

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

Грибные штаммы:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.7. Одновременно проводили контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

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

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

2.2. После посева чашки Петри оставляли в условиях бокса.

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

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

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

2.6. Одновременно проводили контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

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

2.8 Одновременно проводили контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

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

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

БАКТЕРИИ

Контроль жизнеспособности культур в Коллекции морских микроорганизмов осуществляется следующим образом.

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

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

1. Проводили контроль жизнеспособности культур штаммов *Algibacter pectinovorans* КММ 6376, *Polaribacter reichenbachii* КММ 6386^T, *Winogradskyella ulvae* КММ 6390^T, *Polaribacter* sp. КММ 6412, *Sphingobacterium* sp. КММ 6449 и *Nonlabens arenilitoris* КММ 6452 и КММ 6497, находящихся на хранении при температуре -80-85 °С.

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

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

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

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 2 суток.

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

1.6. Одновременно проводили контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

2. Проводили контроль жизнеспособности культур штаммов *Algibacter pectinovorans* КММ 6376, *Polaribacter reichenbachii* КММ 6386^T, *Winogradskyella ulvae* КММ 6390^T, *Polaribacter* sp. КММ 6412, *Sphingobacterium* sp. КММ 6449 и *Nonlabens arenilitoris* КММ 6452 и КММ 6497 после хранения при +4-+6 °С.

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

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

- 2.3. Чашки выдерживали в термостате в течение 2 суток.
- 2.4. Выросшие изолированные колонии отсевали бактериальной петлей на поверхность скошенной плотной среды.
- 2.5. Пробирки с выросшими по штриху колониями ставили на хранение при температуре +4-+6 °С.
- 2.6. Одновременно проводили контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

Контроль жизнеспособности культуры штаммов *Algibacter pectinovorans* КММ 6376, *Polaribacter reichenbachii* КММ 6386^T, *Winogradskyella ulvae* КММ 6390^T, *Polaribacter* sp. КММ 6412, *Sphingobacterium* sp. КММ 6449 и *Nonlabens arenilitoris* КММ 6452 и КММ 6497 осуществляли с использованием следующего оборудования: ламинарные боксы, автоклавы, термостаты, термостатируемые качалки, микроскопы, наборы микропипеток, источники питания, холодильники, центрифуги, вытяжные шкафы и др.

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

Штамм бактерии *Marinicella litoralis* КММ 3900^T помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 15.06.2008 г. Суспензия клеток штамма КММ 3900^T хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (MB 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

- 1.1. Криопробирку с суспензией клеток штамма КММ 3900^T в растворе криопротектора размораживали 15-20 мин.
- 1.2. Из криопробирки отбирали аликвоту 100 мкл суспензии клеток штамма КММ 3900^T и производили посев на питательную агаризованную среду Морской Агар 2216 в чашки Петри.
- 1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещали в термостат.
- 1.4. Чашки выдерживают в термостате в течение 3 суток.
- 1.5. Выросшие изолированные колонии бактерий КММ 3900^T переносили в раствор криопротектора и ставят на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре минус 80 °С.
- 1.6. Бактерии КММ 3900^T дают хороший рост на твердой среде Морской Агар 2216, поэтому посев в соответствующую жидкую среду не проводили.
- 1.7. Контроль чистоты культуры проводят согласно соответствующей СОП. Чистота культуры КММ 3900^T подтверждена визуальным и микроскопическим контролем.

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

- 2.1. Бактериальные клетки КММ 3900^T отбирали из столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящегося на хранении при температуре плюс 6 °С, и пересевали на твердую питательную среду SWM в чашки Петри.
- 2.2. После посева чашки Петри помещали в термостат.
- 2.3. Чашки выдерживали в термостате в течение 3-4.
- 2.4. Выросшие на Морском Агаре 2216 изолированные колонии бактерий КММ 3900^T отсеивали бактериальной петлей в столбик с полужидким агаром.
- 2.5. В пробирки с выросшими в полужидком агаре бактериями КММ 3900^T добавляли минеральное масло и ставили на хранение при температуре плюс 6 °С.
- 2.6. Одновременно проводили контроль чистоты культуры бактерий КММ 3900^T согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Loktanella maritima* КММ 9530^T помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 15.10.2012 г. Суспензия клеток штамма КММ 9530^T хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

- 1.1. Криопробирку с суспензией клеток штамма КММ 9530^T в растворе криопротектора размораживали 15-20 мин.
- 1.2. Из криопробирки отбирали аликвоту 100 мкл суспензии клеток штамма КММ 9530^T и производили посев на питательную агаризованную среду Морской Агар 2216 в чашки Петри.
- 1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещали в термостат.
- 1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.
- 1.5. Выросшие изолированные колонии бактерий КММ 9530^T переносили в раствор криопротектора и ставят на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре минус 80 °С.
- 1.6. Бактерии КММ 9530^T дают хороший рост на твердой среде Морской Агар 2216, поэтому посев в соответствующую жидкую среду не проводили.
- 1.7. Контроль чистоты культуры проводили согласно соответствующей СОП. Чистота культуры КММ 9530^T подтверждена визуальным и микроскопическим контролем.

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

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

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

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

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

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

Штамм бактерии *Pseudoalteromonas agarivorans* КММ 255^T помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 15.10.2000 г. Суспензия клеток штамма КММ 255^T хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (MB 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

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

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

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещали в термостат.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

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

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

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

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

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

2.2. После посева чашки Петри помещают в термостат.

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

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

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

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

Штамм бактерии *Pseudomonas glareae* КММ 9500^T помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 30.10.2012 г. Суспензия клеток штамма КММ 9500^T хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

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

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

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещали в термостат.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

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

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

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

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

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

2.2. После посева чашки Петри помещали в термостат.

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

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

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

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

Штамм бактерии *Sphingomonas molluscorum* КММ 3882^T помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН 25.6.2003 г. Суспензия клеток штамма КММ 3882^T хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

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

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

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещали в термостат.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

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

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

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

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

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

2.2. После посева чашки Петри помещали в термостат.

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

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

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

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

Штамм бактерии *Cohaesibacter* sp. КММ 8009 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2009 г. Суспензия клеток штамма КММ 8009 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

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

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

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещали в термостат.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

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

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

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

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

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

2.2. После посева чашки Петри помещают в термостат.

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

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

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

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

Штамм бактерии *Roseobacter* sp. КММ 8017 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2009 г. Суспензия клеток штамма КММ 8017 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (MB 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

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

1.2. Из криопробирки отбирали аликвоту 100 мкл суспензии клеток штамма КММ 8017 и производили посев на питательную агаризованную среду морской агар 2216 в чашки Петри.

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещают в термостат.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

1.5. Выросшие изолированные колонии бактерий КММ 8017 переносили в раствор криопротектора и ставят на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре минус 80 °С.

1.6. Бактерии КММ 8017 дают хороший рост на твердой среде морской агар 2216, поэтому посев в соответствующую жидкую среду не проводили.

1.7. Контроль чистоты культуры проводят согласно соответствующей СОП. Чистота культуры КММ 8017 подтверждена визуальным и микроскопическим контролем.

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

2.1. Бактериальные клетки КММ 8017 отбирали из столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящегося на хранении при температуре плюс 6 °С, и пересевают на твердую питательную среду морской агар 2216 в чашки Петри.

2.2. После посева чашки Петри помещают в термостат.

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

2.4. Выросшие на морском агаре 2216 изолированные колонии бактерий КММ 8017 отсеивали бактериальной петлей в столбик с полужидким агаром.

2.5. В пробирки с выросшими в полужидком агаре бактериями КММ 8017 добавляли минеральное масло и ставят на хранение при температуре плюс 6 °С.

2.6. Одновременно проводят контроль чистоты культуры бактерий КММ 8017 согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Formosa* sp. КММ 8021 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2009 г. Суспензия клеток штамма КММ 8021

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

1.1. Криопробирку с суспензией клеток штамма КММ 8021 в растворе криопротектора размораживали 15-20 мин.

1.2. Из криопробирки отбирали аликвоту 100 мкл суспензии клеток штамма КММ 8021 и производили посев на питательную агаризованную среду морской агар 2216 в чашки Петри.

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещают в термостат.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

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

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

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

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

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

2.2. После посева чашки Петри помещают в термостат.

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

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

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

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

Штамм бактерии *Winogradskyella* sp. КММ 8184 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2009 г. Суспензия клеток штамма КММ 8184 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (MB 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

- 1.1. Криопробирку с суспензией клеток штамма КММ 8184 в растворе криопротектора размораживали 12-20 мин.
- 1.2. Из криопробирки отбирают аликвоту 100 мкл суспензии клеток штамма КММ 8184 и производили посев на питательную агаризованную среду морской агар 2216 в чашки Петри.
- 1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещают в термостат.
- 1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.
- 1.5. Выросшие изолированные колонии бактерий КММ 8184 переносили в раствор криопротектора и ставили на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре минус 80 °С.
- 1.6. Бактерии КММ 8184 дают хороший рост на морском агаре 2216, поэтому посев в соответствующие жидкие среды не проводили.
- 1.7. Контроль чистоты культуры проводят согласно соответствующей СОП. Чистота культуры КММ 8184 подтверждена визуальным и микроскопическим контролем.

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

- 2.1. Бактериальные клетки КММ 8184 отбирали из столбика с полужидким агаром под минеральным маслом, находящегося на хранении при температуре плюс 6 °С, и пересевают на твердую питательную среду морской агар 2216 в чашки Петри.
- 2.2. После посева чашки Петри помещают в термостат.
- 2.3. Чашки выдерживали в термостате в течение 3-4 суток до появления и сформирования колоний.
- 2.4. Выросшие на среде изолированные колонии бактерий КММ 8184 отсеивали бактериальной петлей в столбик с полужидким агаром.
- 2.5. В пробирки с выросшими в полужидком агаре бактериями КММ 8184 добавляют минеральное масло и ставят на хранение при температуре плюс 6 °С.
- 2.6. Одновременно проводят контроль чистоты культуры бактерий КММ 8184 согласно соответствующей СОП.

Штамм бактерии *Vibrio* sp. КММ 8419 помещен на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН в 2016 г. Суспензия клеток штамма КММ 8419 хранится в криопробирках с морским бульоном 2216 (МВ 2216, BD Difco) в 30% растворе глицерина при температуре минус -80 °С.

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

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

1.3. После посева инокулированные чашки Петри помещают в термостат.

1.4. Чашки выдерживали в термостате в течение 3 суток.

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

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

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

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

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

2.2. После посева чашки Петри помещают в термостат.

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

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

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

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

Всего проверено 30 штаммов грибов и бактерий.

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

