTAGGGCT

Штамм *Sphingobacterium* sp. КММ 6449 был отнесен к роду *Sphingobacterium* сем. *Sphingobacteriaceae* класса *Sphingobacteriia* филума *Bacteroidetes*.

Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма *Sphingobacterium* sp. КММ 6449

GATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGAACGGGATCCGGTGGTAGCTT
GCTATCATCGGTGAGAGTGGCGCACGGGTGCGTAAACGCGTGAGCAACCTACCCATATC
AGGGGGATAGCCCGGAGAAATCCGGATTAACACCGCATGATACAGCAGTCCCGCATG
GGACCACTGTCAAATATTCATAGGATATGGATGGGCTCGCGTGACATTAGCTTGTGGT
GGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATGTCTAGGGGCTCTGAGAGGAGAATCCCCCA
CACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGT
CAATGGGGGCAACCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGACTGCCCTATGGGTTG
TAAACTGCTTTTGCCGGGGAATAAACCCCTCCACgaGTGGaGGGCTGAATGTACCCGGA
GAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGT
TATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGCACTTTAAGTCAGGGGTGAAA
GACGGCAGCTCAACTGTCGCAGTGCCCTTGATACTGAAGTGCTTGAATGCGGTTGAAG
ACGGCGGAATGAGACAAGTAGCGGTGAAATGCATAGATATGTCTCAGAACACCGATTG

CGAAGGCAGCTGTCTAAGCCGTTATTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATCGAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGATGACTCG
ATGTTTGCATATACAGTAAGCGTCCAAGCGAAAGCGTTAAGTCATCCACCTGGGGAG
TACGCCCGCAAGGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGAGGAG
CATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAAAGTTACTGAA
GCATCCAGAGACGGATGCGTCCTTCGGGACAGGAAACTAGGTGCTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATGTTTA
GTTGCCAGCACGTKAAGGTGGGGACTCTAAACAGACTGCCTGCGCAAGCAGAGAGGA
AGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTCGGGGCTACACACGTGCTAC
AATGGATGGTACAGCGGGCAGCTACACAGCAATGTGATGCCAATCTCGAAAAGCCATT
CACAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGATTTCGCTAGTAATCG
CGTATCAGCAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAAG
CCATGAAAGCTGGGGGTACCTAAAGCATGTAACCGCAAGGAGCGTGTCAGGGTAAAA
CCGGTAATTGGGGCT

Штаммы *Nonlabens arenilitoris* КММ 6452 и КММ 6497 были отнесены к валидно описанному виду рода *Nonlabens*, *N. arenilitoris*, сем. *Flavobacteriaceae* класса *Flavobacteriia* филума *Bacteroidetes*. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК штаммов *Nonlabens arenilitoris* КММ 6452 и КММ 6497 были депонированы в базу данных ГенБанка под номерами JX174423 и JX174424, соответственно.

Идентификация культур по последовательности гена 16S rRNA осуществляли с использованием следующего оборудования.

А. Оборудование для выделения геномной ДНК из образцов микробных культур

- боксированное помещение
- горелка спиртовая
- одноразовая стерильная микробиологическая петля
- пробирки объемом 1,5 мл, 0,2 мл
- вортекс MS 3 (ИКА)
- дозаторы емкостью 0,5-5 мкл, 5-50 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (Thermo Scientific, Ленпипет)
- центрифуга MiniSpin plus (Eppendorf)
- термостат TDB-120 (BioSan)

В. Оборудование для проведения гель-электрофореза

- основной блок питания «Эльф-8» (ДНК-технология)
 - камера для горизонтального гель-электрофореза
 - гель-документирующая система VersaDoc XR Sistem(BioRad)
- Г. Оборудование для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР)
- амплификатор DNA Engine Tetrad 2 peltier Thermal Cyclер (BioRad)
 - дозаторы емкостью 0,5-5 мкл, 5-50 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (Thermo Scientific, Ленпипет)
- Д. Оборудование для очистки продуктов ПЦР
- центрифуга MiniSpin plus (Eppendorf)
 - вортекс вортекс MS 3 (ИКА)
- Е. Оборудование для постановки р.Сенгера
- автоматические пипетки емкостью 1-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл (Eppendorf, Германия),
 - амплификатор AB 2720 Thermal Cyclер (BioRad)
 - вортексе Microspin FV-2400 (BioSan)
- Ж. Оборудование для очистки продуктов р.Сенгера
- вортекс Microspin FV-2400 (BioSan)
 - центрифуге 5804R (Eppendorf)
 - сушильный шкаф E 28 (BINDER)
- З. Оборудование для проведения секвенирования и анализа результатов
- сиквенаторе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
 - персональный компьютер, работающий под управлением Windows XP с установленным программным обеспечением.

1. Штамм бактерии *Aquaticitalea* sp. КММ 9532

Штамм бактерии *Aquaticitalea* sp. КММ 9532 был выделен 10.10.2012 г. из образца грунта, собранного в прибрежной зоне залива Петра Великого Японского моря на глубине 0,5 м. Штамм КММ 9532 выделен методом прямого посева 100 мкл суспензии гомогенизированного грунта (1 см³) с добавлением морской воды на среду R2A agar (BD Difco). Штамм КММ 9532 получен путем посева отдельной колонии, и чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и посевом на агаризованной среде R2A и на среде Морской агар 2216 (MA 2216 BD Difco).

Макроморфологические признаки

Штамм бактерии *Aquaticitalea* sp. КММ 9532 растет на среде R2A, Морском Агаре

2216 и в Морском Бульоне 2216 (BD Difco). На Морском Агаре 2216 бактерии *Aquaticitalea* sp. КММ 9532 образуют круглые выпуклые гладкие блестящие желто-пигментированные колонии однородной консистенции с ровным краем 2-3 мм в диаметре. Рост бактерии в жидких питательных средах проявляется в виде однородного помутнения.

Микроморфологические признаки

Штамм *Aquaticitalea* sp. КММ 9532 представляет собой грамотрицательные оксидазоположительные каталазоположительные палочковидные неподвижные бактерии 0,2-0,3 мкм в диаметре и 1,6-2,5 мкм в длину.

Физиолого-биохимические свойства

Бактерии *Aquaticitalea* sp. КММ 9532 аэробные микроорганизмы, которые растут при содержании хлористого натрия в среде 0,5-5% и оптимальной концентрации 1-2% NaCl. Температурный интервал роста определен между 4 и 37 °С (оптимум 28-30 °С). Интервал pH для роста бактерий 6,0-9,0; оптимум pH 7,5-8,0. Штамм КММ 9532 гидролизует желатин (медленная реакция), крахмал, ДНК, твин 80, твин 40, твин 20; не гидролизует казеин, тирозин, ксантин, гипоксантин, хитин, целлюлозу; продуцирует сероводород из тиосульфата.

По результатам тестирования с использованием системы API 20NE (bioMérieux, France) штамм КММ 9532 дает отрицательные результаты на нитратредукцию, продукцию индола, аргинин дигидролазы и уреазы, гидролиз эскулина и желатина, продукцию бета-галактозидазы; ферментацию глюкозы, ассимиляцию D-глюкозы, D-мальтозы, капрата, малата, арабинозы, маннозы, маннита, N-ацетилглюкозамина, глюконата, адипата, цитрата и фенилацетата. По результатам тестирования с использованием системы API 20E (bioMérieux, France) штамм бактерий КММ 9532 слабо гидролизует желатин и утилизирует цитрат (медленная реакция); и показывает отрицательные результаты на продукцию бета-галактозидазы, индола, аргинин дигидролазы, лизин декарбоксилазы, орнитин декарбоксилазы, на продукцию сероводорода и уреазы в анаэробных условиях, на продукцию триптофан деаминазы и ацетоина (реакция Фогес-Проскауэра), окисление и/или ферментацию D-глюкозы, D-маннита, инозита, D-сахарозы, D-сорбита, L-рамнозы, D-мелибиозы, амигдалина и L-арабинозы.

Штамм КММ 9532 проявляет чувствительность к антибиотикам: ампициллину (10 мкг/диск), бензилпенициллину (10 ЕД/диск), ванкомицину (30 мкг/диск), карбенициллину (100 мкг/диск), хлорамфениколу (30 мкг/диск), олеандомицину (15 мкг/диск), офлоксацину (5 мкг/диск), рифампицину (5 мкг/диск), цефазолину (30 мкг/диск), линкомицину (15 мкг/диск), налидиксовой кислоте (30 мкг/диск), цефалексину (30 мкг/диск), эритромицину

(15 мкг/диск), тетрациклину (30 мкг/диск) и доксоциклину (10 мкг/диск); и устойчив к следующим антибиотикам: гентамицину (10 мкг/диск), канамицину (30 мкг/диск), неомицину (30 мкг/диск), оксациллину (10 мкг/диск), стрептомицину (30 мкг/диск), и полимиксину (300 ЕД/диск).

Молекулярно-генетические характеристики

Экстракцию геномной ДНК, амплификацию 16S рибосомного РНК гена посредством PCR-обработки и секвенирование PCR продуктов проводили согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Получена следующая нуклеотидная последовательность 16S рРНК гена штамма бактерии *Aquaticitalea* sp. КММ 9532:

CTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGC
ACTTCGGTGGCTGACGAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATGCAATCTACCTTTTAC
AGTGGGATAGCCCAGAGAAATTTGGATTAATACCGCATAGTATATAGGATCGGCATCG
GTTTTATATTAACATTTATGGGTAAAAGATGAGCATGCGTTCTATTAGCTAGATGGAG
TGGTAACGGCACCCCATGGCGACGATAGATAGGGGCCCTGAGAGGGGGATCCCCCAC
ACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGA
CAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACTGCCCTATGGGTTG
TAAACTGCTTTTATACGGGAAGAAACACCCCCTCGTGAGGGGGCTTGACGGTACCGTA
AGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCAAGC
GTTATCCGGAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGTGGATAATTAAGTCAGAGGTGA
AATCCTGCAGCTCAACTGTAGAATTGCCCTTGATACTGGTTATCTTGAATTATTATGAA
GTAGTTAGAATATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACATAGAATAACCAATT
GCGAAGGCAGATTACTAATAATATATTGACACTGATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGATACTAGCTGTTCCGGAG
CAATCTGAGTGGCTAAGCGAAAGTGATAAGTATCCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAG
AATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
TCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAATGTAGATTGACAGGTTTAGAGAT
AGACTTTTCTTCGGACAATTTACAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGA
GGTGTGAGGTTAAGTCCTATAACGAGCGCAACCCCTGTTGTTAGTTGCCAGCGAGTCAT
GTCGGGAACCTCTAACAAGACTGCCAGTGCAAACCTGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCACGGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTAGGTACAGAG
AGCAGCCACTGCGCGAGCAGGAGCGAATCTATAAAACCTATCACAGTTCGGATCGGAG
TCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCATATCAGCCATGATGC

GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCCGTCAAGCCATGGAAGCCGGGAGT
GCCTGAAGTCCGTCACCGTAAGGAGCGGCCTAGGGTAAAATTGGTAACTAGGGCTAAG
TCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGA

Штамм бактерии *Aquaticitalea* sp. КММ 9532 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 27.10.2012 года. Суспензия клеток штамма КММ 9532 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (MB 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус 80 °С. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии *Aquaticitalea* sp. КММ 9532 в Коллекции морских микроорганизмов осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам.

2. Штамм бактерии *Pseudovibrio* sp. КММ 9671

Штамм бактерии *Pseudovibrio* sp. КММ 9671 (= rh 17) был выделен 26.10.2015 г. из образца красной водоросли *Polysiphonia* sp. (*Polysiphonia* Greville, 1823, family *Rhodomelaceae*), отобранного в прибрежной зоне залива Петра Великого Японского моря. Штамм КММ 9671 выделен методом прямого посева 50 мкл суспензии гомогенизированного красной водоросли *Polysiphonia* sp. с добавлением морской воды на среду Морской агар 2216 (MA 2216 BD Difco). Штамм КММ 9671 получен путем рассева отдельной колонии, и чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и рассевом на агаризованной среде MA 2216 (BD Difco).

Макроморфологические признаки

Штамм бактерии *Pseudovibrio* sp. КММ 9671 растет на Морском Агаре 2216 и в Морском Бульоне 2216 (BD Difco). На Морском Агаре 2216 бактерии *Pseudovibrio* sp. КММ 9671 образуют круглые выпуклые гладкие блестящие темно-коричневые или черно-пигментированные колонии однородной консистенции с ровным краем 2-3 мм в диаметре. Рост бактерии в жидких питательных средах проявляется в виде помутнения с образованием мелких хлопьев.

Микроморфологические признаки

Штамм *Pseudovibrio* sp. КММ 9671 представляет собой грамотрицательные оксидазоположительные каталазоположительные палочковидные подвижные бактерии 3-4 мкм в длину.

Физиолого-биохимические свойства

Бактерии *Pseudovibrio* sp. КММ 9671 представляют собой аэробные галофильные микроорганизмы, растущие при содержании хлористого натрия в среде 1-4,5% и оптимальной концентрации 2-3% NaCl. Температурный интервал роста определен между 7 и 37 °С (оптимум 28-30 °С). Интервал pH для роста бактерий 6,0-9,0; оптимум pH 7,0-7,5. Штамм КММ 9671 гидролизует желатин, ДНК, твин 80; не гидролизует крахмал, казеин, тирозин, ксантин, гипоксантин; не продуцирует сероводород из тиосульфата.

По результатам тестирования с использованием системы API 20NE (bioMérieux, France) штамм КММ 9671 гидролизует желатин, эскулин, редуцирует нитраты, продуцирует аргинин дигидролазу и уреазу, слабо ферментирует глюкозу, продуцирует индол, ассимилирует D-мальтозу; дает отрицательные результаты на продукцию бета-галактозидазы, ассимиляцию D-глюкозы, капрата, малата, арабинозы, маннозы, маннита, N-ацетилглюкозамина, глюконата, адипата, цитрата и фенилацетата. По результатам тестирования с использованием системы API 20E (bioMérieux, France) штамм бактерий КММ 9671 гидролизует желатин, ферментирует D-глюкозу, продуцирует индол, ацетоин (реакция Фогес-Проскауэра), аргинин дигидролазу; и показывает отрицательные результаты на продукцию бета-галактозидазы, лизин декарбоксилазы, орнитин декарбоксилазы, продукцию сероводорода в анаэробных условиях, утилизацию цитрата, продукцию триптофан деаминазы и окисление и/или ферментацию D-маннита, инозита, D-сахарозы, D-сорбита, L-рамнозы, D-мелибиозы, амигдалина и L-арабинозы.

Молекулярно-генетические характеристики

Экстракцию геномной ДНК, амплификацию 16S рибосомного РНК гена посредством PCR-обработки и секвенирование PCR продуктов проводили согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Полученная нуклеотидная последовательность 16S рРНК гена штамма бактерии *Pseudovibrio* sp. КММ 9671 (= rh 17) депонирована в базы данных DDBJ/GenBank/EMBL под номером LC230112.

Штамм бактерии *Pseudovibrio* sp. КММ 9671 (= rh 17) помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 21.11.2015 года. Суспензия клеток штамма КММ 9671 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (MB 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус 80 °С.

Штамм бактерии *Cohaesibacter* sp. КММ 8009

Штамм бактерии *Cohaesibacter* sp. КММ 8009 был выделен в 2008 г. из бурой водоросли *Fucus evanescens*, собранной в бухте Кратерная на острове Янжича, Курильские острова, Россия, в ходе экспедиционного рейса № 38 на НИС «Академик Опарин» в августе 2008 года. Кусок таллома водоросли размером 2x2 см поместили в колбы с жидкой, стерильной питательной средой (100 мл), следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт - 1; глюкоза - 1,0; K_2HPO_4 - 0,2; $MgSO_4$ - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, рН 7,8. Колбы выдерживали при комнатной температуре в течение 2 месяцев, периодически перемешивая. Через 2 месяца по 100 мкл раствора наносили на поверхность застывшей среды (морской агар 2216, BD) и распределяли по поверхности плотной среды в чашке Петри шпателем Дригальского. Штамм КММ 8009 получен путем посева отдельной колонии, и чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и посевом на агаризованной среде морской агар 2216.

Макроморфологические признаки

Штамм бактерии *Cohaesibacter* sp. КММ 8009 растет на морском агаре 2216 и в морском бульоне 2216 (BD). На морском агаре 2216 бактерии *Cohaesibacter* sp. КММ 8009 образуют круглые, выпуклые, шероховатые, бежево-пигментированные колонии однородной консистенции с ровным краем 1-2 мм в диаметре. Рост бактерии в жидких питательных средах проявляется в виде однородного помутнения.

Микроморфологические признаки

Штамм *Cohaesibacter* sp. КММ 8009 представляет собой граммотрицательные, оксидазоположительные, каталазоположительные, неподвижные палочки 0,4-0,6 мкм в диаметре и 1,5-2,0 мкм в длину.

Физиолого-биохимические свойства

Бактерии *Cohaesibacter* sp. КММ 8009 аэробные микроорганизмы, которые растут при содержании хлористого натрия в среде 1-4%. Температурный интервал роста определен между 10 и 28 °С (оптимум 28 °С). Интервал рН для роста бактерий 4,0-9,0; оптимум рН 6,0-7,0. Штамм КММ 8009 не гидролизует желатин, казеин, крахмал, ДНК, твин 80, твин 20, твин 40; продуцирует сероводород из тиосульфата.

По результатам тестирования с использованием системы API 20NE (bioMérieux, France) штамм КММ 8009 продуцирует бета-галактозидазу; и дает отрицательные

результаты на нитратредукцию, продукцию индола, аргинин дигидролазы и уреазы, гидролиз желатина, ферментацию глюкозы, ассимиляцию D-глюкозы, D-мальтозы, капрата, малата, арабинозы, маннозы, маннита, N-ацетилглюкозамина, глюконата, адипата, цитрата и фенилацетата. По результатам тестирования с использованием системы API ZYM (bioMerieux, France) штамм КММ 8009 продуцирует щелочную фосфатазу, эстеразу (С 8), лейцин-ариламидаза, α -галактозидазу, β -галактозидазу, α -глюкозидазу, N-ацетил- β -глюкозаминидазу

Штамм КММ 8009 проявляет чувствительность к антибиотикам: ампициллину (10 мкг/диск), гентамицину (10 мкг/диск), канамицину (30 мкг/диск), левомицетину (30 мкг/диск) неомицину (30 мкг/диск), олеандомицину (15 мкг/диск), офлоксацину (5 мкг/диск), рифампицину (5 мкг/диск), стрептомицину (30 мкг/диск), тетрациклину (30 мкг/диск) и эритромицину (15 мкг/диск); и устойчив к следующим антибиотикам: бензилпенициллину (10 ЕД/диск), ванкомицину (30 мкг/диск), карбенициллину (100 мкг/диск), линкомицину (15 мкг/диск), налидиксовой кислоте (30 мкг/диск), оксациллину (10 мкг/диск), полимиксину (300 ЕД/диск), цефазолин (30 мкг/диск) и цефалексину (30 мкг/диск).

Молекулярно-генетические характеристики

Экстракцию геномной ДНК, амплификацию 16S рибосомного РНК гена посредством ПЦР-обработки и секвенирование ПЦР продуктов проводили согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Полученная нуклеотидная последовательность 16S рРНК гена штамма бактерии КММ 8009 и сравнение с известными последовательностями в базах данных позволила отнести данный штамм к роду *Cohaesibacter*.

Штамм бактерии *Cohaesibacter* sp. КММ 8009 депонирован в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2009 г. Суспензия клеток штамма КММ 8009 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, ВД) в 30% растворе глицерина при температуре -80-85 °С. Клетки штамма КММ 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 в Коллекции морских микроорганизмов осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам.

Штамм бактерии *Vibrio* sp. КММ 8419

Штамм бактерии *Vibrio* sp. КММ 8419 был выделен в 2016 г. из билюминесцентной полихеты *Chaetopterus variopedatus*, собранной в бухте Троица залива Петра Великого с помощью водолазной техники. Кусок ловчей сети полихеты около 1 г гомогенизировали в 5 мл стерильной морской воды. По 100 мкл гомогената наносили на поверхность застывшей среды (75% (v/v) морская вода и 25% (v/v) дистиллированная вода, pH 8.5: 0.12 мМ CaCl₂, 0.15 мМ MgSO₄•7H₂O, 0.09 мМ K₂HPO₄•3H₂O, 8.8 мМ NaNO₃, 0.19 мМ Na₂CO₃, 0.0013 мМ EDTA, 0.014 мМ лимонной кислоты, 0.015 мМ цитрат FeNH₄, 1% агар) и распределяли по поверхности плотной среды в чашке Петри шпателем Дригальского. Штамм КММ 8419 получен путем посева отдельной колонии, и чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и посевом на агаризованной среде морской агар 2216.

Макроморфологические признаки

Штамм бактерии *Vibrio* sp. КММ 8419 растет на морском агаре 2216 и в морском бульоне 2216 (BD). На морском агаре 2216 бактерии *Vibrio* sp. КММ 8419 образуют круглые, выпуклые, блестящие, бело-пигментированные колонии однородной консистенции с ровным краем 1-2 мм в диаметре. Рост бактерии в жидких питательных средах проявляется в виде однородного помутнения.

В поле зрения наблюдались небольшие, подвижные овоиды.

Микроморфологические признаки

Штамм *Vibrio* sp. КММ 8419 представляет собой грамотрицательные, оксидазоположительные, каталазоположительные, подвижные овоиды 0,4-0,6 мкм в диаметре и 0,9-1,0 мкм в длину.

Физиолого-биохимические свойства

Бактерии *Vibrio* sp. КММ 8419 аэробные микроорганизмы, которые растут при содержании хлористого натрия в среде 0,5-7%. Температурный интервал роста определен между 20 и 37 °С (оптимум 28 °С). Интервал pH для роста бактерий 6,0-10,0; оптимум pH 6,0-8,0. Штамм КММ 8419 гидролизует желатин, крахмал, твин 80, твин 20, твин 40; продуцирует сероводород из тиосульфата, не гидролизует ДНК и казеин.

По результатам тестирования с использованием системы API ZYM (bioMerieux, France) штамм КММ 8419 продуцирует кислую и щелочную фосфатазу, эстеразу (С 4); не продуцирует лейцин-ариламидазу, α-галактозидазу, β-галактозидазу, α-глюкозидазу, N-ацетил-β-глюкозаминидазу.

Штамм КММ 8419 проявляет чувствительность к антибиотикам: эритромицину (15

мкг/диск), хлорамфениколу (30 мкг/диск), и устойчив к следующим антибиотикам: ампициллину (10 мкг/диск), карбенициллину (100 мкг/диск), налидиксовой кислоте (30 мкг/диск), стрептомицину (30 мкг/диск), тетрациклину (30 мкг/диск).

Молекулярно-генетические характеристики

Экстракцию геномной ДНК, амплификацию 16S рибосомного РНК гена посредством ПЦР-обработки и секвенирование ПЦР продуктов проводили согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам. Полученная нуклеотидная последовательность 16S рРНК гена штамма бактерии КММ 8419 и сравнение с известными последовательностями в базах данных позволила отнести данный штамм к роду *Vibrio*.

Штамм бактерии *Vibrio* sp. КММ 8419 депонирован в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2016 г. Суспензия клеток штамма КММ 8419 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, ВД) в 30% растворе глицерина при температуре -80-85 °С. Клетки штамма КММ 8419 поддерживаются в столбиках с полужидким агаром под минеральным маслом, которые хранятся при температуре плюс 4-6 °С. Контроль жизнеспособности и чистоты штамма бактерии *Vibrio* sp. КММ 8419 в Коллекции морских микроорганизмов осуществляется согласно соответствующим Стандартным операционным процедурам.

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