

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 (Бондарцев, 1954). Определение грибов проводили по стандартным ключам и определителям (Thom, Raper, 1945; Raper *et al.*, 1949; Халабуда, 1950; Abe, 1956; Ames, 1961; Barron *et al.*, 1961; Cain, 1961; Литвинов, 1967; Stolk, 1967; Stolk, Scott, 1967; Ellis 1971; Stolk, Samson, 1972; Милько, 1974; Ellis, 1976; Билай, 1977; Кириленко, 1978; Pitt, 1979; Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1979; Ramirez, 1982; Егорова, 1986; Билай, Коваль, 1988; Черепанова, 1989; Cano, Gurro, 1990; Мельник, 2000 и др. оригинальные авторские статьи).

Фамилии авторов таксонов грибов приведены по П. Кирку и А. Анселлу (Kirk, Ansell, 1992).

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.http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](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.

1. 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.

2. 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.

3. Электрофоретический анализ образцов

Визуализация продуктов амплификации проводится методом горизонтального геле-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 40-50⁰C. 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 алиquotится 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: 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.

4.3 Очистка продуктов реакции Сенгера

Пробирки после хранения на -20°C прогрели при 98°C 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 «E 28» (BINDER) при 70°C 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 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 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.

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**

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

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

СУА 37 °С: нет роста.

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

YES: колонии 4.5–4.8 см в диаметре, с развитым воздушным мицелием, слегка радиально-складчатые, голубовато-серые. Реверзум желтый. Эксудат 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

ATGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTA
CCGAGCGAGGATTC
TCTCGAATCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCC
TCACGGCCGCGC
GGGGGCATCTGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACACCTTGAACCTCTGTATGAAA
ATTGCAGTCTGAG
TCTAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATG
AAGAACGCAGCG
AAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCC
TGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTG
TGTGTTGGGTCTC
GTCCCCCTCCCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCC
TCGAGCGTATGGGG
CTTTGTC

Тубулин

TACACTGAAGGTACGCCGTGACCGCTTCGTTTTCTGATTGAGCGAACCGCTCGGGTA
ATATATCTCTTCA
CCAAGGGTCACTACACTGAGGGTAGTTGTGGTGGATTGGGCAACTGATATCTCGTTA
GGTACAACGGTAC
TTCCGACCTCCAGCTCGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACCATGTGAGTACAGGACA
ATGAAATTGGCTA
TCTCGACATTATCTGATTGTTATGTTTTGACCGCTCAGGCCACGGTGACAAGTACGT
TCCCCGTGCCGT
CCTCGTCTGACTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCTTTCGGCAA
GCTCTTCCGCCCC
GACAACCTCGTCTTTGGTCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTAC
ACTGAGGGTA

Калмодулин

ATTGAGTTGTGGTAGCTGGACAACATACTGACGGCTTTGTTGCGAAACAGGACAAGG
ATGGCGATGGTAA
GTGTGACCTTGCCCGACAGCCCAGTTGAACTGGCAGCAGTTTGCTTGATCCCAAATT
GAAAAAGAACGAG
ATGCTAAGACCGATCCTACCTCCAGGACAAATCACCACCAAGGAGCTTGGCACCGTC
ATGCGCTCGCTAG
GCCAGAACCCTCCGAGTCTGAGCTGCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGAC
AACAACGGCACCAT

TGACTTCCCCGGTACTTTCCCGTGTTCCTAGATCCACCAGCGAGACGGATATTGACC
GGCCGATAGAGT
TCTTGACCATGATGGCCCCGCAAGATGAAGGACACAGATTCCGAGGAGGAGATTTCG
GAGGCATTCAAGGT
GTTTCGACCGCGACAACAACGGTTTCATCTCCGCTGCTGAGCTGCGCCACGTTATGAC
CTCTATCGG

***Penicillium ochotense* КММ 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.

УЭС: 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

AGGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTA
CCGAGCGAGGATTC
TCTCGAATCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCC
TCACGGCCGCCG
GGGGGCATCTGCCCCCGGGCCCCGCGCCCGCGAAGACACCTTGAACCTCTGTATGAAA
ATTGCAGTCTGAG
TCTAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATG
AAGAACGCAGCG
AAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCCC
TGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTG
TGTGTTGGGTCTC
GTCCCCCTCCCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCC
TCGAGCGTATGGGG
STTTGTCACCTCTCAGTAGGGGCGGGAGGCTCGAАСТААТААТCGGAGAAGGGGCT
TATCAATAACCGG
GGGTAGGGTTG

Тубулин

ATGATCGACGGTGAGAACGTCGCCCTGGCGCGTCGTTTTCTGCTTGAGCGAACCGCT
CGGGTAGTAGATC
TCTTCGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTATTCGGTTCGGTGTGCCACTGATCTCTAC
ACAGAGGGTCCG

TCCTTCCGACCTCCAGCTCGAGCGCATGAACGTTTACTTCAACCATGTGAGTACGGG
ACAATGAAATTGG
STATCTCGACATTATCTGATTGTTATGTTTTGACCGCTCAGGCCACGGTGACAAGTA
CGTCCCCGTGC
CGTCCTCGTCGACTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCTTTTCGGC
AAGCTTTCCGC
CCCGACAACCTTCGTCTTTGGTCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCAC
TACACTGAGGGTA

Калмодулин

TTGAAGTTGTGGTAGCTGGACAACATACTGACGGCTTTGTTGCGAAACAGGACAAGG
ATGGCGATGGTAA
GTGTGACSTTGCACGAGCCAGTTGAACTGGCAGCAGTTTGCTTGATCCCAAATT
GAAAAAGAACGAG
ATGCTAAGACCGATCCTACCTCCAGGACAAATCACCACCAAGGAGCTTGGCACCGTC
ATGCGCTCGCTAG
GCCAGAACCCTCCGAGTCTGAGCTGCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGAC
AACAACGGCACCAT
TGACTTCCCCGGTACTTTCCCGTGTTCCCTAGATCCACCAGCGAGACGGATATTGACC
GGCCGATAGAGT
TCTTGACCATGATGGCCCGCAAGATGAAGGACACAGATTCCGAGGAGGAGATTTCGC
GAGGCATTCAAGGT
GTTTCGACCGCGACAACAACGGTTTCATCTCCGCTGCTGAGCTGCGCCACGTTATGCC
TTCTA

***Penicillium piltunense* KMM 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. Эксудат 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. Эксудат 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.

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

Конидиеносцы в основном бивертициллярные, иногда с субтерминальной веточкой с мутовкой метул. Ножки 300–450 × 3–4 μm, гладкие или слегка шероховатые. метулы в мутовках по 2-5, прижатые или дивергентные, гладкие, 7.5–10.5 × 2.7–3 μm. Фиалиды по 3-6 в мутовке, расположены компактно, ампуловидные, обычно с длинной, реже с резко суживающейся шейкой, 9–10.5 × 2.5–3 μm. Конидии шаровидные или почти шаровидные, шероховатые, 3–3.5 μm.

ITS

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 организм, 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* КММ 6386^T, *Winogradskyella ulvae* КММ 6390^T, *Polaribacter* sp. КММ 6412, *Sphingobacterium* sp. КММ 6449 и *Nonlabens arenilitoris* КММ 6452 и КММ 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.

6. Выделение геномной ДНК

С помощью одноразовой стерильной микробиологической петли 5-10 мг микробной культуры штамма КММ 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.

7. 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 μ M 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.

8. Электрофоретический анализ образцов

Визуализация продуктов амплификации проводили методом горизонтального гель-электрофореза в присутствии бромистого этидия. Гель-электрофорез проводили с использованием буферного раствора TAE 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 TAE. 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 «FastRulerTM 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).

9. Подготовка образцов для проведения секвенирования.

9.1 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.

9.2 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 5х, 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: 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 Сэнгера

Пробирки после хранения на -20⁰С прогревали при 98⁰С 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 «Е 28» (BINDER) при 70°C 10-15 мин.

10. 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

GATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAACATAGAGTGCT
TGCATTCTGATGACGACCGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATAGAATCTACCTTACA
CTGAGGGATAGCSTTTGGAAACGAAGATTAATACCTCATAGTATACATGCTTCTCAT
GAAGCTTGTATTAAAGGTTACGGTGTAAGATGACTATGCGTCCTATTAGCTAGATGG
TAAGGTAACGGCTTACCATGGCGACGATAGGTAGGGGCCCTGAGAGGGGGATCCCC
CACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATAT
TGGACAATGGAGGCAACTCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACTGCCCTATG
GGTTGTAAACTGCTTTTATACAGGAAGAAACATCTCTACGTGTAGAGACTTGACGGT
ACTGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGA
TCCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGTGGATAATTAAGTC
AGAGGTGAAAGTTTGCAGCTCAACTGTAATAATTGCCTTTGATACTGGTTATCTTGAA
TTATTGTGAAGTAGTTAGAATATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACATA
GAATACCAATTGCGAAGGCAGATТААСААТСААТТGACACTGATGGACGAAAG
CGTAGGTAGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCTACGCCGTAACGATGGATA
CTAGCTGTTGGACTTCGGTTCAGTGGCTAAGCGAAAGTGATAAGTATCCCACCTGGG
GAGTACGTTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGT

GGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAATGTAG
ATTGACAGGTTTAGAGATAGACTTTTCTTCGGACAATTTACAAGGTGCTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCAGGTTAAGTCCTATAACGAGCGCAACCCCTG
TTGTTAGTTGCCAGCGAGTCAAGTTCGGAACTCTAACAAGACTGCCAGTGCAAACCTG
TGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCACGGCCCTTACGTCCTGGGCTACACAC
GTGCTACAATGGTAGGGACAGAGAGCAGCCACTGGGCGACCAGGAGCGAATCTATA
AACCTATCACAGTTCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGC
TAGTAATCGCATATCAGCCATGATGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACC
GCCCGTCAAGCCATGGAAGCTGGGAGTGCCTGAAGTCCGTCACCGTAAGGAGCGGC
CTAGGGTAAAATCGGTAACCTAGGGCT

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

GATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAACATTGTGCTTGC
ACAGATGACGACCGGCACGGGTGCGTAACGCGTATAGAACCTACCTTTTACAGA
GGGATAGCCTTTAGAAATGAAGATTAATACCTCATAGTATTGCGATTTGGCATCAAG
TTGTAATTAAGATTTATCGGTA AAAAGATGGCTATGCGTCCTATTAGTTAGTTGGTAA
GGTAACGGCTTACCAAGACATCGATAGGTAGGGGTCCTGAGAGGGAGATCCCCAC
ACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGG
ACAATGGAGGGAACTCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACTGCCCTATGGG
TTGT

AAACTGCTTTTATACAGGAAGAAACACTAGTACGTGTA CTgacTTgacGGTACTGTAAG
AATAAGGACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTCCGAGCG
TTATCCGGAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGCAGGCGGTCGATTAAGTCAGAGGTGA
AATCCCATAGCTTAACTATGGA ACTGCCTTTGATACTGGTTGACTTGAGTCATATGGA
AGTAGATAGAATGTGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACACAGAATACCG
ATTGCGAAGGCAGTCTACTACGTATGTA CTGACGCTCATGGACGAAAGCGTGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGACACTAGTTGTT

GGGATTTATCTCAGTGACTIONAAGCGAAAGTGATAAGTGTCCCACCTGGGGAGTACGAT
CGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAATGTAGTATGACAGG
TTTAGAGATAGACTTTTTCTTCGGACATATTACAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGCCGTGAGGTGTCAGGTAAAGTCCTATAACGAGCGCAACCCTTGTTCGTTAGTTG
CCAGCATGTAAAGATGGGGACTCTAACGAGACTGCCGGTGCAAACCGTGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAATCATCACGGCCCTTACGTCCTGGGCCACACACGTGCTACAA
TGG

TATGGACAATGAGCAGCCATCTGGCAACAGAGAGCGAATCTATAAACCATATCACA
GTTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGGAT
ATCAGCCATGATCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCC
ATGGAAGCTGGGAGTGCCTGAAGTCGGTCACCGCAAGGAGCCGCCTAGGGTAAAAC
TGGTAACTAGGGCT

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

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

GATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGAACGGGATCCGGTGGTAGC
TTGCTATCATCGGTGAGAGTGGCGCACGGGTGCGTAAACGCGTGAGCAACCTACCCAT
ATCAGGGGGATAGCCCGGAGAAATCCGGATTAACACCGCATGATACAGCAGTCCCG
CATGGGACCACTGTCAAATATTCATAGGATATGGATGGGCTCGCGTGACATTAGCTT
GTTGGTGGGGTAAACGGCCCAAGGCGACGATGTCTAGGGGCTCTGAGAGGAGAA
TCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGG
AATATTGGTCAATGGGGGCAACCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGACTGCC
CTATGGGTTGTAAACTGCTTTTGCCGGGGGAATAAACCCCTCCACgaGTGGaGGGCTGA
ATGTACCCGGAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG
AGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGCACTTTA
AGTCAGGGGTGAAAGACGGCAGCTCAACTGTTCGCAGTGCCCTTGATACTGAAGTGCT
TGAATGCGGTTGAAGACGGCGGAATGAGACAAGTAGCGGTGAAATGCATAGATATG
TCTCAGAACACCGATTGCGAAGGCAGCTGTCTAAGCCGTTATTGACGCTGATGCACG
AAAGCGTGGGGATCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATG
ATGACTCG

ATGTTTGCATATACAGTAAGCGTCCAAGCGAAAGCGTTAAGTCATCCACCTGGGGA
GTACGCCCGCAAGGGTGAAGACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGAGG

AGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAAAGTTACT
GAAGCATCCAGAGACGGATGCGTCCTTCGGGACAGGAACTAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTA
TGTTTAGTTGCCAGCACGTKAAGGTGGGGACTCTAAACAGACTGCCTGCGCAAGCAG
AGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTCcGGGGCTACACAC
GTGCTACAATGGATGGTACAGCGGGCAGCTACACAGCAATGTGATGCCAATCTCGA
AAAGCCATTACAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGATTTCG
CTAGTAATCGCGTATCAGCAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
CGCCCGTCAAGCCATGAAAGCTGGGGGTACCTAAAGCATGTAACCGCAAGGAGCGT
GTCAGGGTAAAACCGGTAATTGGGGCT

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 Cycler (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 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 (bioMerieux, 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 (bioMerieux, 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:

CTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACA
GCACTTCGGTGGCTGACGAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATGCAATCTACCTT
TTACAGTGGGATAGCCCAGAGAAATTTGGATTAATACCGCATAGTATATAGGATCGG
CATCGGTTTTATATTAACATTTATGGGTAAAAGATGAGCATGCGTTCTATTAGCTAG
ATGGAGTGGTAACGGCACCCCATGGCGACGATAGATAGGGGCCCTGAGAGGGGGAT
CCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGA
ATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACTGCC
CTATGGGTTGTAAACTGCTTTTATACGGGAAGAAACACCCCTCGTGAGGGGGCTTG
ACGGTACCGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
GAGGATCCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGTGGATAATT
AAGTCAGAGGTGAAATCCTGCAGCTCAACTGTAGAATTGCCTTTGATACTGGTTATC
TTGAATTATTATGAAGTAGTTAGAATATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATT
ACATAGAATACCAATTGCGAAGGCAGATTACTAATAATATATTGACACTGATGGACG
AAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
GATACTAGCTGTTTCGGAGCAATCTGAGTGGCTAAGCGAAAGTGATAAGTATCCCACC
TGGGGAGTACGTTTCGAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAAT
GTAGATTGACAGGTTTAGAGATAGACTTTTCTTCGGACAATTTACAAGGTGCTGCAT
GGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCAGGTAAAGTCCTATAACGAGCGCAACC
CCTGTTGTTAGTTGCCAGCGAGTCATGTCGGGAACCTAACAAGACTGCCAGTGCAA
ACTGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCACGGCCCTTACGTCCTGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGTAGGTACAGAGAGCAGCCACTGCGCGAGCAGGAGCGAATC
TATAAAACCTATCACAGTTCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAA
TCGCTAGTAATCGCATATCAGCCATGATGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCCGTCAAGCCATGGAAGCCGGGAGTGCTGAAGTCCGTCACCGTAAGGAG
CGGCCTAGGGTAAAATTGGTAACTAGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGG
AAGGTGCGGCTGA

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 чернопигментированные 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 грамотрепетельные 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 криобирках 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 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, 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 грамотрепательные, 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 (bioMérieux, 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), левомецетину (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 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, рН 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 рассева отдельной колонии, и чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и рассевом 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 грамтрицательные, 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 рН для роста бактерий 6,0-10,0; оптимум рН 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 (bioMérieux, France) штамм КММ 8419 продуцирует кислую и щелочную фосфатазу, эстеразу (С 4); не

продуцирует лейцин-ариламидаза, 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.

