

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 отсеивают 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* КММ 6376, *Polaribacter reichenbachii* КММ

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 arenilitoris* KMM 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* KMM 3900^T

Штамм бактерии *Marinicella litoralis* KMM 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 KMM 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 KMM 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* KMM 9530^T

Штамм бактерии *Loktanella maritima* KMM 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 рассева отдельной колонии отдельной колонии, выбранной из выросших колоний на 2-ой чашке Петри. Чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и рассевом 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, 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 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, 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 чашках. 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 *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 отсеивали 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 mM CaCl₂, 0.15 mM MgSO₄•7H₂O, 0.09 mM K₂HPO₄•3H₂O, 8.8 mM NaNO₃, 0.19 mM Na₂CO₃, 0.0013 mM EDTA, 0.014 mM лимонной кислоты, 0.015 mM 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 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 *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 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 7501 получен путем посева отдельной колонии. Определение чистоты выделенной культуры осуществляли согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Marinomonas arenicola* КММ 7506, 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): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 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 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 °C 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, pH 7,8. Штамм КММ 7506 получен путем посева 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): 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, 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 °C 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, pH 7,8. Штамм КММ 7507 получен путем посева 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): 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, 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; K_2HPO_4 - 0,2; MgSO_4 - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, pH 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, 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 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, pH

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; 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 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; K_2HPO_4 - 0,2; MgSO_4 - 0,05; 500 мл морской воды; 500 мл дистиллированной воды, pH 7,8. Штамм КММ 7504 получен путем рассева 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 pH 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), эритромицину (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

```
СТАСАСАТGCaAGTCGAGCGGТААCAGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCTGACGAGC
GGCGGACGGGTGAGТААTGCTTGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAACAGTT
GGAAACGACTGCTAАTACCGCATAATGTCTACGGACCAAGGGGGCTTCGGCTC
TCGCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGТААTGCTCACC
AAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAАTATTGCACAATGGGCG
CAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGC
ACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGTTAGTAGTTAАTACCTGCTARCTGTGACGTTACT
GACAGAAGAAGCACCGGCTAАCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGТААTACGGAGGGT
GCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTТАAG
CGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAАCTGCATTTCGAACTGGCAAAC
TAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAАTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATCTGAAGGAАTACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTCA
TGТАСGAAAGCGTGGGGAGCAАACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGTCTACTAGAAGCTCGGAGCCTCGGTTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCA
TTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAАACTCAAATGAATTGA
CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTТААTTCGATGCAACGCGAAGA
ACCTTACCTACACTTGACATAСAGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCCTTCG
GGAАCTCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCГCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGТААTGCT
GAGAАCTСТАAGGAGACTGCCGGTGATAАACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTC
AAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAСА
```

GAGTGCTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCGTCGTTAGTCCG
GATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTATC
AGAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT
GGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTCGGGAGGACGTtACCaCG
GA

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, ВД) 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, рН 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, рН 7,8. Штамм КММ 7506 получен путем рассева отдельной колонии. Чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и рассевом на агаризованной среде морской агар 2216.

Макроморфологические признаки

Штамм бактерии *Marinomonas arenicola* КММ 7506 растёт на морском агаре 2216 и в морском бульоне 2216 (ВД). 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

```
GCGGCTACCATGCAaGTCGAGCGGAACGATGATAGCTTGCTATCAGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTA  
ACGCGTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGACAACATGTGGAAACGCATGCTAATACCGCATAACGCCCTACG  
GGGAAAGGAGGGGATCTTCGGACSTTTCGCTATTAGATGAGCCTGCGTAAGATTAGCTAGTTGGTGGGGT  
AAAGGCSTACCAAGGCGACGATCTTTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGTCACACTGGGACTGAGACACGG  
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC
```


GTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTCAGGGGTGAGGAAGGGTGATAGCTTAATACGTTAT
CATCTTGACGTTAGCCCCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGC
AAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCGTAGAGTGGTTTGTAAAGTCGGATGTGAAATCCCAGG
GCTCAACCTTGGAAATGGCACCCGATACTGGCAGGCTAGAGTATGGTAGAGGGGTGTGGAATTTCTGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGACACCCTGGACTAATACTGACACTGA
GGTGCAGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTAGC
CGTTGGGTTGTAATGACTTAGTGGCGCAGCTAACGCAATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
TAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGA
AGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGTGAATTTAGCAGAGATGCTTTAGTGCCTTCGGGAACACTGAGACA
GGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTAT
CCTTATTTGCCAGCACTTCGGGTGGGAACTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAC
GACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAGAGGGCTGCA
AGTAGCGATAGTGAGCGAATCCCACAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG
AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
CGTACACACCATGGGAGTTGATTGCTCCAGAAGTAGCTAGCTTAACCTTTCGGGGATGGCGGTACCTCGGAGT
TC

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 (MB 2216, BD) 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, рН 7,8. Штамм КММ 7509 получен путем рассева отдельной колонии. Чистота выделенной культуры подтверждена визуальным, микроскопическим контролем и рассевом 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

GgCTACCATGCAaGTCTGAGCGGAACGATGATAGCTTGCTATCAGGCGTCGAGCGGGACGGGTGAGTAACGC
GTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGACAACATGTGGAAACGCATGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGA
AAGGAGGGGATCTTCGGACCTTTCGCTATTAGATGAGCCTGCGTAAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC
TACCAAGGCGACGATCTTTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGTCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG
AAGGCCTTAGGGTTGTAAGCACTTTCAGGGGTGAGGAAGGGTGTATAGCTTAATACGTTATCATCTTGACGTT
AGCCCCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTTGTTAAGTCGGATGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGAAAT
GGCACCCGATACTGGCAGGCTAGAGTATGGTAGAGGGGTGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
TATAGGAAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGACACCCCTGGACTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGTTGTAATGACTT
AGTGGCGCAGCTAACGCAATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAATGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACA
TCCAGTGAATTTAGCAGAGATGCTTTAGTGCCTTCGGGAACACTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGC
TCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTATCCTTATTTGCCAGCACTTCGGGTGG
GAACTTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACG
AGTAGGGCTACACACGTGTACAATGGCGTATACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCACA
AAGTACGTCGTAAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCA
GAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGATTGCTCCAGA
AGTAGCTAGCTTAACCTTtCGGGgATGGCGGTACcTC

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.

