

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ  
имени Г.К. СКРЯБИНА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИБФМ РАН)

УДК 579.8

УТВЕРЖДАЮ

Номер госрегистрации: АААА-А17-117101350026-5

Инв. №



Директор ИБФМ РАН,  
чл.-корр РАН,  
доктор биологических наук

А.М. Боронин

28.12.2017

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

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

55. Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов.

ИССЛЕДОВАНИЯ И МЕРОПРИЯТИЯ, НАПРАВЛЕННЫЕ НА ПОВЫШЕНИЕ  
КАЧЕСТВА ФОНДА И УСЛУГ ВСЕРОССИЙСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ  
МИКРООРГАНИЗМОВ  
(заключительный)

Номер темы в ИСГЗ ФАНО: 0114-2017-0009

Протокол Ученого совета

№ 8 от «26» декабря 2017 г.

Научный руководитель  
Зав. Отделом Всероссийская коллекция  
микроорганизмов

доктор биологических наук

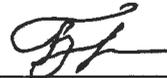
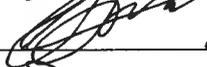
28.12.2017

Л.И. Евтушенко

подпись дата

Пушино – 2017

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель: Зав. отделом, д-р. биол. наук		<u>28.12.2017</u>	А.И. Евтушенко
Основные исполнители темы:			
Зав. лаб. мицелиальных грибов, д.б.н.		<u>28.12.2017</u>	С.М. Озерская
Руководитель сектора бактерий, к.б.н.		<u>28.12.2017</u>	Е.Б. Кудряшова
Зав. лабораторией анаэробных микроорганизмов, к.б.н.		<u>28.12.2017</u>	В.А. Щербакова
Руководитель сектора дрожжевых грибов, д.б.н.		<u>28.12.2017</u>	В.И. Голубев
Руководитель сектора актинобактерий, к.б.н.		<u>28.12.2017</u>	Л.В. Дорофеева
Рук. Сектора координации и информации, к.б.н.		<u>28.12.2017</u>	О.С. Ступарь
Ст. научный сотрудник, к.б.н.		<u>28.12.2017</u>	Е.В. Арискина
Научный сотрудник, к.б.н.		<u>28.12.2017</u>	А.Н. Автух
Научный сотрудник		<u>28.12.2017</u>	Н. В. Присяжная
Ведущий инженер		<u>28.12.2017</u>	А.Н. Василенко
Нормоконтроллер		<u>28.12.2017</u>	С.Я. Абсалямов
	подпись	дата	

## РЕФЕРАТ

Отчет 122 с., 1 ч., 5 рис., 6 табл., 50 источников, 13 прил.

### КОЛЛЕКЦИЯ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ, БИОЛОГИЧЕСКИЙ РЕСУРСНЫЙ ЦЕНТР, РАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, ТАКСОНОМИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ, БАЗЫ ДАННЫХ, СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ

Объект исследования – биоресурсная коллекция «Всероссийская коллекция микроорганизмов» (ВКМ).

Цель работы – повышение качества фонда и услуг ВКМ.

Результаты. В рамках работ по дополнительной теме государственного задания ИБФМ РАН все запланированные исследования и мероприятия выполнены в полном объеме. Подготовлен календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания. Сформирован технологический паспорт ВКМ, включающий общую информацию о ВКМ, фондах, научно-методической базе и основным функциям ВКМ как коллекции национального значения, а также перечень Стандартных операционных процедур (СОП) ВКМ и детальное описание 10 ключевых СОПов. Для 9 СОПов сформированы и представлены в рабочую группу сметы и их научно-техническое обоснование. Выполнена экспериментальная верификация 8 СОПов (на 157 штаммах микроорганизмов различных филумов и таксономических групп). Результаты верификации отражены в соответствующих электронных базах данных ВКМ, в т.ч., каталожной, и инвентаризационных журналах ВКМ. В ходе работ по проверке аутентичности и таксономической ревизии фонда ВКМ, выявлен и охарактеризован ряд новых видов и родов микроорганизмов. На основании полученных результатов подготовлены и представлены к печати в ж. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Scopus, WoS) 3 статьи по описанию новых видов бактерий и архей, из которых одна опубликована, а две приняты к публикации. Отчет о проделанной работе и Технологический паспорт ВКМ размещен на интернет-сайте организации.

Данная работа неразрывно связана с работами и исследованиями по другой теме государственного задания ИБФМ РАН – «Исследование микробного разнообразия на организменном, популяционном, структурном, геномном, функциональном уровнях и обеспечение его сохранности в коллекциях. Реализация задач по созданию Биологического ресурсного центра на основе Всероссийской коллекции микроорганизмов» (Номер Госрегистрации АААА-А16-116062110070-7).

## СОДЕРЖАНИЕ

Обозначения и сокращения	6
Введение	7
Основная часть	15
1 Общая информация о коллекции	-
2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительной темы государственного задания	16
3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование	17
4 Результаты, полученные в рамках дополнительного госзадания	-
4.1 Формирование технологического паспорта ВКМ ИБФМ РАН	-
4.2 Описание 10 стандартных операционных процедур (СОП) ВКМ	18
4.3 Расчеты и научно-техническое обоснования для 9 СОПов	-
4.4 Экспериментальная верификация СОПов ВКМ	20
4.5 Пополнение электронного каталога ВКМ информацией о штаммах микроорганизмов, охарактеризованных согласно СОП ВКМ (не менее 30 штаммов)	32
4.6 Опубликование статей сотрудников ВКМ в рецензируемых журналах	-
4.7 Другие результаты запланированных работ	33
Заключение	34
Список использованных источников	35
Приложение А Технологический паспорт ВКМ	39
Приложение Б СОП по введению штамма микроорганизма в открытый коллекционный фонд ВКМ	48
Приложение В СОП по хранению культур микроорганизмов методом субкультивирования	64
Приложение Г СОП по лиофилизации культур ВКМ с использованием разных режимов первичной и вторичной сушки	65
Приложение Д СОП по криоконсервации культур бактерий с использованием системы «Криобанк»	70
Приложение Е СОП по контролю качества (сохранности, жизнеспособности) коллекционного фонда ВКМ	73
Приложение Ж СОП по проверке качества (аутентичности) штаммов поддерживаемого фонда дрожжей и мицелиальных грибов	80

Приложение И СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда мицелиальных актиномицетов	87
Приложение К СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда бактерий и архей ВКМ	93
Приложение Л СОП по определению оптимальных методов консервации для новых штаммов при пополнении фонда ВКМ	98
Приложение М СОП по определению липидных компонентов (жирных кислот) клеток бактерий и архей	101
Приложение Н Перечень штаммов, включенных в фонд ВКМ, и информация по ним (верификация СОПа по введению культуры микроорганизма в коллекционный фонд ВКМ)	111
Приложение П Библиографический список публикаций, подготовленных в результате выполнения научно-исследовательской работы в рецензируемых журналах (Scopus, WoS)	122

## **ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ**

БРЦ – Биологический ресурсный центр

ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов

МОД – Международный орган по депонированию патентных культур, созданный на базе ВКМ в рамках обязательств страны по Будапештскому договору о взаимном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

ОЭСР – Организация по экономическому сотрудничеству и развитию

СОП – Стандартная операционная процедура

ЦКП – Центр коллективного пользования

УНУ – Уникальные научные установки

ЕССО – Европейская организация коллекций культур

WDCM – Международный центр данных по микроорганизмам

WFCC – Всемирная федерация коллекций культур

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, генетическое и биохимическое разнообразие микроорганизмов превосходит таковое растений и животных вместе взятых на порядок величин. Общее число видов прокариот может составлять около 10 миллиардов [1, 2], при этом к настоящему времени описано только около 12 тыс. видов [3]. Микробное разнообразие представляет собой практически неисчерпаемый ресурс для развития биотехнологий. Доступность хорошо охарактеризованных генетических ресурсов, поддерживаемых в коллекциях микроорганизмов, во многом определяет успехи и направления фундаментальных и прикладных исследований и разработок [2, 4, 5]. Вместе с тем, современные знания о микромире (на организменном, структурном, геномном и функциональном уровнях) и созданные технологии в значительной степени основываются на результатах изучения лишь незначительной части микробного разнообразия, поддерживаемых в различных коллекциях мира и доступных для научного сообщества и разработчиков [4, 6].

Наблюдаемый в последние годы новый импульс интереса к изучению, использованию и сохранению в коллекциях расширяющегося спектра микробного разнообразия обусловлен рядом факторов, в их числе – развитие и удешевление методов исследований, новые открытия, лежащие в основе новых конкурентоспособных технологий, а также новые вызовы и исчерпание накопленного ранее научного задела и кризиса традиционных технологий [2, 7]. Мировые технологические лидеры, а также Китай, Индия, Бразилия и ряд других стран, наращивают усилия по формированию и развитию фондов биокolleкций в рамках специальных государственных программ. На базе крупных коллекций стран с лидирующей экономикой созданы и успешно функционируют национальные Биологические ресурсные центры (БРЦ) – коллекции культур новой генерации, востребованный временем новый тип инфраструктуры, в которых концентрируются основные микробные ресурсы государств и которые обеспечивают максимально полное удовлетворение растущих потребностей науки и развивающейся биотехнологии [2, 4].

Определение БРЦ как «краеугольного камня» инфраструктуры развития биотехнологии и концепция создания БРЦ, а также руководства по организации и стандартам их деятельности, предложены ОЭСР на основе обсуждений вопроса группами международных экспертов [8, 9, 10].

Наряду с традиционными для большинства коллекций видами деятельности (формирование и сохранение фондов, предоставление биоматериалов для исследований и разработок), в перечень важнейших функций БРЦ входят обеспечение действующих

систем охраны прав интеллектуальной собственности, регистрация вновь описываемых новых видов микроорганизмов и документирование иных научных приоритетов, обеспечение биобезопасности работ с биоматериалами и др. Эти функции реализуются путем депонирования микроорганизмов в БРЦ по тем или иным правилам и обеспечения регулируемого доступа к ним [2, 4, 11, 12, 13, 14]. БРЦ играют также ключевую роль в системе защиты прав государства на использование национальных микробных биоресурсов и обеспечении выполнения международных обязательств, вытекающих из Конвенции о биологическом разнообразии (КБР) и обязующих протоколов к ней (Картахенский, Нагойский), реализуя цепочки легитимных передач штаммов микроорганизмов [15, 16, 17, 18].

Специфика деятельности и сфер ответственности БРЦ определяет необходимость адекватного информационного сопровождения биоматериалов (детальное описание депонированных штаммов микроорганизмов и их происхождения, в т.ч., в связи с вопросами КБР) и различных аспектов деятельности БРЦ, создания и развития информационных баз данных нарастающего объема и функциональности и их объединения в национальных и мировых информационных сетях коллекций, обеспечения их связи с базами данных в других областях знания (генетика, биохимия, экология и т. д.), а также мониторинга соответствующих массивов информации и нормативных документов [2, 4, 19].

Основными критериями соответствия биокolleкции статусу БРЦ, согласно ОЭСР, являются высокое качество фондов, профессиональная компетенция специалистов во всех сферах, имеющих отношение к деятельности БРЦ, развитые информационные ресурсы, наличие современной материально-технической и научно-методической базы, а также доказательство длительного устойчивого существования коллекции [8, 9, 10]. При принятии решений о сертификации/аккредитации БРЦ большое внимание уделяется вопросу аудита. Выделяется 3 уровня аудита: 1) внутренний (силами руководства БРЦ и базовой организации), 2) внешний национальный (с участием представителей ведомства, курирующего БРЦ), 3) внешний международный (с участием представителя ОЭСР или международной сети БРЦ).

Опыт использования в России международного аудита пока весьма ограничен, но его безусловно следует вводить. Такой аудит способствует существенному улучшению деятельности коллекций, претендующих на статус БРЦ, ориентируя их на уровень качества и достижений ведущих БРЦ мира, а положительные результаты аудита являются своеобразным «входным билетом» в международное сообщество профессионалов

коллекционной деятельности, свидетельствуя о готовности российских коллекций к участию в международных инфраструктурных проектах.

Концепция ОЭСР, эволюционировавшая в последние годы в связи с новыми задачами и накопленным опытом деятельности БРЦ, доказала на практике свою жизнеспособность и эффективность всюду, где была реализована. Современные БРЦ, с вместительными биохранилищами, информационными ресурсами и серьезной исследовательской базой успешно функционируют во многих странах мира [2, 4, 13].

Все успешно действующие микробные БРЦ совмещают многоплановую инфраструктурную деятельность с научными исследованиями. Ключевым направлением научной деятельности в БРЦ является изучение микробного разнообразия (таксономия, сравнительная геномика, биоинформатика и т.д.), развитие стратегии и методов классификации и идентификации микроорганизмов. Это обусловлено как возрастающими требованиями к точности документирования природных и генно-модифицированных микроорганизмов (с использованием методов высокого разрешения), имеющими прямое отношение к различным инфраструктурным функциям БРЦ, так и уникальными возможностями БРЦ (концентрация типовых и референтных штаммов, а также ведущих микробиологов-систематиков) [2, 4, 12, 13]. Опыт исследований и наличие современной материально-технической базы способствуют, в свою очередь, увеличению объема и качества предоставляемых БРЦ наукоемких сервисных услуг, преимущественно таксономического характера (высоко востребованных пользователями коллекций, в том числе, специалистами, не имеющими опыта работ в таксономии микроорганизмов – высокоспециализированной и динамично развивающейся области) [2, 4, 12].

Мировая практика убедительно демонстрирует, что все наиболее эффективные национальные БРЦ – это самостоятельные организации (DSMZ, Германия; CBS, Голландия; JCM и NBRC, Япония) или подразделения в составе одной организации (CIP, коллекция Пастеровского института, Франция), несущие полную ответственность за качество фондов, вопросы биобезопасности и выполнение всех других возложенных на БРЦ функций. По такой же модели создаются и действуют БРЦ в странах с «догоняющей экономикой» (Япония, Китай, Тайвань, Южная Корея и др.). Очевидно, что именно этот образец должен быть взят за основу создания БРЦ и в России – в соответствии с положительным международным опытом и положениями Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 г. (детальнее изложено ниже).

В этой связи можно упомянуть, что в мире имеется лишь один пример успешного «сетевого БРЦ» микроорганизмов – Консорциум коллекций микроорганизмов Бельгии

(ВССМ), который состоит из 7 коллекций культур, действующих на базе разных университетов/организаций Бельгии. Работу консорциума коллекций этой небольшой по территории страны координируют специалисты мирового уровня в области генетических ресурсов и коллекционного дела в составе Бельгийского Федерального управления по научной политике (некий аналог Госкомитета СССР по науке и технике).

Помимо национальных БРЦ, вовлеченных в решение задач общегосударственного масштаба (формирование национального фонда генетических ресурсов, защита прав интеллектуальной собственности, документирование научных приоритетов, выполнение международных конвенций и договоров, защита прав государства на использование национальных микробных биоресурсов и т. д.) в странах ОЭСР функционируют коллекции микроорганизмов меньшего масштаба (при ведомствах, университетах, коммерческих компаниях и т. д.), обеспечивающие выполнение специализированных задач и функций организаций и ведомств.

В ФАНО России и в Российской Федерации в целом с поддержанием коллекционных фондов микроорганизмов связана деятельность большого числа лабораторий научно-исследовательских организаций, ВУЗов и коммерческих структур, находящихся под управлением различных государственных ведомств и хозяйствующих субъектов. Фонды и масштабы деятельности этих коллекций существенно различаются, варьируя от удовлетворения текущих потребностей лаборатории или организаций в биоматериалах (большинство коллекций) до обеспечения выполнения государством регулятивных и охранительных функций в сфере оборота генетических ресурсов на национальном и международном уровнях (единичные коллекции) [5, 20, 21, 22]. В целом, однако, состояние биологических коллекций в России можно охарактеризовать как «углубляющееся отставание» от мировых технологических лидеров. Причина тому – многолетнее недофинансирование, и, как следствие – отсутствие современной материально-технической базы и острая нехватка кадров. Не способствует развитию и правовая неурегулированность деятельности коллекций.

Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 г., утвержденная В.В. Путиным в 2012 г., впервые на государственном уровне обозначила пути решения задач по созданию в стране эффективной инфраструктуры в области биотехнологии, включающих, в том числе, организацию БРЦ на базе крупнейших коллекций и развитие информационной сети биоресурсных коллекций, а также совершенствование нормативно-правовых аспектов деятельности коллекций [5]. Мероприятие «Создание биоресурсных центров по итогам проведенной инвентаризации биологических коллекций...» обозначено также в Плане мероприятий

(«Дорожной карте») «Развитие биотехнологий и генной инженерии» [23], концептуально увязанном с Комплексной программой.

Основанные на анализе вопроса комиссиями экспертов, положения Комплексной программы и Плана мероприятий, относящиеся к биоколлекциям, по-прежнему актуальны и полностью созвучны ряду других правительственных документов последних лет [24, 25, 26, 27], в том числе, Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации на 2017-2019 годы [26] и Плану мероприятий по ее реализации [27], в которых предусмотрено создание конкурентоспособного на мировом уровне российского сектора исследований и разработок, предполагающего наличие развитой научной инфраструктуры.

В процессе реализации положений Комплексной программы и «Дорожной карты» группами экспертов предложено отнести все действующие микробные коллекции (фонды и результаты деятельности которых востребованы или могут быть востребованы в интересах развития науки и технологий) к 3-м категориям: (I) Центры микробных биоресурсов федерального значения – национальные БРЦ (аналоги действующих национальных БРЦ в странах ОЭСР); (II) Специализированные центры микробных биологических ресурсов; (III) Исследовательские коллекции [22, 28, 29]. Очевидно, что можно выделить и 4-ю группу коллекций – производственные.

Принадлежность коллекции к той или иной категории, и, соответственно, объем и механизмы ее финансирования, определяются комиссиями экспертов с учетом законодательных актов, а также результатов оценки коллекций (инвентаризации) по таким показателям, как объем и качество фондов, наличие доступных он-лайн каталогов, уровень развития информационных ресурсов, масштаб и специфика решаемых задач и выполняемых инфраструктурных функций, опыт и результативность предшествующей деятельности, квалификация персонала, профессиональная репутация в стране и мире, востребованность научным сообществом, производителями и государственными структурами результатов коллекционной деятельности (фондов, информационных ресурсов, сервисных услуг и т. д.) [30]. Согласно мнений экспертов, Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ) находится в числе кандидатов для ее трансформации в национальный БРЦ.

Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ) – профессиональная коллекция микроорганизмов федерального уровня, созданная по решению Президиума АН СССР № 942 от 25 сентября 1980. Является коллекцией национального значения (Постановление Правительства РФ «О мерах по сохранению и рациональному использованию коллекций микроорганизмов» от 24.06.96). С 1987 года ВКМ выполняет функции Международного органа по депонированию (МОД) защищенных патентами культур – в рамках обязательств

страны по Будапештскому договору о взаимном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры [11] (Распоряжение Совета министров СССР № 1112р от 02.06.86г.; нотификация статуса МОД Всемирной организацией интеллектуальной собственности – World Intellectual Property Organization, No 63 от 28.07.1987). Является признанным на международном уровне центром депонирования типовых штаммов вновь описываемых новых видов.

ВКМ сегодня – крупнейшая коллекция микроорганизмов России по показателю таксономического разнообразия (более 800 родов и 3300 видов), и одна из крупнейших по общей численности (более 21000 поддерживаемых культур) [31]. Входит в первую десятку коллекций мира по разнообразию ряда групп (грибов, дрожжей и актинобактерий ([gcm.wfcc.info/](http://gcm.wfcc.info/)). Включает более 2500 типовых (эталонных) штаммов видов, более 850 объектов интеллектуальной собственности, а также другие культуры с уникальными свойствами и биотехнологическим потенциалом. В ВКМ поддерживается также большое число культур, пока не идентифицированных в соответствии с современной системой, в их числе представители пока не описанных новых родов и видов. Коллекция включает генетически модифицированные штаммы, микроорганизмы 3-й и 4-й групп патогенности согласно классификации СП 1.3.2322-08 [32], штаммы категории «возникающие патогены» («*emerging pathogens*»), «экопатогены» и др. (Лицензия на работы с микроорганизмами 3-4-й групп патогенности имеется).

За период 2017 г. фонд ВКМ пополнен 340 новыми штаммами; основной (каталожный) фонд ([www.vkm.ru](http://www.vkm.ru)) увеличен на 188 культур (72 рода и более чем 70 видов). Среди них 20 родов и 33 вида, которые ранее не были представлены в коллекции. Помещенные в фонд ВКМ культуры выделены из различных мест обитания, в т.ч., почв Антарктиды, Камчатки и острова Кунашир, месторождений ртути и никеля, краснокнижных растений, таллома лишайников, ассоциантов нематод, микробиома домашних птиц, носоглотки и кишечника человека и т. д.

Согласно доступной информации, ВКМ наиболее продвинута среди российских коллекций в области развития информационных ресурсов и их взаимодействия с существующими и создаваемыми базами данных и сетями БРЦ Европы и мира в т.ч., в рамках совместных научных проектов [30, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42]. Каталожная база данных ВКМ интегрирована в международную систему по штаммам микроорганизмов Straininfo ([www.straininfo.net](http://www.straininfo.net)) и Глобальный электронный каталог микроорганизмов ([gcm.wfcc.info/](http://gcm.wfcc.info/)). ВКМ лидирует среди микробных коллекций страны и сопоставима с ведущими зарубежными БРЦ, в том числе DSMZ (Германия) и CBS (Голландия), по спектру наукоемких научно-сервисных услуг, обычно предоставляемых

коллекциями. ВКМ – коллективный член Европейской организации коллекций культур – ЕССО [43], Всемирной федерации коллекций культур – WFCC [6] и Международного центра данных по микроорганизмам – WDCM (44), действующего под эгидой WFCC.

Фонд, научно-сервисные и информационные услуги ВКМ востребованы широким кругом организаций различной сферы деятельности, географии и форм собственности. За период 15.11.2016–15.11.2017 заключен 161 договор с учреждениями ФАНО России, Минобрнауки России, Роспотребнадзора, РАН, а также коммерческих структур из 59 субъектов РФ, на предоставление штаммов микроорганизмов и выполнение других работ (депонирование штаммов в связи с патентной процедурой, идентификацию микроорганизмов, определение грибостойкости и т.д.). Предоставлено по запросам российских и зарубежных пользователей более 500 штаммов (представителей более 140 родов и более 300 видов).

ВКМ лидирует среди отечественных микробных коллекций по цитированию штаммов фонда в публикациях и числу ссылок на штаммы в международных базах данных. В неполной (формируемой) базе данных RusLine (по использованию штаммов ВКМ в публикациях) в настоящее время зарегистрировано более 6,6 тыс. единиц библиографии. Согласно заключению комиссии экспертов ФАНО, оценивавшей результативность центров коллективного пользования (2015 г.), ВКМ вошла в число высокоэффективных ЦКП по направлению «Науки о жизни» [45].

Настоящий Отчет (заключительный) по дополнительной теме «Исследования и мероприятия, направленные на повышение качества фонда и услуг Всероссийской коллекции микроорганизмов» является кратким обобщением основных результатов работ, полученных в III-IV кварталах 2017 г. в рамках мероприятий по инвентаризации и развитию биоресурсных коллекций научными организациями, подведомственными ФАНО России, в соответствии с разработанным и утвержденным планом:

- Формирование технологического паспорта ВКМ ИБФМ РАН и его размещение на интернет-сайте ВКМ ИБФМ РАН.
- Описание не менее 8 ключевых стандартных операционных процедур (СОП ВКМ), обеспечивающих развитие и поддержание коллекционного фонда ВКМ ИБФМ РАН.
- Формирование смет и их научно-технического обоснования для стандартных операционных процедур ВКМ (не менее 8).
- Экспериментальная верификация СОПов ВКМ ИБФМ и запись результатов верификации в соответствующие базы данных ВКМ:

1) СОП по введению культуры микроорганизма в коллекционный фонд ВКМ, верифицированный на 30 штаммах;

- 2) СОП по криоконсервации бактерий и дрожжей, верифицированный на 30 штаммах;
  - 3) СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда бактерий и архей, верифицированный на 30 штаммах;
  - 4) СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда мицелиальных актиномицетов, верифицированный на 30 штаммах;
  - 5) СОП по проверке качества (аутентичности) штаммов поддерживаемого фонда дрожжей и мицелиальных грибов, верифицированный на 30 штаммах;
  - 6) СОП по определению оптимальных методов консервации для новых штаммов при пополнении фонда культур ВКМ ИБФМ РАН, верифицированный на 30 штаммах;
  - 7) СОП по контролю качества сохранения коллекционного фонда ВКМ ИБФМ РАН, верифицированный на 30 штаммах;
  - 8) СОП для идентификации липидных компонентов клеточной стенки, верифицированный на 5 штаммах.
- Пополнение электронного каталога ВКМ информацией о не менее 30 штаммах микроорганизмов, охарактеризованных согласно СОП ВКМ.
  - Подготовка двух рукописей статей для публикации в рецензируемых журналах (Scopus, WoS), на основе материалов коллекции, одна из которых должна быть принята в печать.
  - Регистрация ВКМ на электронном ресурсе Сетевого центра Коллекций микроорганизмов ФАНО России.
  - Размещение отчета о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания на интернет-сайте организации с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### 1 Общая информация о коллекции

1.1 Название коллекции: Всероссийская коллекция микроорганизмов

1.2 Наименование организации ФАНО России – держателя коллекции: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН), Пушкино (Институт в стадии реорганизации).

1.3 Регистрационный номер биоресурсной коллекции в информационной системе «Парус» ФАНО России: 114.

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

1.4 Положение о коллекции утверждено: Постановлением Президиума АН СССР № 942 от 25 сентября 1980 г., Постановлением Президиума РАН № 233 от 1 июля 2003 г., Приказом директора ИБФМ РАН № 1 от 14 января 2014 г.

1.5 Руководитель подразделения, поддерживающего коллекцию: Евтушенко Людмила Ивановна, зав. отделом «Всероссийская коллекция микроорганизмов», д.б.н., [evtushenko@ibpm.pushchino.ru](mailto:evtushenko@ibpm.pushchino.ru), [lie99@mail.ru](mailto:lie99@mail.ru); +7 (496)773-09-24; +7 (905)743-96-26.

1.6 Назначение коллекции: центр сбора, изучения, поддержания и предоставления широкого спектра микроорганизмов, информации о них и наукоемких сервисных услуг для научных, образовательных, производственных организаций и государственных структур на всей территории Российской Федерации; функционирование в качестве Международного органа по депонированию микроорганизмов для целей патентной процедуры в связи с подписанием страной Будапештского договора. (Приложения к Постановлению Президиума АН СССР № 942 от 25 сентября 1980 г. и Постановлению Президиума РАН № 233 от 1 июля 2003 г.; Указ Президиума Верховного Совета СССР от 24 декабря 1980 года № 3615-Х).

1.7 Регистрация коллекции в перечне ЦКП/УНУ на портале "Современная исследовательская инфраструктура Российской Федерации" (<http://www.ckp-rf.ru>): Есть.

1.8 Наименование, реестровый номер и адрес ЦКП/УНУ на сайте <http://www.ckp-rf.ru>: УНУ "Всероссийская коллекция микроорганизмов", No 73546, <http://www.ckp-rf.ru/usu/73546/>; ЦКП "Всероссийская коллекция микроорганизмов", No 74752, <http://www.ckp-rf.ru/ckp/74752/>.

1.9 Дата образования и учредитель коллекции: 25.09.1980, АН СССР (Постановление Президиума АН СССР № 942).

1.10 Отражение коллекционной деятельности в Уставе организации: Есть.

Пункт 15. «В составе Института на правах отдела функционирует Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), являющаяся уникальной научной установкой (УНУ) и центром коллективного пользования (ЦКП), руководствующаяся в своей деятельности законодательством Российской Федерации и международными договорами, а также настоящим Уставом».

Пункт 21.7. «Осуществление деятельности Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) в части оказания услуг и выполнения работ по следующим направлениям:

- депонирование штаммов микроорганизмов (в том числе в связи с национальным патентованием; в связи с публикацией материалов по штамму в научных изданиях; по правилам Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры (Будапешт, 28 апреля 1977 г.); на условиях открытого доступа);
- конфиденциальное хранение, идентификация, лиофилизация и определение таксономических характеристик штаммов микроорганизмов;
- предоставление образцов штаммов микроорганизмов, находящихся в открытом и закрытом фонде;
- оформление паспорта на штамм микроорганизма и выдача копий документов и выписок из документов».

1.11 Положение о ВКМ утверждено Постановлениями Президиума АН СССР № 942 от 25 сентября 1980 г. и Президиума РАН № 233 от 1 июля 2003 г. Последняя редакция Положения о ВКМ, утвержденная на Ученом совете организации – 14 января 2014г.(Выписка № 1 из протокола заседания Ученого совета № 1 от 14 января 2014г.).

1.12 Адреса основных WEB-сайтов, на которых представлена информация о коллекции. Сайт ВКМ: [www.vkm.ru](http://www.vkm.ru); сайт организации: [http://ibpm.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=249:vkm&catid=4&Itemid=15](http://ibpm.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=249:vkm&catid=4&Itemid=15).

1.13 Адреса иных WEB-сайтов, на которых представлена информация о ВКМ: <http://gcm.wfcc.info/cclist>, <http://gcm.wfcc.info/StatisticgraphServlet> – сайт Международного центра данных по микроорганизмам (WDCM) Всемирной федерации коллекций культур (WFCC), Глобальный каталог микроорганизмов (WFCC Global Catalogue of Microorganisms, GCM).

2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительной темы госзадания

2.1 Текст Отчета представлен на:

- WEB-сайте организации: - WEB-сайте организации:

[http://ibpm.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=249:vkm&catid=4&Itemid=15](http://ibpm.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=249:vkm&catid=4&Itemid=15)

- Информационном портале БРК: <http://brk.forge.sccc.ru/kollekcii/kollekcii-mikroorganizmov/vserossiyskaya-kollekciya-mikroorganizmov-biotehnologicheskogo>

2.2 Содержание основных результатов работы по дополнительному госзаданию в соответствии с ПФНИ ГАН: ряд положений, в т.ч., **«поиск новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии, исследование их генетики и метаболизма»**, «исследование микробных сообществ вечномерзлых почв тундровой зоны Арктики»; «исследование новых ризосферных, филлосферных и эндофитных штаммов бактерий.....»; «исследование физиологии, биохимии и биотехнологического потенциала мицелиальных грибов»; «разработка ... технологий сохранения и рационального использования биоресурсов»; «создание ... баз данных по биоразнообразию....».

3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование

3.1 Регистрационный номер дополнительной темы госзадания ИБФМ РАН по БРК в информационной системе ПАРУС ФАНО России: 0114-2017-009.

3.2 Регистрационный номер дополнительной темы госзадания ИБФМ РАН по БРК в информационной системе ЦИТИС: АААА-А17-117101350026-5.

3.3 Отчет по дополнительному госзаданию будет подготовлен и загружен в систему Парус, с предоставлением дополнительной информации о дате загрузки.

3.4 Отчет по дополнительному госзаданию будет также загружен в систему ЦИТИС, с предоставлением с предоставлением дополнительной информации о дате загрузки.

3.5 Объем финансирования, выделенного на выполнение ДГЗ из средств ФАНО России в 2017 году – 4000,3 тыс. руб., Соглашение № 007-03-25.

3.6 Объем финансирования, выделенного на приобретение крупного оборудования из средств ФАНО России в 2017 г. – 8232,7546 тыс. руб., Соглашение № 007-02-1890 от 12.09.2017.

4 Результаты, полученные в рамках дополнительной темы госзадания

4.1 Формирование технологического паспорта ВКМ ИБФМ РАН.

Технологический паспорт сформирован и размещен на интернет-сайте организации [http://ibpm.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=249:vkm&catid=4&Itemid=15](http://ibpm.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=249:vkm&catid=4&Itemid=15).

Техпаспорт включает информацию по следующим разделам: а) общие положения;

б) основные функции ВКМ как коллекции национального значения; в) фонд ВКМ;

г) информационные ресурсы ВКМ; д) материально-техническая и научно-методическая

базы ВКМ; е) стандартные операционные процедуры (СОП) ВКМ, обеспечивающие стандартизацию, качество и эффективность работ по выполнению ряда основных функций ВКМ. Полное описание Технологического паспорта дано в Приложение А.

#### 4.2 Описание 10 стандартных операционных процедур ВКМ.

Подготовлены описания 10 стандартных операционных процедур (СОП) из ключевых СОП ВКМ, обеспечивающих развитие и поддержание коллекционного фонда (Приложения Б–М):

- СОП по введению штамма микроорганизма в коллекционный фонд ВКМ (Приложение Б),
- СОП по хранению культур микроорганизмов методом субкультивирования (Приложение В),
- СОП по лиофилизации культур ВКМ с использованием разных режимов первичной и вторичной сушки (Приложение Г),
- СОП по криоконсервации культур бактерий с использованием системы «Криобанк» (Приложение Д),
- СОП по контролю качества (сохранности, жизнеспособности) коллекционного фонда ВКМ (Приложение Е),
- СОП по проверке качества (аутентичности) штаммов поддерживаемого фонда дрожжей и мицелиальных грибов (Приложение Ж),
- СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда мицелиальных актиномицетов (Приложение И),
- СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда бактерий и архей ВКМ (Приложение К),
- СОП по определению оптимальных методов консервации для новых штаммов при пополнении фонда ВКМ (Приложение Л),
- СОП по определению липидных компонентов (жирных кислот) клеток бактерий и архей (Приложение М).

#### 4.3 Расчеты и научно-техническое обоснования для 9 СОПов.

Для обоснования смет стандартных операционных процедур и расчета общей стоимости работ, обеспечивающих поддержание и развитие фонда ВКМ были собраны данные об оплате труда, приобретении материалов, расходах на содержание оборудования, коммунальных и иных затратах, необходимых для выполнения работ (таблица 1).

Собранные данные были использованы для расчета – в качестве примера – стоимости выполнения 9 СОПов: по введению (документальному сопровождению введения) штамма микроорганизма в коллекционный фонд, по хранению культур микроорганизмов методом субкультивирования (таблица 2), по лиофилизации культур ВКМ с использованием разных режимов первичной и вторичной сушки, по криоконсервации культур бактерий с использованием системы «Криобанк», по контролю качества (сохранности жизнеспособности) коллекционного фонда ВКМ; по проверке качества (аутентичности) штаммов поддерживаемого фонда дрожжей и мицелиальных грибов; по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда мицелиальных актиномицетов; по определению оптимальных методов консервации для новых штаммов при пополнении фонда ВКМ; по определению липидных компонентов (жирных кислот) клеток бактерий и архей. Расчеты и научно-техническое обоснования для 9 СОПов представлены в рабочую группу.

Таблица 1 - Пример расчета величины накладных расходов за 12 месяцев.

Тип затрат	Сумма (руб.)
Оплата труда	2 847 133,16
Приобретение материалов	120 594,50
Иные затраты	334 514,00
Затраты на содержание оборудования	106 396,08
Коммунальные услуги	2 553 173,23
Итого:	5 961 810,98

Таблица 2 - Пример расчета СОП по хранению культур методом субкультивирования (на 1 единицу хранения – пробирку с живой культурой).

Тип затрат	Сумма (руб.)
Оплата труда	315,09
Приобретение материалов	152,91
Иные затраты	0,0
Затраты на содержание оборудования	96,51
Итого:	564,51
Итоговая сумма (с учетом объема работ за год - 3125 штаммов x 2 пробирки):	3 528 165,0 руб.

С учетом ежегодных объемов работ ВКМ по поддержанию и развитию фонда ВКМ (определено на основе показателей за 2016-2017г.г.), итоговый объем требуемого годового финансирования коллекции на 2018г. только для работ по 9 вышеуказанным СОПам (из 50 активных СОПов ВКМ, см. Приложение А, Техпаспорт ВКМ) должен быть более 38 млн. руб. (из расчета 23907949 руб. на выполнение работ по 9 вышеуказанным СОПам, 8523036 руб. на выполнение НИР по развитию, и 5961811 руб. для обеспечения накладных расходов на работу коллекции, всего 38392796 руб.).

Расчеты проводились в соответствии моделью и методикой оценки, предложенными ИЦиГ СО РАН в рамках выполнения дополнительного государственного задания по теме: «Разработка модели финансового управления сохранением и рациональным использованием биоресурсов в рамках функционирования биоресурсных научных коллекций» ([http://www.biores.cytogen.ru/brc\\_finance/report](http://www.biores.cytogen.ru/brc_finance/report)). Полный набор данных представлен на Информационном портале «Биоресурсные коллекции ФАНО России» [http://www.biores.cytogen.ru/brc\\_finance/collections/2](http://www.biores.cytogen.ru/brc_finance/collections/2)

#### 4.4 Экспериментальная верификация СОПов ВКМ

4.4.1 Верификация СОП по введению культуры микроорганизма в коллекционный фонд ВКМ (на 32-х штаммах).

За отчетный период в фонд ВКМ введено 32 штамма, представителя 21 рода и 24 видов (Приложение М). В их числе 12 штаммов, относившихся к ранее не представленным в ВКМ родам (*Cytospora*, *Mammaria*, *Paraphoma*, *Phaeosphaeria*) и видам (*Cadophora luteo-olivacea*, *Cosmospora berkeleyana*, *Cytospora* sp., *Exophiala xenobiotica*, *Fusicladium peltigericola*, *Mammaria echinobotryoides*, *Paraphoma fimeti*, *Phaeosphaeria* sp., *Venturia tremulae*). Включенные в фонд штаммы выделены из уникальных местообитаний, в том числе, из антарктических почв с разной антропогенной нагрузкой, болотных экосистем, из строительных материалов.

Идентификация всех принятых в фонд культур была проведена на основании анализа фенотипических характеристик и результатов, полученных молекулярно-генетическими методами исследований.

Информация внесена в каталожную базу данных ВКМ (на русском и английском языках), доступна на сайте ВКМ в формате каталога (<http://www.vkm.ru/Catalogue.htm>).

#### 4.4.2 Верификация СОПов по криоконсервации культур микроорганизмов.

СОПы по криоконсервации культур микроорганизмов (бактерий и дрожжей) были верифицированы на 30 штаммах (всего 43 образца), закладываемых на хранение с использованием различных методов криоконсервации и, соответственно, 3-х СОПов: СОП по криоконсервации культур бактерий и дрожжей в жидком азоте (21 штамм); СОП криоконсервации культур бактерий на глауконите (10 штаммов); СОП по криоконсервации культур бактерий на пористых бусинах (система «Криобанк») (12 штаммов) (таблица 3).

Таблица 3 - Список штаммов, заложенных на хранение различными методами криоконсервации (всего 43 образца) в соответствии с СОПами ВКМ.

Криоконсервация в жидком азоте (-196°C)		
1	ВКМ Ас-2033 D	<i>Nocardioides</i> sp.
2	ВКМ Ас-2727 D	<i>Cellulomonas persica</i>
3	ВКМ Ас-2729 D	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
4	ВКМ Ас-2731 D	<i>Microbacterium aerolatum</i>
5	ВКМ Ас-2734 D	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
6	ВКМ Ас-2766 D	<i>Streptomyces</i> sp.
7	ВКМ Ас-2768 D	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>
8	ВКМ Ас-2769 D	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>
9	ВКМ Ас-2770	<i>Bifidobacterium longum</i>
10	ВКМ Ас-2777 D	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
11	ВКМ Ас-2778 D	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
12	ВКМ Ас-2779 D	<i>Rhodococcus qingshengii</i>
13	ВКМ Ас-2780 D	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
14	ВКМ Ас-2781 D	<i>Arthrobacter</i> sp.
15	ВКМ Ас-2782	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i>
16	ВКМ Ас-2783	<i>Bifidobacterium longum</i>
17	ВКМ В-2110	<i>Methylomonas methanica</i>
18	ВКМ В-2978	<i>Chloroflexus islandicus</i>
19	ВКМ В-2111	<i>Methylobacter bovis</i>
20	ВКМ В-2426	<i>Methylocystis heyeri</i>
21	ВКМ В-3208	<i>Edaphobacter lichenicolum</i>
Криоконсервация на глауконите (-70°C)		
22	ВКМ В-2599	<i>Singulisphaera rosea</i>
23	ВКМ В-2426	<i>Methylocystis heyeri</i>
24	ВКМ В-3208	<i>Edaphobacter lichenicolum</i>
25	ВКМ В-2398 Т	<i>Polaromonas hydrogenivorans</i>
26	ВКМ В-2721	<i>Belliella buryatense</i>
27	ВКМ В-2722	<i>Belliella buryatense</i>
28	ВКМ В-2723	<i>Belliella</i> sp.
29	ВКМ В-2724 Т	<i>Belliella buryatense</i>
30	ВКМ В-2892 Т	<i>Azospirillum halopraeferans</i>
31	ВКМ В-3161 Т	<i>Thermogemmata polysaccharidolytia</i>
Криоконсервация на пористых бусинах (система «Криобанк») (-70°C)		
32	ВКМ В-3151	<i>Thermaerobacter baikalensis</i>
33	ВКМ В-2978 <sup>1</sup>	<i>Chloroflexus islandicus</i>
34	ВКМ В-2488	<i>Acidisoma tundrae</i>
35	ВКМ В-2599	<i>Singulisphaera rosea</i>
36	ВКМ В-3208	<i>Edaphobacter lichenicolum</i>
37	ВКМ В-2398 Т	<i>Polaromonas hydrogenivorans</i>
38	ВКМ В-2721	<i>Belliella buryatense</i>
39	ВКМ В-2722	<i>Belliella buryatense</i>
40	ВКМ В-2723	<i>Belliella</i> sp.
41	ВКМ В-2724 Т	<i>Belliella buryatense</i>
42	ВКМ В-2892 Т	<i>Azospirillum halopraeferans</i>
43	ВКМ В-3161 Т	<i>Thermogemmata polysaccharidolytia</i>

4.4.3 Верификация СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда ВКМ бактерий и архей.

Верификация проведена на 30-ти штаммах, заложенных на хранение разными методами (лиофилизация с использованием различных протекторов и криоконсервация при  $-70^{\circ}\text{C}$  с глицерином в качестве протектора, а также на носителях – глауконит, стеклянные бусины) в разные периоды времени в 2000-2016 г.г.:

1) лиофилизация (представители Домена “Bacteria”):

а) в сепарированном молоке в качестве криопротектора (Л-1)

ВКМ В-610 *Xanthomonas campestris*,  
ВКМ В-618 *Xanthomonas vasicola*,  
ВКМ В-620 *Xanthomonas arboricola*,  
ВКМ В-627 *Xanthomonas perforans*,  
ВКМ В-3209 Т *Methylobacterium nudulans*,  
ВКМ В-3210 Т *Ancylobacter polymorphus*,  
ВКМ В-3211 Т *Ancylobacter rudongensis*,

б) в сахарозо-желатиновом агаре в качестве протектора (Л-3)

ВКМ В-736 *Brevibacillus laterosporus*  
ВКМ В-737 *Brevibacillus laterosporus*  
ВКМ В-955 *Brevibacillus laterosporus*  
ВКМ В-959 *Brevibacillus laterosporus*  
ВКМ В-3185 *Acinetobacter lwoffii*,  
ВКМ В-3187 *Acinetobacter johnsonii*,  
ВКМ В-3190 *Acinetobacter baumannii*,  
ВКМ В-3204 *Acinetobacter baylyi*,

2) криоконсервация при  $-70^{\circ}\text{C}$  (представители Домена “Archaea”):

а) с 10% глицерином в качестве протектора

ВКМ В-1629 *Methanobacterium bryantii*,  
ВКМ В-2198 *Methanobacterium* sp.  
ВКМ В-2199 *Methanosarcina* sp.  
ВКМ В-2277 *Methanosarcina thermophile*,  
ВКМ В-2278 *Methanosarcina thermophile*,  
ВКМ В-2371 *Methanobacterium arcticum*,  
ВКМ В-2440 *Methanobacterium veterum*,  
ВКМ В-2471 *Acidilobus saccharovorans*,  
ВКМ В-3178 *Methanotherix soehngenii*,

ВКМ В-3179 *Methanococcus vanielii*,

ВКМ В-3180 *Thermophilum* sp

б) на носителях (бусинах), система «криобанк»

ВКМ В-2599 *Singulisphaera rosea*,

ВКМ В-3208 “*Edaphobacter lichenicola*” sp. nov.,

в) на носителях (глауконите)

ВКМ В-3208 “*Edaphobacter lichenicola*” sp. nov.,

ВКМ В-2978 *Chloroflexus islandicus*.

Оживление штаммов проводилось с учетом способа хранения и условий культивирования тестируемых микроорганизмов. Лиофилизированные культуры и культуры, хранящиеся на стеклянных бусинах (система «криобанк»), высевали методом истощающего штриха на чашку Петри с агаризованной питательной средой, указанной для каждого конкретного штамма в он-лайн каталоге ВКМ на сайте <http://www.vkm.ru/Catalogue.htm>). Высев штаммов, хранящихся методами криоконсервации с глицерином и на глауконите, производили в колбу или пробирку с соответствующей жидкой питательной средой, указанной для данного штамма на сайте ВКМ. Инокуляция облигатных анаэробных культур проведена с помощью шприца в пробирки с завинчивающейся пробкой, полностью заполненные средой.

После необходимого для каждого штамма срока культивирования проведена оценка жизнеспособности, чистоты и аутентичности – на основании анализа культурально-морфологических признаков в сравнении с паспортными данными штамма, а также характеристикой соответствующего вида, приведенной в «Определителе Берги» (Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology) и статьях по описанию целевого микроорганизма.

Характер роста штаммов, выращенных в чашках Петри, оценивали по таким показателям, как однотипность колоний, их цвет, форма, размер, поверхность, профиль, край, структура, консистенция, прозрачность, наличие блеска и наличие пигмента, выделяемого в среду. Штаммы, выращенные в жидких питательных средах, оценены по степени помутнения, характеру осадка, особенности пленки.

Для всех штаммов выполнено микроскопирование препарата «раздавленная капля» с использованием фазово-контрастного устройства. Обращали внимание на однотипность клеток, форму, размер, наличие спор (форма спор, спорангия, диаметр спор, расположение спор в клетке), на подвижность и характер движения, наличие включений и характерных для вида морфологических форм.

Далее был проведен анализ МАЛДИ масс-спектров штаммов с использованием соответствующего СОП. Масс-спектры были сопоставлены со спектрами, имеющимися

для целевых штаммов в базе данных масс-спектров ВКМ или для штаммов/ видов в базе данных производителя.

По результатам проверки кураторами был сделан вывод об аутентичности (и высокой жизнеспособности) всех проверенных штаммов.

4.4.4 Верификация СОПа по проверке качества (аутентичности) мицелиальных актиномицетов фонда ВКМ.

Верификация СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда мицелиальных актиномицетов ВКМ была проведена на 30-ти штаммах актиномицетов родов *Amycolatopsis*, *Saccharopolyspora*, *Saccharothrix*, *Streptomyces* и *Micromonospora*. заложенных на длительное хранение разными методами в разные периоды времени, в их числе:

1) лиофилизация в сепарированном молоке (Л-1) в качестве протектора:

ВКМ Ac-1275T *Streptomyces violascens*  
ВКМ Ac-838T *Streptomyces alboniger*  
ВКМ Ac-902T *Streptomyces hiroshimensis*  
ВКМ Ac-1312 *Streptomyces violaceoruber*  
ВКМ Ac-831T *Streptomyces hygrosopicus*  
ВКМ Ac-1755T *Streptomyces bottropensis*  
ВКМ Ac-627T *Streptomyces plicatus*  
ВКМ Ac- 1290T *Streptomyces nogalater*  
ВКМ Ac-1766T *Streptomyces nashivillensis*  
ВКМ Ac-483 *Streptomyces griseus*  
ВКМ Ac-760 *Streptomyces griseus*  
ВКМ Ac-800T *Streptomyces griseus*  
ВКМ Ac-830 *Streptomyces griseus*  
ВКМ Ac-179T *Streptomyces globisporus*  
ВКМ Ac-1846T *Streptomyces globisporus*  
ВКМ Ac-841 *Streptomyces scabiei*  
ВКМ Ac-321T *Streptomyces sporoverrucosus*  
ВКМ Ac-576T *Streptomyces coeruleorubidus*  
ВКМ Ac-617T *Streptomyces glaucescens*  
ВКМ Ac-928T *Streptomyces mobaraensis*  
ВКМ Ac-1178T *Streptomyces lavendulae*  
ВКМ Ac-2009T *Micromonospora matsumotoense*

ВКМ Ac-1082 *Micromonospora* sp.  
ВКМ Ac-810T *Saccharopolyspora recti*  
ВКМ Ac-666T *Saccharopolyspora hursita*  
ВКМ Ac-866T *Amycolatopsis orientalis*  
ВКМ Ac-1242T *Amycolatopsis lurida*  
ВКМ Ac-907T *Saccharothrix longispora*

2) криоконсервация в жидком азоте при -196°C:

ВКМ Ac-1473 *Saccharothrix* sp.  
ВКМ Ac-1757 *Saccharothrix* sp.  
ВКМ Ac-1471 *Saccharothrix* sp.  
ВКМ Ac-880 *Streptomyces hiroshimensis*  
ВКМ Ac-1317T *Micromonospora olivasterospora*

Каждую из лиофилизированных культур высевали на чашку Петри с агаризованной питательной средой, подходящей для культивирования (среды для каждого штамма указаны в он-лайн каталоге ВКМ на сайте <http://www.vkm.ru/Catalogue.htm>). Высев производили методом истощающего штриха. Культуры, хранящиеся в жидком азоте, высевали в пробирки с соответствующей жидкой питательной средой. После необходимого для каждого штамма срока культивирования (7-10) дней проведен контроль жизнеспособности, чистоты и аутентичности – по результатам анализа культурально-морфологических признаков в сравнении с паспортными данными штамма и характеристикой соответствующего рода и вида, приведенной в издании Bergey's Manual of Systematic Bacteriology или оригинальной публикации по описанию вида (штамма).

Для штаммов, выращенных в чашках Петри, визуально оценивали характер роста по штриху, однотипность колоний и их цвет, форму, поверхность, структуру и консистенцию, наличие блеска и пигмента, выделяемого в среду. Штаммы, выращенные в жидких питательных средах, оценены по степени и характеру роста (гранулярный, суспензия).

При микроскопировании культур обращали внимание на однородность клеток, наличие фрагментации, форму, расположение и размер спор, форму спороносец. Для актиномицетов рода *Streptomyces* с невыраженной пигментацией мицелия дополнительно проведено определение культурально-морфологических характеристик с использованием сред и методов, описанных в «Определителе актиномицетов» (Г.Ф. Гаузе, Т.П. Преображенская, М.А. Свешникова, Л.П. Терехова, Т.С. Максимова «Определитель актиномицетов», изд. «Наука», 1983), а также анализ МАЛДИ масс-спектров с использованием соответствующего СОП.

Масс-спектры были сопоставлены со спектрами культур, имеющимися в базе данных масс-спектров ВКМ. По результатам проверки делали заключение об аутентичности (и жизнеспособности) штаммов.

4.4.5 Верификация СОП по проверке качества (аутентичности) штаммов поддерживаемого фонда дрожжей и мицелиальных грибов.

Проведена проверка аутентичности 30-ти штаммов мицелиальных грибов, сохраняемых в ВКМ в лиофилизированном состоянии. Исследованные штаммы, поступившие в коллекцию в 1970-1990 гг., относились к 11 видам рода *Chrysosporium* (27 штаммов) и к виду *Trichoderma polysporum* (3 штамма) (таблица 4).

Таблица 4 - Результаты работы по проверке качества (аутентичности) и таксономической ревизии штаммов рода *Chrysosporium*

Номер штамма ВКМ	Наименование штаммов до проверки (в соответствии с информацией депозиторов).	Наименования штаммов после коррекции таксономической принадлежности
FW-326	<i>Chrysosporium carmichaelli</i>	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>
F-4093	<i>Chrysosporium europae</i>	<i>Malbranchea flavorosea</i>
FW-10	<i>Chrysosporium farinicola</i>	<i>Chrysosporium farinicola</i>
FW-36	<i>Chrysosporium georgiae</i>	<i>Chrysosporium georgiae</i>
F-2119	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>
F-2875 (Type)	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>
FW-355	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	<i>Chrysosporium undulatum</i>
F-2120 (Type)	<i>Chrysosporium lobatum</i>	<i>Chrysosporium lobatum</i>
F-3500D	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	<i>Chrysosporium lucknowense</i>
F-3555	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	<i>Chrysosporium lucknowense</i>
F-3631D	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	<i>Chrysosporium lucknowense</i>
F-3632D	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	<i>Chrysosporium lucknowense</i>
F-3633D	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	<i>Chrysosporium lucknowense</i>
F-3660 (Type)	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	<i>Chrysosporium lucknowense</i>
F-2121	<i>Chrysosporium merdarium</i>	<i>Chrysosporium merdarium</i>
F-3547	<i>Chrysosporium merdarium</i>	<i>Chrysosporium merdarium</i>
F-3778	<i>Chrysosporium merdarium</i>	<i>Chrysosporium merdarium</i>
FW-2420	<i>Chrysosporium merdarium</i>	<i>Chrysosporium merdarium</i>
F-2116	<i>Ch. queenslandicum</i>	<i>Ch. Queenslandicum</i>
F-2117	<i>Ch. queenslandicum</i>	<i>Ch. Queenslandicum</i>

F-2877 (Type)	<i>Chrysosporium tropicum</i>	<i>Chrysosporium tropicum</i>
F-3667	<i>Chrysosporium tropicum</i>	<i>Chrysosporium tropicum</i>
F-3805	<i>Chrysosporium tropicum</i>	<i>Chrysosporium tropicum</i>
FW-852	<i>Chrysosporium xerophilum</i>	<i>Sporotrichum pruinosum</i>
F-2654D	<i>Chrysosporium</i> sp.	<i>Pseudallescheria boydii</i>
FW-1000	<i>Chrysosporium</i> sp.	<i>Chrysosporium</i> sp.
FW-2024	<i>Chrysosporium</i> sp.	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>
F-867	<i>Trichoderma polysporum</i>	<i>Chrysosporium undulatum</i>
F-1171	<i>Trichoderma polysporum</i>	<i>Chrysosporium undulatum</i>
F-2416	<i>Trichoderma polysporum</i>	<i>Chrysosporium undulatum</i>

Оценивались культурально-морфологические признаки при выращивании на агаре Чапека [46] и Phytone yeast extract agar (фирма BBL), в условиях, рекомендуемых соответствующими современными определителями по отдельным таксономическим группам. Параллельно проводилась оценка жизнеспособности культур (качества хранения) в соответствии с СОП по контролю качества сохранения жизнеспособности коллекционного фонда ВКМ (Приложение Е).

Споровый материал проверяемых штаммов наносили на приготовленные агаризованные среды. Посевы инкубировали в термостатах при разных температурах. Оценку роста и особенностей спорообразования проводили через 14 суток. Учитывали визуально следующие макроморфологические признаки: размер колонии, окраска колонии, окраска обратной стороны (реверса) колонии, форма и строение края и центра колонии, характер поверхности, наличие и интенсивность развития конидий.

Микроморфологические признаки, необходимые для идентификации видов рода *Chrysosporium*, регистрировали при микроскопировании препаратов при увеличении 400х. Оценивали следующие признаки: тип конидиеобразования, способ размещения конидий на конидиеносце (наличие терминальных, интеркалярных и ламинарных структур), цвет и оптическую плотность конидий, размер и форма конидий, толщина клеточной стенки конидий (толстая, тонкая), поверхность конидий (гладкая, шероховатая), наличие базального шрама и его размер.

Результаты проверки аутентичности показали, что характеристики всех культур соответствовали таковым, приведенным в паспортах, предоставленных депозиторами при

помещении культур в коллекцию. По результатам проверки кураторами был сделан вывод об аутентичности (и жизнеспособности) всех проверенных штаммов.

Кроме того, на основе анализа макроморфологических и микроморфологических признаков и их сопоставления с данными определителей и научных статей по роду *Chrysosporium* [46-50], опубликованных после поступления штаммов в коллекцию, было также реклассифицировано 9 штаммов (Таблица 4).

Результаты проверки аутентичности, жизнеспособности и реидентификации занесены в рабочие журналы, инвентарный журнал лаборатории мицелиальных грибов, а также в базу данных ВКМ.

4.4.6 Верификация СОП по определению оптимальных методов консервации для новых штаммов (грибов) при пополнении фонда культур ВКМ.

Верификация была проведена на 32-х штаммах мицелиальных грибов, включенных в коллекционный фонд ВКМ в отчетный период (Приложение Н). Штаммы относятся к 21 роду и 24 видам. Для выбора оптимального метода консервации и хранения был проанализирован весь арсенал методов, используемых в ВКМ, таких как:

- S-1. Аэробное субкультивирование в жидкой среде
- S-2. Анаэробное субкультивирование в жидкой среде
- S-3. Анаэробное субкультивирование в полужидкой среде
- S-4. Субкультивирование на плотной питательной среде
- S-5. Субкультивирование на агаровой среде и хранение под минеральным маслом
- S-6. Субкультивирование на полужидкой среде и хранение под минеральным маслом
- S-7. Анаэробное субкультивирование в агаровых блоках
- S-8. Субкультивирование на агаровой среде под водопроводной водой
- D-1. Высушивание спор на фильтровальной бумаге
- D-2. Высушивание спор на плотной питательной среде
- D-3. Высушивание спор в жидкой питательной среде
- D-4. Высушивание спор в почве
- C-1. Криоконсервация в глицерине при  $-196^{\circ}\text{C}$  с высокой скоростью охлаждения
- C-2. Криоконсервация в сахарозе при  $-196^{\circ}\text{C}$  с высокой скоростью охлаждения
- C-3. Криоконсервация в сахарозо-желатиновом агаре  $-196^{\circ}\text{C}$  с высокой скоростью охлаждения
- C-4. Криоконсервация на агаровых дисках в глицерине при  $-196^{\circ}\text{C}$  с высокой скоростью охлаждения
- C-5. Криоконсервация при  $-196^{\circ}\text{C}$  с медленной скоростью охлаждения

- С-6. Криоконсервация при  $-196^{\circ}\text{C}$  со средней скоростью охлаждения
- С-7. Криоконсервация на силикагеле
- С-8. Криоконсервация при  $-70^{\circ}\text{C}$
- С-9. Криоконсервация при  $-70^{\circ}\text{C}$  на фильтровальной бумаге
- С-10. Хранение при температуре от  $-10$  до  $-18^{\circ}\text{C}$  в пробирках
- F-1. Лиофилизация в обезжиренном молоке
- F-2. Лиофилизация из жидкой питательной среды в сахарозо-желатиновом агаре
- F-3. Лиофилизация из плотной питательной среды в сахарозо-желатиновом агаре
- F-4. Лиофилизация на таблетках сухого молока
- F-5. Лиофилизация из плотной питательной среды в лошадиной сыворотке

С учетом результатов анализа сохранности жизнеспособности штаммов грибов одноименных или близких таксонов, имеющих в базе данных ВКМ «Хранение» (по многолетнему, более 50 лет, сохранению мицелиальных грибов широкого спектра таксонов) и имеющегося опыта коллектива, для консервации вновь включаемых в фонд ВКМ культур были выбраны следующие методы консервации:

- F-1. Лиофилизация в обезжиренном молоке,
- С-8. Криоконсервация при  $-70^{\circ}\text{C}$ ,
- S-5. Субкультивирование на агаровой среде и хранение под минеральным маслом.

Часть законсервированного материала (по четыре ампулы с лиофилизированными культурами) была перевезена в дубликатное хранилище ВКМ (Пушино), территориально удаленное от помещения, в котором расположена лаборатория мицелиальных грибов ВКМ (Москва).

Информация об используемых методах хранения штаммов внесена в базу данных ВКМ «Хранение», а также в каталожную базу данных (на русском и английском языках), которая доступна на сайте ВКМ в формате каталога (<http://www.vkm.ru/Catalogue.htm>). (Методы хранения в тексте Приложение Н для первых 2-х штаммов списка указаны выделенным шрифтом).

4.4.7 Верификация СОП по контролю качества сохранения коллекционного (жизнеспособности культур) фонда ВКМ.

Контроль качества сохранности (жизнеспособности) культур различных групп коллекционного фонда ВКМ производится, как правило, в ходе других работ с фондом (проверка аутентичности культур, таксономическая ревизия фонда, предоставление штаммов пользователям и т. д.). Соответственно, за отчетный период был верифицирован СОП по контролю качества сохранения коллекционного фонда ВКМ на более чем

90 штаммах бактерий, мицелиальных актиномицетов, архей и мицелиальных грибов, для которых проведена верификация СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда. Списки культур представлены в разделах 4.4.3 – 4.4.6.

4.4.8 Экспериментальная верификация СОП по идентификации липидных компонентов клеток прокариот (на 5 штаммах).

Оборудование и условия верификации:

- хромато-масс-спектрометр газовый Agilent 5977B GC/MSD с газовым хроматографом 7890В;
- хромато-масс-спектрометрическая колонка HP-5MS (5% фенилметилсиликон, 30 м/0.25 мм/0.25 мкм);
- вид ионизации – электронный удар;
- ввод проб – режим «без деления потока»;
- расход газа-носителя (гелия) – 1.2 мл/мин в режиме постоянного потока;
- метод ввода пробы – пульсирующий;
- давление в испарителе – 175.76 кПа;
- температура испарителя – 300°C;
- температура интерфейса МСД – 250°C;
- температура источника ионов – 230°C;
- температура квадрупольного МСД – 150°C;
- режим программирования температуры термостата колонок: 45°C – 2.25 мин, конечная температура 300°C – 0 мин: скорость нагрева 40°C/мин;
- режим стандартного сканирования масс от 50 до 350 а.е.м.;
- задержка хроматограммы – 5 мин;
- автоматический выбор области шума;
- области шума – 0.5 мин;
- вид шума – RMS;
- сигнал – высота пика.

Объекты верификации. Объектами верификации являлись пять штаммов нокардиоформных актиномицетов рода *Kribbella*, характеризующиеся LL-диаминопимелиновой кислотой в клеточной стенке (Таблица 5). Штаммы выделены из образцов почв Воронежской и Калужской областей РФ, Мордовии и Северного Кавказа и сохраняются в фонде ВКМ.

Таблица 5 - Состав и содержание липидных компонентов клеток у изученных штаммов, %

Жирная кислота	Штаммы									
	ВКМ	Ас-2500	ВКМ	Ас-2527	ВКМ	Ас-2570	ВКМ	Ас-2573	ВКМ	Ас-2575
<i>i</i> 14:0	3.9	8.8	3.9	3.8	0.9					
15:0	0.8	0.7	1.2	0.5	1.3					
<i>i</i> 15:0	11.8	14.5	3.6	7.2	4.8					
<i>a</i> 15:0	25.7	19.4	23.9	40.4	28.9					
15:1	0.2	0.7	1.5	0.3	0.4					
16:0	1.4	3.0	0.7	1.5	2.8					
<i>i</i> 16:0	22.0	31.2	29.7	13.9	11.9					
<i>i</i> 16:1	0.9	1.3	4.0	0.8	0.5					
16:17 <sub>c</sub>	0.2	1.8	0.6	2.1	2.9					
17:0	1.7	–	1.4	1.5	4.1					
<i>i</i> 17:1	7.8	4.9	5.1	6.0	4.4					
<i>i</i> 17:0	8.2	5.7	3.6	7.1	8.2					
<i>a</i> 17:0	7.7	5.8	11.5	9.0	17.1					
17:1 <sub>c</sub>	0.4	–	2.6	1.4	0.9					
10Me17:0	–	–	1.4	–	–					
<i>i</i> 18:1	–	–	1.4	–	2.4					
<i>i</i> 18:0	0.6	–	–	0.6	1.6					
11Me18:1	1.6	–	–	–	–					
2ОН <i>i</i> 17:0	1.1	–	–	–	–					

Примечание: “–” – жирные кислоты не обнаружены; жирные кислоты, содержание которых у всех изученных штаммов составило менее 1%, в таблице не приведены.

Липидные компоненты клеток изученных штаммов были представлены изо- и антеизо- насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами (Таблица 5). Состав жирных кислот изученных штаммов был характерен для описанных видов нокардиоформных актиномицетов рода *Kribbella*. В целом преобладали *anteiso*-C<sub>15:0</sub> (19.4-40.4%) и *iso*-C<sub>16:0</sub> (11.9–31.2%) кислоты. У всех штаммов обнаружены жирные кислоты *iso*-C<sub>15:0</sub> (3.6–14.5%), *anteiso*-C<sub>17:0</sub> (5.8–17.1%), *iso*-C<sub>17:0</sub> (3.6–8.2%), *iso*-C<sub>17:1</sub> (4.4-7.8%), *iso*-C<sub>14:0</sub> (0.9–8.8%), C<sub>16:0</sub> (0.7–3.0%) и C<sub>16:1w7cis</sub> (0.2–2.9%). У штамма ВКМ Ас-2500 выявлены 2-ОН-*iso*-C<sub>17:0</sub> и 11Ме-C<sub>18:1</sub> кислоты, у ВКМ Ас-2570 – 10Ме-C<sub>17:0</sub> кислота (менее 2%).

Таким образом, проведенная экспериментальная верификация СОП по идентификации липидных компонентов клеток бактерий (на 5 штаммах), показала, что в

составе липидных компонентов клеток прокариот возможно идентифицировать широкий спектр изо-/антеизо- насыщенных и ненасыщенных, а также гидрокси- и метилированных жирных кислот. При этом минимальное содержание липидных компонентов для обнаружения достигает 0.2%.

4.5 Пополнение электронного каталога ВКМ информацией о штаммах микроорганизмов, охарактеризованных согласно СОП ВКМ (не менее 30 штаммов).

В рамках дополнительных работ по развитию фонда (III-IV квартала) в каталожный фонд ВКМ включено 32 штамма мицелиальных грибов, представителя 21 рода и 24 видов (Приложение Н.). В их числе штаммы, относящиеся к ранее не представленным в ВКМ родам (*Cytospora*, *Mammaria*, *Paraphoma*, *Phaeosphaeria*) и видам (*Cadophora luteo-olivacea*, *Cosmospora berkeleyana*, *Cytospora* sp., *Exophiala xenobiotica*, *Fusicladium peltigericola*, *Mammaria echinobotryoides*, *Paraphoma fimeti*, *Phaeosphaeria* sp., *Venturia tremulae*). Включенные в фонд штаммы выделены из антарктических почв с разной антропогенной нагрузкой, болотных экосистем, из строительных материалов. Идентификация культур проведена на основании фенотипических и молекулярно-генетических характеристик. Штаммы законсервированы и заложены на длительное хранение. Информация о штаммах внесена в базу данных на русском и английском языках, доступна на сайте ВКМ ([www.vkm.ru](http://www.vkm.ru)) в формате каталога (Приложение Н). Дата последнего обновления каталога ВКМ – 18.12.2017.

4.6 Опубликование статей сотрудников ВКМ в рецензируемых журналах.

В рамках работ по таксономической ревизии рабочего фонда ВКМ выявлен ряд новых видов и родов бактерий и архей. На основании полученных результатов подготовлены к публикации в журнале «International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology» (*Scopus*, *WoS*; 5-летний импакт фактор = 2.5) следующие 3 статьи по описанию новых видов бактерий:

1) Ryzhmanova, Y. Oshurkova V. Troshina O., Abashina T., Ariskina E., Avtukh A., Shcherbakova V. *Anoxynatronum buryatiense* sp. nov., an anaerobic alkaliphilic bacterium from a low mineralization soda lake in Buryatia, Russia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, Vol. 67, P. 4704-4709. DOI 10.1099/ijsem.0.002365.

2) Oshurkova V., Trubitsyn V., Ryzhmanova Ya., Levko O., Shcherbakova V. *Methanosarcina gilichinskyana* sp. nov., a novel methanogenic archaeon isolated from Holocene permafrost, North East Russia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (представлена к печати, Ms. No. IJSEM-D-17-00719).

3) Dorofeeva L.V., Starodumova I.P., Prisyazhnaya N.V., Krauzova V.I., Lysanskaya V.Y., Vinokurova, Evtushenko L.I. *Rathayibacter oskolensis* sp. nov., a novel actinobacterium from *Androsace koso-poljanskii* Ovcz., an endemic plant to Central Russian Upland, Russia International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (представлена к печати, Ms. No. IJSEM-D-17-00762).

Библиографический список публикаций, подготовленных в результате выполнения научно-исследовательской работы, имеется также в Приложении П. Фрагменты статей (страницы, содержащие указание авторов и их аффилиацию, а также ссылки на финансовую поддержку ФАНО России и т.п.) размещены на интернет-сайте организации:

[http://ibpm.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=249:vkm&catid=4&Itemid=15](http://ibpm.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=249:vkm&catid=4&Itemid=15).

#### 4.7 Другие результаты запланированных работ

Были также выполнены другие работы и мероприятия, запланированные на III-IV кварталы 2017 г. и частично упомянутые в соответствующих разделах выше: участие в подготовке календарного плана работ по выполнению дополнительного государственного задания; проведение регистрации ВКМ на электронном ресурсе Сетевого центра Коллекций микроорганизмов ФАНО России; размещение на страничке подразделения (ВКМ) на интернет-сайте организации Технологического паспорта и Отчета о выполненной работе, с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения; проведение регистрации ВКМ на электронном ресурсе Сетевого центра коллекций микроорганизмов ФАНО России; запись результатов верификации и других работ в соответствующих базах данных ВКМ. Результаты выполненных работ нашли отражение (на русском и английском языках) в каталожной базе данных, базах данных «Хранение», «Библиография ВКМ», «Питательные среды», «ПОЛЬЗОВАТЕЛИ», «КРИО», «МАЛДИ».

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем отчете представлено краткое обобщение основных результатов работ и исследований по дополнительной теме «Исследования и мероприятия, направленные на повышение качества фонда и услуг Всероссийской коллекции микроорганизмов» (номер госрегистрации АААА-А17-117101350026-5) Государственного задания на выполнение фундаментальных научных исследований в III-IV кварталах 2017 года в рамках мероприятий по инвентаризации и развитию биоресурсных коллекций научными организациями, подведомственными ФАНО России. Вышеуказанная дополнительная тема неразрывно связана с темой Государственного задания ИБФМ РАН «Исследование микробного разнообразия на организменном, популяционном, структурном, геномном, функциональном уровнях и обеспечение его сохранности в коллекциях. Реализация задач по созданию Биологического ресурсного центра на основе Всероссийской коллекции микроорганизмов (Номер Госрегистрации АААА-А16-116062110070-7).

Запланированные исследования и мероприятия выполнены в полном объеме.

В результате работ сформирован технологический паспорт ВКМ, включающий, в т.ч., перечень 50 стандартных операционных процедур (СОП) ВКМ, а также детальное описание 10 из перечня ключевых СОПов. Сформированы и представлены в рабочую группу сметы и их научно-техническое обоснование для 9 СОПов. Верифицированы согласно плану работ 8 СОПов с использованием 157 штаммов микроорганизмов (архей, бактерий, мицелиальных актиномицетов, мицелиальных и дрожжевых грибов). В ходе работ по проверке качества (аутентичности) и таксономической ревизии фонда ВКМ, выявлен и охарактеризован ряд новых видов и родов бактерий и архей. На основании полученных результатов подготовлены 3 статьи, которые представлены и опубликованы в журнале *Systematic and Evolutionary Microbiology* (Scopus, WoS).

Выполненные работы явились важным этапом работ по созданию в России национального биологического ресурсного центра мирового уровня – в соответствии с положениями Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 г., утвержденной В.В. Путиным [5], и Плана мероприятий («Дорожной карте») «Развитие биотехнологий и геномной инженерии» [23], отражающем важнейшие задачи Комплексной программы.

Задачи Программы созвучны ряду других правительственных документов последних лет, в том числе, Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации на 2017-2019 годы [26] и Плану мероприятий по ее реализации [27], в которых предусмотрено создание конкурентоспособного на мировом уровне российского сектора исследований и разработок, предполагающего наличие развитой научной инфраструктуры.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Curtis T.P., Sloan W.P., Scannel J.W. Estimating prokaryotic diversity and its limits / PNAS – 2002. – Vol. 99 – P. 10494–10499.
- 2 Overmann J. Significance and future role of microbial resource centers / Systematic and Applied Microbiology – 2015. – Vol. 38 – P. 258-265.
- 3 LPSN, List of prokaryotic names with standing in nomenclature. – 2014. <http://www.bacterio.net/-number.html#total>
- 4 Smith D., Fritze F., Stackebrandt E. Public service collections and biological resource centres of microorganisms. In The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations. / Ed. E. Rosenberg. New York: Springer. – 2013. – P. 267–304.
- 5 Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года (утв. Председателем Правительства РФ 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8).
- 6 World Federation for Culture Collection – WFCC, <http://www.wfcc.info>.
- 7 Прогноз научно-технологического развития Российской Федерации на период до 2030 года (утв. Правительством РФ 3 января 2014 г.).
- 8 Biological Resource Centers Underpinning the Future of Life Sciences and Biotechnology. OECD: Paris – 2001 – 115p.
- 9 Guidance for the Operation of Biological Resource Centres (BRCs). OECD: Paris – 2007 2004. <http://www.oecd.org/science/biotech/23547743.pdf>prokaryotic.
- 10 OECD Best Practices Guidelines for Biological Resource Centers. Guidance for the Operation of Biological Resource Centres (BRCs). Part 1. General Requirements for aall BRCs. OECD: Paris – 2007. <http://www.oecd.org/dataoecd/60/44/23547773.pdf>.
- 11 Будапештский договор о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры. Будапешт, 1977 г., <http://www.rupto.ru/docs/interdocs/Budapest?starblind=200> (ратифицирован Указом Президиума Верховного Совета СССР от 24 декабря 1980 года № 3615-X).
- 12 Stackebrandt E. Diversification and focusing: strategies of microbial culture collections. Trends Microbiol. –2010 – V. 18 – P. 283–287.
- 13 Stackebrandt E. Deposition of microbial strains in public resource centres: safeguarding valuable resources for academic and applied research. Res.Microbiol. 2012, V.163, P. 487–489.
- 14 Stackebrandt, E., Smith, D., Casaregola, S., Varese, G.C., Verkleij, G., Lima, N., Bridge, P. (2014) Deposit of microbial strains in public service collections as part of the publication process to underpin good practice in science. SpringerPlus – 2014 – Vol. 3 –P. 208.

15 Конвенция о биологическом разнообразии,  
[http://www.un.org/ru/documents/decl\\_conv/conventions/biodiv.shtml](http://www.un.org/ru/documents/decl_conv/conventions/biodiv.shtml).

16 Нагойский протокол регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод от их использования. Организация Объединенных Наций, 2010. [http://www.un.org/ru/documents/decl\\_conv/conventions/pdf/nagoya\\_protocol.pdf](http://www.un.org/ru/documents/decl_conv/conventions/pdf/nagoya_protocol.pdf).

17 Desmeth P. 2017. The Nagoya Protocol applied to microbial genetic resources, p 205–217. In Kurtboke I (ed), Microbial resources: from functional existence in nature to applications Academic Press, London, United Kingdom.

18 Smith D., da Silva M., Jackson J., Lyal C. 2017. An explanation of the Nagoya Protocol and Access and Benefit Sharing, and its implication for microbiology. Microbiology 163:289–296.

19 Schüngel M., Stackebrandt E., Bizet C., Smith D. MIRRI - The Microbial Resource Research Infrastructure: managing resources for the bio-economy / EMBnet. Journ [http://www.un.org/ru/documents/decl\\_conv/conventions/biodiv.shtml](http://www.un.org/ru/documents/decl_conv/conventions/biodiv.shtml). – 2013. V.19, № 1 – P. 5-8.

20 Калакуцкий Л.В. Коллекции культур: от неустойчивого существования к устойчивому развитию / «Вопросы правового обеспечения научно-технической и инновационной деятельности». Информационно-аналитический сборник по материалам выездного расширенного заседания и «круглого стола». Издание Государственной Думы. Москва – 2011 – С. 113-118.

21 Калакуцкий Л.В. Коллекции микробов / «Сохранение биологического разнообразия России – основа устойчивого развития науки и наукоемких производств». (По материалам слушаний в Общественной палате Российской Федерации на тему: «Биологические коллекции России – основа устойчивого развития науки и наукоемких производств», 1 марта 2011 г.). ГНУ ВСТИСП Россельхозакадемии: М. – 2011 – С-39-48.

22 Калакуцкий Л.В., Озерская С.М. Биологические ресурсные центры: современное состояние в России и мире, проблемы организации, перспективы развития / Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова – 2011 – Т.1, №1 – С. 28-40.

23 План мероприятий («Дорожная карта») по развитию биотехнологий и геномной инженерии. (Утв. Распоряжением Правительства РФ от 18 июля 2013 года №1247-р).

24 Основы политики Российской Федерации в области развития науки и технологий на 2013-2020 годы (утв. Правительством РФ 15 апреля 2014 г. № 301).

25 Стратегия инновационного развития Российской Федерации на период до 2020 года (утв. Правительством РФ от 8 декабря 2011 г. № 2227-р).

26 Стратегия научно-технологического развития Российской Федерации (Утв. Указом Президента РФ от 1 декабря 2016 года № 642).

27 Об утверждении плана мероприятий по реализации Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации на 2017-2019 годы. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 24 июня 2017 года N 1325-р.

28 Концепция в области генетических ресурсов. Материалы Рабочей группы «Экобиотехнология» Технологической Платформы «Биотех 2030», 08.11.2012.

29 Предложения Рабочей группы по Разработке подходов к созданию Национальных биологических центров на основе действующих биологических коллекций при Минбразования России (Протоколы и стенограммы заседаний Рабочей группы, 2014-2016 гг.).

30 Евтушенко Л.И., Голубев В.И., Озерская С.М., Соколов А.П., Калакуцкий Л.В. (2015). Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ): на пути к биологическому ресурсному центру / История науки и техники – 2015 – Т.1 – С. 19-36.

31 Каталог культур микроорганизмов, поддерживаемых в институтах СССР / Ред. В.И. Кудрявцев. М.: Наука, 1964. 124 с.

32 Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителям паразитарных болезней» (СП 1.3.2322-08). (Утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ №4 от 28 января 2008 г.).

33 Ozerskaya, S.M., Vasilenko, A.N, Verslyppe, B., Dawyndt, P. FungalDC: a database on fungal diversity in culture collections of the world. *Inoculum. Supplement to Mycologia (Newsletter of the Mycological Society of America)* – 2010 – Vol. 61, N 3 – P. 1-5.

34 Microbial Resource Research Infrastructure (MIRRI), <http://www.mirri.org/home.html>

35 Declerck S., Willems A., van der Heijden M.G., Varese G.C., Turkovskaya O., Evtushenko L., Ivshina I., Desmeth P. PERN: an EU–Russia initiative for rhizosphere microbial resources / *Trends in Biotechnology* – 2015 – Vol.33, N 7 – P. 377-380.

36 Vasilenko, A., Ozerskaya, S., Stupar, O. Current WFCC CC catalogues as a starting ground for networking efforts / *WFCC Newsletter* – 2011 – N 50 – P. 5-15.

37 Vasilenko A. Life science databases and possible interconnection with mBRC data. *In: The 50<sup>th</sup> Anniversary of World Data Center for Microorganisms* – 2016 – China, Beijing, September 6-8 – P. 37.

38 Casaregola, S., Vasilenko, A., Romano, P., Robert, V., Ozerskaya, S., Kopf, A., Glöckner, F.O. & Smith, D. (2016). An information system for European culture collections: the way forward / *SpringerPlus* – 2016 – Vol. 5 – P. 773-782.

39 MIRRI Deliverable Number D8.5. Report on users requests, desired features, and meta-analyses of the integrated platform. EC – October, 2013.

40 MIRRI Deliverable Number D8.6. / Report on human and programmatic access and on documentation development and contents annotation. EC – July, 2015.

41 Wu, L., Sun, Q., Sugawara, H., Yang, S., Zhou, Y., McCluskey, K., Vasilenko, A., Suzuki, K.-I., Ohkuma, M., Lee, Y., Robert, V., Ingsriswang, S., Guissart, F., Desmeth, P. & Ma, J. Global catalogue of microorganisms (GCM): a comprehensive database and information retrieval, analysis, and visualization system for microbial resources / BMC Genomics – 2016 – Vol.14 – P. 933-942. (<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/933>).

42 Wu, L., Sun, Q., Desmeth, P., Sugawara, H., McCluskey, K., Smith, D., Vasilenko, A., Lima, N., Ohkuma, M., Robert, V., Zhou, Y., Li, J., Fan, G., Ingsriswang, S., Ozerskaya, S., Ma, J. World data centre for microorganisms: an information infrastructure for the exploration and utilization of microbial strains preserved worldwide / Nucleic Acids Research – 2016, gkw903. <https://academic.oup.com/nar/article/45/D1/D611/2770659/World-data-centre-for-microorganisms-an>.

43 European Culture Collection Organisation (ECCO), <http://www.eccosite.org>.

44 WFCC-MIRCEN World Data Centre for Microorganisms (WDCM), [www.wdcm.org](http://www.wdcm.org).

45 Кудрявцева А.В. О Центрах коллективного пользования в области «Наука о жизни». // Материалы доклада, Конференции «Центры коллективного пользования и уникальные научные установки в организациях, подведомственных ФАНО России» / Москва, 20-21 октября 2015 года, <http://ckp-fano.ru/index.php/ru/>.

46 Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. - М.: Агропромиздат, 1990. - 240 с.

47 Domsch K.H, Gams W., Anderson T.H. Compendium of soil fungi. IHW-Verlag, 2007. - 672 p.

48 van Oorschot C.A.N. A revision of *Chrysosporium* and allied genera // Studies in Mycology. 1980. V.20. P.1–89.

49 Sigler L., Guarro J., Punsola L. New keratinophilic species of *Chrysosporium* // Canadian Journal of Botany. 1986. V.64. Is.6. P.1212 – 1215.

50 Vidal P., Ulfig K., Valmaseda M., Guarro J. Studies on keratinophilic fungi. XI. *Chrysosporium undulatum* sp. nov. // Antonie van Leeuwenhoek. 1999. V.75. P.171 – 182.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Технологический паспорт Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ)

#### 1 Общие положения

1.1 Всероссийская коллекция микроорганизмов функционирует на базе Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина с 1980 в ранге Отдела (Постановление Президиума АН СССР № 942 от 25.09.80). В настоящее время Отдел включает 5 подразделений (лаборатория мицелиальных грибов, лаборатория анаэробных микроорганизмов, сектор актиномицетов, сектор бактерий, сектор дрожжевых грибов), поддерживающих фонды различных групп микроорганизмов, а также 2 подразделения общеколлекционной деятельности (сектор информации и координации, сектор консервации микроорганизмов).

1.2 Характер и основные направления деятельности ВКМ определены в Положении о ВКМ (Приложение к Постановлению Президиума АН СССР № 942 от 25.09.80) и Положении о ВКМ (утв. Директором ИБФМ РАН 14 января 2014 г.).

1.3 ВКМ имеет статус Коллекции национального значения (Постановление Правительства РФ № 725-47 «О мерах по сохранению и рациональному использованию коллекций микроорганизмов, культивируемых клеток высших растений, перевиваемых соматических клеток позвоночных» от 24.06.96).

1.4 ВКМ является Международным органом по депонированию (МОД) культур, защищенных патентами – в рамках обязательств Российской Федерации по Будапештскому договору о взаимном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры (Распоряжение Совета министров СССР № 1112р от 02.06.86г.; нотификация статуса МОД Всемирной организацией интеллектуальной собственности (World Intellectual Property Organization - WIPO) – No 63 от 28.07.1987).

1.5 ВКМ – один из центров депонирования типовых штаммов вновь описываемых новых видов микроорганизмов (согласно международным правилам регистрации новых видов).

1.6 ВКМ имеет лицензию на работы с микроорганизмами 3-4-й групп патогенности согласно (согласно Приложению 1 к Постановлению Главного государственного санитарного врача РФ "Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08").

1.7 Биохранилища, лабораторные и офисные помещения ВКМ занимают площадь 2037,2 м<sup>2</sup> в здании ИБФМ РАН (г.Пушино, просп. Науки, 5), а также в помещениях, арендуемых в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (г. Москва).

1.8 ВКМ зарегистрирована в реестре Современной исследовательской структуры Российской Федерации как УНУ (<http://ckp-rf.ru/usu/73546/>) и ЦКП (<http://ckp-rf.ru/ckp/74752/>).

1.9 ВКМ является коллективным членом Всемирной федерации коллекций культур (World Federation for Culture Collection – WFCC, <http://www.wfcc.info>), Европейской организации коллекций культур (European Culture Collection Organisation – ECCO, <http://www.eccosite.org>) и Международного центра данных по микроорганизмам (WDCM), действующего под эгидой Всемирной Федерации коллекций культур (WFCC).

## 2 Основные функции ВКМ как коллекции национального значения

2.1 Формирование в нарастающем объеме национального коллекционного фонда микробных биоресурсов (генетических ресурсов), обеспечение его гарантированной сохранности и регулируемой доступности для широкого круга исследовательских, промышленных и учебных организаций всех форм собственности, а также контрольных и других государственных структур, на всей территории Российской Федерации.

2.2 Обеспечение надлежащего качества поддерживаемых образцов (жизнеспособности, аутентичности и точной идентификации культур – в соответствии с международно-признанными системами), характеристика природных и генно-модифицированных штаммов микроорганизмов и их свойств с надлежащим (эволюционирующим) уровнем методического разрешения, в т.ч., в связи с обеспечением биобезопасности при их использовании.

2.3 Обеспечение регулируемого доступа к информации об объектах коллекционного фонда, в том числе, касающейся происхождения штаммов и декларированного уровня их биологической опасности (поддержание он-лайн каталога, развитие и повышение объемов и функциональности баз данных, аккумулирующих информацию о фондах и свойствах образцов, включая информацию о группах риска/патогенности согласно национальным и международным нормативным документам).

2.4 Обеспечение (в своей сфере ответственности) действующих в Российской Федерации систем защиты авторских прав и охраны интеллектуальной собственности на продукты научной деятельности и промышленные образцы (депонирование штаммов микроорганизмов в связи с национальной и международной патентными процедурами и обеспечение регулируемого доступа к штаммам).

2.5 Поддержка международного механизма регистрации вновь описываемых видов микроорганизмов и сохранение в ВКМ типовых штаммов новых видов, обнаруженных на

территории Российской Федерации (депонирование и хранение типовых штаммов вновь описываемых видов).

2.6 Поддержка механизмов документирования научных приоритетов российских ученых (депонирование штаммов микроорганизмов – объектов исследований и публикаций, представляемых к печати в российских и зарубежных изданиях, гарантированное сохранение штаммов и обеспечение регулируемого доступа к ним для их дальнейшего углубленного исследования и использования).

2.7 Поддержка механизмов легитимного оборота микробных генетических ресурсов, в том числе, на международном уровне (регистрация цепочек передач штаммов микроорганизмов поддерживаемого коллекционного фонда от момента их выделения из природы до конечного использования; обеспечение регулируемого доступа к биоматериалам, определяемого нормативными документами).

2.8 Взаимодействие с профильными и исследовательскими коллекциями РФ и развитие кооперации в области сохранения, характеристики и использования микробного разнообразия; обеспечение информационной связи с заинтересованными коллекциями.

2.9 Развитие взаимовыгодной международной кооперации в области изучения и использования микробных биоресурсов; обеспечение информационной связи с зарубежными Биоресурсными центрами и международными информационными ресурсами по микроорганизмам.

2.10 Мониторинг нормативной базы, связанной с доступом к национальным микробным биоресурсам *ex situ*, участие в гармонизации российских и соответствующих международных регулятивов.

2.11 Предоставление научно-сервисных услуг, касающихся идентификации микроорганизмов, определения их конкретных таксономических характеристик и т. п.

2.12 Образовательная деятельность – подготовка студентов, магистрантов и аспирантов ВУЗов, а также проведение стажировок специалистов из различных научных учреждений РФ и зарубежных стран в области коллекционной деятельности и таксономии микроорганизмов.

Детали и последовательность выполнения работ и исследований, связанных с основными функциями ВКМ как микробной коллекции национального значения и элемента инфраструктуры науки и биотехнологии РФ, отражены в комплексе документов – Стандартных операционных процедур - СОПов (см. раздел 6).

### 3 Фонд ВКМ

3.1 Общая численность фонда ВКМ – более 21000 штаммов микроорганизмов – представителей всех основных надцарств (бактерии, в т.ч., актинобактерии, археи,

мицелиальные и дрожжевые грибы) и физиологических групп (в т.ч., анаэробы, экстремофилы).

3.2 Фонд ВКМ включает более 2500 типовых штаммов видов, более 800 штаммов, депонированных в ВКМ в связи с патентной процедурой. Значительная часть фонда ВКМ – это штаммы - объекты научных публикаций, депонированные в ВКМ согласно требований научных изданий, а также широкий спектр культур с уникальными свойствами и биотехнологическим потенциалом, в их числе представители пока не описанных родов и видов. В ВКМ поддерживаются также генетически модифицированные штаммы и микроорганизмы 3-й и 4-й групп патогенности (согласно Приложению 1 к Постановлению Главного государственного санитарного врача РФ "Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08"), штаммы категорий «возникающие патогены» («emerging pathogens»), «экопатогены» и др.

3.3 Представленный в он-лайн-каталоге ([www.vkm.ru](http://www.vkm.ru)) открытый фонд ВКМ содержит около 7000 штаммов (более 750 родов и 3300 видов), идентифицированных в соответствии с современной системой классификации.

#### 4 Информационные ресурсы ВКМ

4.1 Каталогная база данных (БД) содержит полную информацию по каждому объекту фонда, с возможностью вывода информации по штаммам открытого фонда (по ряду полей) в он-лайн каталог, в т.ч., в формате pdf (<http://www.vkm.ru/catalogue.htm>). Предоставляет возможность поиска штаммов по таксономическим названиям, коллекционным номерам, а также названиям метаболитов. Интегрирована в международную систему Straininfo ([www.straininfo.net/](http://www.straininfo.net/)) по штаммам микроорганизмов биоресурсных центров мира и Глобальный каталог микроорганизмов (Global catalogue of microorganisms – GCM) (<http://gcm.wfcc.info/>), развиваемый Всемирным центром данных по микроорганизмам (WDCM), который функционирует под эгидой Всемирной федерации коллекций культур (WFCC).

4.2 Единый электронный каталог 17-ти российских коллекций (<http://www.vkm.ru/cosolidated.htm>), издание 2003г.

4.3 БД «PERN» (<http://www.pern-brio.eu/catalogue>) – информационная система микробных ресурсов из ризосферы и растений, обеспечивает доступ к информации по данной категории штаммов, поддерживаемых в 3 микробных коллекциях России (ВКМ, ИЭГМ, ИБФРМ) и 4 коллекциях Европы. Помогает пользователям в решении технических вопросов в области агробиотехнологии, биоремедиации, защиты растений.

4.4 БД «ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ» – по составу питательных сред, используемых для культивирования штаммов фонда ВКМ; связана с каталожной БД.

4.5 БД «ХРАНЕНИЕ» – по методам и срокам (более 50 лет) хранения мицелиальных грибов ВКМ (426 родов, 1227 видов, 2779 штаммов). Позволяет оценивать сроки жизнеспособности для культур широкого спектра таксонов и проводить оперативный анализ оптимальных методов и режимов низкотемпературного замораживания и лиофильного высушивания штаммов.

4.6 БД «КРИО» – по культурам, сохраняемым в жидком азоте.

4.7 БД «ПОЛЬЗОВАТЕЛИ» – по пользователям ВКМ и предоставленным по запросам культурам за всю историю ВКМ.

4.8 БД «ПАТЕНТ» – по штаммам, депонированным в ВКМ в связи с патентной процедурой. Включает в т.ч., сведения о депозиторах, их контактных данных, сроках депонирования, датах и результатах проверки жизнеспособности культур и т.д.

4.9 БД «БИБЛИОГРАФИЯ ВКМ» – специализированная база данных по публикациям и патентам, в которых упоминаются штаммы фонда ВКМ. Включает почти 7000 единиц библиографии. Ее присоединение к каталожной базе данных обеспечивает он-лайн доступ научного сообщества к опубликованной информации (в т.ч., биотехнологического характера) по конкретным штаммам фонда ВКМ.

4.10 БД «FungalDC» – информационно-справочная система, интегрированная с основными информационными ресурсами мира по грибам (WDCM, GenBank, Index Fungorum, MycoBank, StrainInfo). Обеспечивает доступ к разноплановой информации (систематика, экология, биотехнология, биобезопасность и др.) по различным видам грибов. Позволяет, в т.ч., проводить оценку степени изученности грибных таксонов молекулярно-генетическими методами.

4.11 БД «Метаболиты мицелиальных грибов, перспективные для биотехнологии» включает информацию обо всех известных метаболитах (20 классов органических соединений), синтезируемых грибами рода *Penicillium*.

4.12 База данных ВКМ «МАЛДИ» включает МАЛДИ масс-спектры бактерий ряда семейств и практически-значимых групп микроорганизмов (фитопатогены, молочнокислые бактерии и др.), слабо представленных в базе данных производителя (Bruker).

## 5 Материально-техническая и научно-методическая базы ВКМ

5.1 Перечень приборов и оборудования, используемого в ВКМ для сохранения, пополнения и развития фонда ВКМ, а также выполнения наукоемких сервисных услуг в интересах пользователей включает лиофильные и холодильные установки, криохранилища, компьютеры, оргтехнику, микроскопы, амплификаторы, спектрофотометры, аминокислотный анализатор, масс-спектрометры, газовый и газо-

жидкостные хроматографы, а также другие приборы и оборудование, используемые для характеристики и идентификации микроорганизмов (в том числе, на уровне вида) и документирования их свойств.

5.2 ВКМ располагает полным комплексом современных методов, необходимых для точной идентификации микроорганизмов (в том числе, на уровне вида), а также для определения спектра таксономических характеристик, требуемых при описании новых видов и родов микроорганизмов в соответствии с международными стандартами.

6 Стандартные операционные процедуры, обеспечивающие стандартизацию, качество и эффективность работ по выполнению основных функций ВКМ

6.1 Общий перечень основных Стандартных операционных процедур (СОП) ВКМ

#### Процедурные СОП

- 1) СОП по введению штамма микроорганизма в коллекционный фонд ВКМ
- 2) СОП по Национальному депонированию в ВКМ штамма микроорганизма
- 3) СОП по Международному депонированию в ВКМ штамма микроорганизма в соответствии с Будапештским договором
- 4) СОП по приготовлению питательных сред и стерильной посуды
- 5) СОП по хранению культур методом субкультивирования
- 6) СОП ВКМ по подготовке к консервации штаммов микроорганизмов разных таксономических групп
- 7) СОП по криоконсервации культур бактерий, включая актиномицеты, и дрожжей в жидком азоте
- 8) СОП по криоконсервации культур бактерий на носителях (глауконите)
- 9) СОП по криоконсервации культур бактерий на носителях (пористых бусинах)
- 10) СОП по криоконсервации штаммов мицелиальных грибов ВКМ с использованием разных режимов программируемого замораживания
- 11) СОП по лиофилизации штаммов мицелиальных грибов ВКМ с использованием разных режимов первичной и вторичной сушки
- 12) СОП по высушиванию в стерильной почве штаммов мицелиальных грибов ВКМ
- 13) СОП по высушиванию на силикагеле штаммов мицелиальных грибов ВКМ
- 14) СОП по хранению под минеральным маслом штаммов мицелиальных грибов ВКМ
- 15) СОП по хранению под водой штаммов мицелиальных грибов ВКМ
- 16) СОП по контролю качества сохранения жизнеспособности коллекционного фонда ВКМ

- 17) СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда прокариот (бактерий и архей)
- 18) СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда мицелиальных актиномицетов
- 19) СОП по проверке качества (аутентичности) штаммов поддерживаемого фонда дрожжей и мицелиальных грибов
- 20) СОП по формированию и обеспечению сохранности дубликатного фонда штаммов мицелиальных грибов ВКМ
- 21) СОП по введению информации о штаммах микроорганизмов в базу данных ВКМ «Каталог»
- 22) СОП по введению информации о библиографических ссылках на штаммы микроорганизмов ВКМ в базу данных «VKM-LINE»
- 23) СОП по введению информации о питательных средах для штаммов микроорганизмов ВКМ в базу данных «Питательные среды»
- 24) СОП по введению информации о пользователях штаммами микроорганизмов ВКМ в базу данных «Пользователи»
- 25) СОП по введению информации о методах хранения и сроках сохранения жизнеспособности штаммов мицелиальных грибов ВКМ в базу данных «Хранение»
- 26) СОП по ведению рабочих журналов по хранению штаммов мицелиальных грибов ВКМ
- 27) СОП по ведению рабочих журналов по методам хранения штаммов микроорганизмов ВКМ:
  - криоконсервация - закладка на хранение/проверка жизнеспособности
  - лиофилизация - закладка на хранение/проверка жизнеспособности
  - хранение в стерильной почве - закладка на хранение/проверка жизнеспособности
  - хранение на силикагеле - закладка на хранение/проверка жизнеспособности
  - хранение под водой - закладка на хранение/проверка жизнеспособности
  - хранение под минеральным маслом/проверка жизнеспособности
- 28) СОП по подготовке документации для отправки штаммов фонда ВКМ по заявкам российских организаций
- 29) СОП по подготовке документации для отправки штаммов фонда ВКМ по заявкам зарубежных организаций
- 30) Оформление документов для получения штаммов микроорганизмов из-за рубежа

## Аналитические СОП

- 31) СОП по определению оптимальных методов консервации для новых штаммов при пополнении фонда культур ВКМ
- 32) СОП по идентификации мицелиальных грибов и дрожжей (на основе морфологических и физиолого-биохимических признаков)
- 33) СОП по идентификации штаммов мицелиальных грибов и дрожжей молекулярными методами (на основе анализа фрагментов ДНК)
- 34) СОП по идентификации штаммов бактерий и архей на основе МАЛДИ-масс-спектрометрии (с использованием возможностей базы данных Bruker и локальных баз данных масс-спектров ВКМ).
- 35) СОП по идентификации штаммов прокариот на основе анализа гена 16S рРНК
- 36) СОП по идентификации штаммов прокариот на основе анализа функциональных генов
- 37) СОП по определению липидных компонентов (жирных кислот) клеток бактерий и архей
- 38) СОП по определению нуклеотидного состава ДНК (Tm)
- 39) СОП по определению изомера диаминопимелиновой кислоты клеточной стенки
- 40) СОП по определению состава сахаров целых клеток бактерий
- 41) СОП по получению очищенного препарата клеточной стенки бактерий
- 42) СОП по определению состава аминокислот пептидогликана клеточной стенки (с предварительным получением препарата клеточной стенки)
- 43) СОП по определению состава сахаров клеточной стенки бактерий (с предварительным получением препарата клеточной стенки)
- 44) Определение состава изопреноидных хинонов дыхательной цепи (менахинонов, убихинонов)
- 45) Определение состава фосфолипидов бактерий и дрожжей
- 46) СОП по определению летучих (газообразных) продуктов метаболизма микроорганизмов
- 47) СОП по определению нелетучих метаболитов микроорганизмов (органические кислоты, моно- и многоатомные спирты, эфиры)
- 48) Определение физиолого-биохимических признаков (в т.ч. с использованием тест-систем) бактерий для их описания в качестве нового вида в соответствии с международными стандартами
- 49) Полная характеристика штамма прокариот для их описания в качестве нового рода в соответствии с международными стандартами

50) Полная характеристика штаммов прокариот для его описания в качестве нового вида в соответствии с международными стандартами  
Примеры описаний 10 операционных процедур ВКМ приводятся в ПРИЛОЖЕНИЯХ Б–М.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Стандартная операционная процедура по введению культуры микроорганизма в открытый коллекционный фонд ВКМ

Составлено: С.М. Озерская, д.б.н., зав. лабораторией.

Содержание и назначение: Определяет протокол по введению культур микроорганизмов в открытый коллекционный фонд ВКМ.

Местонахождение: Отдел ВКМ, ИБФМ РАН.

Пересмотр: при необходимости.

Введение в коллекционный фонд ВКМ производится с целью расширения разнообразия коллекции, а также для обеспечения пользователей в связи с необходимостью гарантированного конфиденциального сохранения перспективных штаммов и представления сведений о сохранении культур микроорганизмов при публикации результатов исследований в научных журналах.

Микробиологическая лаборатория для работы с культурами микроорганизмов должна соответствовать требованиям Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами» в ред. Дополнений и изменений N 2, утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.06.2011 N 86.

1 Оборудование и материалы, необходимые для введения культуры микроорганизма в коллекционный фонд ВКМ:

- Автоклавы для стерилизации и убивки отработанного материала
- Бактериологическая петля
- Вата медицинская хлопковая гигроскопическая
- Веревка джутовая
- Вода дистиллированная
- Детергент Tween 80
- Дозатор автоклавируемый одноканальный переменного объема V 0,2-20 мкл, наконечники
- Бактерицидные лампы
- Баллон газовый
- Газ
- Горелка газовая
- Дезинфицирующие средства (2.12.11. В лаборатории должен храниться как минимум недельный запас дезинфицирующих средств)

- Капельница
- Кислота уксусная
- Книга учета
- Колбы круглодонные термостойкие, 1000 мл
- Компьютер персональный
- Конверты почтовые (формат А4)
- Крафт-бумага
- Марля медицинская
- Маска медицинская
- Масло иммерсионное
- Микологический крючок
- Микропробирки полимерные 1,5 мл типа Eppendorf
- Микроскопы световые, увеличение от 15х до 400х, например, «Биолам-И», «Микмед-6» с цифровой видеокамерой
- Оборудование для криоконсервации
- Оборудование для лиофилизации
- Папки для бумаг на кольцах
- Пастеровские пипетки
- Пинцет
- Пипетки стерильные градуированные, 3 мл
- Покровное стекло, 24x24 мм
- Порошок моющий «Лотос»
- Предметное стекло, 26x75x1 мм
- Принтер
- Пробирки стеклянные биологические, 20 мл
- Резиновые груши или спринцовки
- Резиновые перчатки
- Сканер
- Спирт
- Спички
- Среды питательные
- Стакан высокий термостойкий со шкалой, 600 мл
- Термостаты
- Файлы для документов
- Халат лабораторный

- Холодильники
- Цилиндры измерительные для растворов, 1000 мл
- Чашки Петри пластиковые стерильные, 90 мм
- Шапочка медицинская одноразовая
- Шпатель металлический GLORIA
- Электронные технические весы с погрешностью взвешивания 20 мг

2 Сопроводительные документы, необходимые при введении культуры микроорганизма в коллекционный фонд ВКМ

Введение культуры микроорганизма в коллекционный фонд ВКМ выполняется на основании Заявления на имя руководителя ВКМ, поданного от Заявителя (депозитора).

Заявление, оформленное на бланке организации по форме, приведенной в Приложении 1, должно содержать:

1) полное и сокращенное название Организации-заявителя, юридический и фактический адреса, адрес для переписки и телефон контактного лица с указанием его имени, отчества и фамилии;

2) цель введения культуры в коллекцию (публикация в связи с описанием новой таксономической единицы; публикация нормативных документов, в которых указывается данная культура; в связи с уникальными свойствами микроорганизма; изолирован из уникального природного источник и т.д.);

3) название передаваемого в фонд ВКМ штамма микроорганизма;

4) опознавательную ссылку (номер, символ и т.п.), присвоенную штамму микроорганизма Заявителем.

Заявление о введении культуры должно быть подписано руководителем Организации-заявителя или иным лицом, уполномоченным на это учредительными документами юридического лица, с указанием его должности. Подпись скрепляется печатью юридического лица. В случае, если штамм сдается физическим лицом, в заявлении должны быть указаны сведения о его месте работы и содержаться подпись физического лица.

Вместе с заявлением Заявитель предоставляет заполненные на русском и английском языках информационные формы с данными о штамме (Приложения 2 и 3 – для мицелиальных грибов и дрожжей, Приложение 4 – для бактерий и архей).

В информационных формах приводятся данные о штамме, в том числе:

а) указание известных Заявителю свойств штамма, которые являются опасными для жизни и здоровья человека, животных или окружающей среды или указание о том, что Заявителю неизвестно о таких свойствах;

б) указание известных Заявителю характеристических свойств штамма, включая морфологические, биохимические, физиологические, генетические и другие, описывающие фенотип и генотип данной культуры или указание о том, что Заявителю неизвестно о таких свойствах;

в) предоставление микро- и макрофотографий в электронном виде;

г) другие.

По требованию ВКМ Заявитель обязан представить заключение о проверке патогенности штамма и его биобезопасности.

3 Порядок действий сотрудников ВКМ по введению культуры микроорганизма в коллекционный фонд:

1) При получении заявления с Приложениями сотрудник группы информации и координации отдела ВКМ вносит запись в книгу учета писем-заявлений. Заявление регистрируют в порядке сквозной нумерации. Каждому письму-заявке присваивается уникальный входящий номер.

При этом указывается:

- название Организации-заявителя,
- исходящий номер письма,
- название культуры микроорганизма,
- обозначение культуры микроорганизма (опознавательная ссылка),
- фамилия куратора группы микроорганизмов отдела ВКМ, ответственного за прием культуры микроорганизма по данному письму.

2) Зарегистрированное заявление передается куратору группы микроорганизмов ВКМ (бактерий, актиномицетов, анаэробных микроорганизмов, мицелиальных грибов, дрожжей).

3) Куратор определяет принципиальную возможность введения данной культуры микроорганизма в коллекционный фонд и назначает ответственного сотрудника группы, к которой относится данная культура. На письме-заявке куратор группы ВКМ ставит визу «Штамм микроорганизма (название, опознавательная ссылка) может быть введен в коллекцию под номером...» или «Во введении штамма микроорганизма (название, опознавательная ссылка) отказать» с указанием причины отказа, свою подпись и дату.

На этом этапе отказ во введении культуры микроорганизма в фонд может быть обусловлен тем, что:

а) штамм не принадлежит ни к одной из категорий микроорганизмов, поддержание которых может быть произведено в ВКМ;

б) свойства штамма микроорганизма настолько исключительны, что ВКМ

технически не способна выполнять в отношении этого организма функции депозитария.

в) указанный вид культуры микроорганизма значится в 1-2 группах патогенности согласно Приложению 1 «Классификация микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний...» к Санитарно-эпидемиологическим правилам СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами», в ред. Дополнений и изменений N 2, утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.06.2011 N 86.

4) При положительном решении о введении культуры микроорганизма в фонд ВКМ, сотрудник группы информации и координации отдела ВКМ готовит проект Договора о передаче штамма микроорганизма от Заявителя на безвозмездной основе (Приложение 5). Договор подписывается двумя сторонами – руководителем ИБФМ РАН (или его заместителем) и Заявителем. Договор скрепляется печатями.

Один экземпляр Договора и экземпляры информационных форм на штамм передаются куратору штамма, ответственному за его введение в коллекционный фонд и дальнейшее хранение. Экземпляры Договоров подшиваются в специальные папки и хранятся в архиве коллекции данной группы организмов. Второй экземпляр Договора сотрудник группы информации и координации передает или высылает по почте Заявителю.

#### 4 Работа с культурой микроорганизма

Культура микроорганизма принимается в пробирках (не менее 3-х).

Куратор культуры микроорганизма проводит работу в соответствии с СОП по проверке жизнеспособности и СОП по проверке аутентичности культуры микроорганизма. Проверку на аутентичность производят в соответствии с требованиями следующих документов:

- «Стандартная операционная процедура по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда дрожжей и мицелиальных грибов»;
- «Стандартная операционная процедура по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда бактерий и архей»;
- «Стандартная операционная процедура по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда мицелиальных актиномицетов».

Если полученный экземпляр не содержит жизнеспособный штамм микроорганизма, указанный в заявлении, или загрязнен примесями других микроорганизмов, Заявителю должно быть отказано во введении в фонд ВКМ до предоставления штамма в надлежащем качестве. Все разногласия по проверке жизнеспособности штамма решаются в комиссионном порядке.

## 5 Информационная работа с культурой микроорганизма

Если штамм прошел проверку на чистоту и жизнеспособность с положительным результатом, куратор штамма проводит его регистрацию в коллекции, а именно:

а) вносит название штамма в реестр коллекционных культур, с присвоением уникального коллекционного номера;

б) вносит в реестр дополнительную известную информацию о штамме в соответствии с информационной формой (источник выделения и ФИО человека, выделившего данный штамм, источник получения штамма, название организации, предоставившей штамм, номер штамма в данной организации и т.д.);

в) вносит всю доступную информацию в базу данных о коллекционных культурах, поддерживаемую на электронных носителях;

г) вносит изменения в Каталог культур ВКМ (совместно с группой информации и координации);

д) вносит данные о штамме в рабочий журнал по хранению коллекционных культур различными методами, резервируя определенное свободное место с учетом необходимости внесения последующих многолетних записей по результатам проверки его аутентичности и жизнеспособности;

## 6 Подбор методов длительного хранения и консервации

Куратор культуры проводит закладку штамма микроорганизма на длительное хранение различными методами (лиофилизация, криоконсервация и другие) в соответствии с СОП по определению оптимальных методов консервации для новых штаммов при пополнении фонда культур ВКМ, а затем ведет проверку жизнеспособности штамма в течение всего срока хранения в соответствии с СОП по проверке жизнеспособности и аутентичности культур микроорганизмов.

Заявителю выдается реплика после закладки на длительное хранение культуры для проверки на аутентичность, выживаемость и чистоту. Заявитель предоставляет в ВКМ Справку о проверке депонируемой культуры после консервации.

## 7 Предоставление введенных штаммов Заявителю

По просьбе Заявителя ВКМ бесплатно выдает реплики штамма и Свидетельства о его жизнеспособности не чаще одного раза в 3 года в соответствии с СОП по выдаче культур микроорганизмов из ВКМ и СОП по проверке жизнеспособности штаммов. В остальных случаях проверка жизнеспособности с предоставлением соответствующих справок проводится за плату.

8 Формы документов (Приложения к СОП по введению культуры микроорганизма в открытый коллекционный фонд ВКМ).

*На бланке организации*

Зав. отделом "Всероссийская  
коллекция микроорганизмов"  
д.б.н. Л.И. Евтушенко  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт биохимии и  
физиологии микроорганизмов им. Г.К.  
Скрябина Российской академии наук  
142290, Московская обл., г. Пущино  
пр. Науки, 5

Организация \_\_\_\_\_

*название организации*

просит Вас принять на хранение и включить в открытый фонд ВКМ ИБФМ РАН  
штамм(ы) \_\_\_\_\_

*название микроорганизма и номер штамма*

Привести обоснование целесообразности помещения в открытый фонд ВКМ штамма(ов)  
(в свободной форме, напр.: *штамм представляет интерес для научных (научно-  
прикладных) исследований, связанных с ..... , является представителем слабо изученного  
таксона микроорганизмов, изолятом из уникального природного источника – .....,  
продуцентом .....и т.д.)*

Информационные формы или Паспорт на штамм(ы) прилагается.

Руководитель организации:

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

**Форма для введения культуры в коллекцию**

ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН  
142290, Россия, Московская обл., г.Пушино,  
проспект Науки, 5  
ФАКС: +7(495) 9563370; ТЕЛ: +7(495) 9257448  
E-mail: VKM@ibpm.pushchino.ru

Заполняется в ВКМ	
Номер ВКМ	_____
Дата получения штамма м/о:	_____
Дата введения в коллекцию	_____

**Введение в коллекцию с целью открытого доступа**

Фамилия, Имя, Отчество Заявителя _____	
Организация: _____	
Адрес: _____	
Тел.: _____	Факс: _____ E-mail: _____
Научное название организма и его автор(ы)*: _____	
Статус штамма: (нео) тип (оставить нужное)	<input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Нет
Исходное обозначение штамма депозитором: _____	
Номера штамма в других коллекциях: _____	

**История штамма:**

Источник выделения**:		_____
Географический регион (район, область, страна)***		_____
Выделен кем:	_____	_____
Идентифицирован кем:	_____	_____
Идентифицирован как:	_____	_____ дата

*В случае, если не Вы выделили данный штамм, пожалуйста, укажите исследователя или коллекцию, из которой Вы получили данный штамм, дату получения, наименование штамма в момент получения, его обозначение и предыдущую историю, если она известна:*

*откуда: \_\_\_\_\_ дата: \_\_\_\_\_ название: \_\_\_\_\_ номер: \_\_\_\_\_*  
*откуда: \_\_\_\_\_ дата: \_\_\_\_\_ название: \_\_\_\_\_ номер: \_\_\_\_\_*

**Рекомендуемые условия культивирования:**

Среда (состав)*:	_____
------------------	-------

Отношение к кислороду (оставить нужное):	<input type="checkbox"/> Аэробный, <input type="checkbox"/> анаэробный
Температура °С:	_____
Особые условия для роста:	_____

**Хранение:**

Методы хранения (оставить нужное):	<input type="checkbox"/> Криоконсервация, <input type="checkbox"/> лиофилизация, <input type="checkbox"/> неизвестно
Рекомендуемые условия (жидкость для суспендирования, криопротектор, скорость замораживания, другие.):	_____

Штамм патогенен для (оставить нужное): \_\_\_\_\_

<b>Человека:</b>	Да, нет, неизвестно	<b>Животных:</b>	Да, нет, неизвестно	<b>Растений:</b>	Да, нет, неизвестно
------------------	---------------------	------------------	---------------------	------------------	---------------------

Специальные свойства и прикладное значение\*:

Генетическая последовательность (можно указать номер в Генбанке):

Любая дополнительная информация, которую хочет сообщить депозитор:

*Я согласен передать данный штамм во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов. Я поручаю ВКМ внести информацию о данном штамме в Каталог ВКМ и Базы Данных, а также распространять реплики штамма за соответствующую плату.*

Дата: \_\_\_\_\_

Подпись депозитора: \_\_\_\_\_

- \* Пожалуйста, укажите литературные ссылки и приложите ксерокопии, если возможно
- \*\* С указанием анатомической части растения, типа почвы и др. подробностей об источнике выделения
- \*\*\* Если известно, укажите географические координаты или локализацию места отбора образца

**ACCESSION FORM**

VKM - All-Russian collection of microorganisms  
 G.K.Skryabin Institute of Biochemistry  
 and Physiology of Microorganisms  
 Pushchino, Moscow region, 142290, Russia  
 FAX: +7 (495) 9563370 TEL: +7(495) 925 7448  
 E-mail: VKM@ibpm.pushchino.ru

VKM use only	
VKM accession No.:	_____
Date received:	_____
Date accessed:	_____

**Deposit for Public Access**

Name of depositor _____		
Institution: _____		
Address: _____		
Tel.: _____	Fax: _____	E-mail address: _____
Scientific name of organism and author(s)*: _____		
Strain status: (neo) type (mark)	Yes	No
Depositor's strain reference number: _____		
Accession number in other collections: _____		

**Origin of the strain:**

Source of isolation**:		
Geographical origin (locality, state, country)**:		
Isolated by _____	_____	date: _____
Identified by _____	_____	date: _____
Identified as: _____		

*If you did not isolate this strain*, please indicate the individual or collection from whom you received the strain, the date of receipt, the name of the strain at the time of receipt, and its former history if known:

from: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_\_ name: \_\_\_\_\_ number: \_\_\_\_\_  
 from: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_\_ name: \_\_\_\_\_ number: \_\_\_\_\_

**Recommended conditions for growth:**

Medium ( <i>attach formula</i> )*:

Oxygen demand (mark): _____	Aerobic, anaerobic
Temperature °C: _____	
Special requirements for growth: _____	

**Preservation:**

Methods of preservation (mark): _____	Cryopreservation, lyophilisation, unknown
Recommended conditions (suspending fluid, cryoprotectant, cooling rate, etc.): _____	

**The strain is pathogenic for (mark):**

<b>Man:</b> _____	Yes, no, unknown	<b>Animals:</b> _____	Yes, no, unknown	<b>Plants:</b> _____	Yes, no, unknown
-------------------	------------------	-----------------------	------------------	----------------------	------------------

Special features and applications*:

Nucleotide sequence(s) (enter accession number of GenBank, if available)

Other remarks:

I agree to deposit this culture in the VKM Culture Collection. I authorize VKM to catalogue and Data Bases the strain data and to distribute batches for a fee covering expenses.

Date: \_\_\_\_\_

Signature of depositor: \_\_\_\_\_

- \* Please refer to literature and attach reprints, if available*
- \*\* With indication of the anatomical part of the plant, the type of soil and other details about the source of isolation*
- \*\*\* If known, specify the geographical coordinates or localization of the sampling site*

**ПАСПОРТ ШТАММА**

Обозначение штамма (рекомендация – если используются буквенные символы в обозначении штамма, писать латинскими буквами): \_\_\_\_\_

Номера штамма в других коллекциях: \_\_\_\_\_

Научное название организма и его автор(ы): \_\_\_\_\_

**История штамма:**

Источник выделения:

(рус) \_\_\_\_\_,

(англ) \_\_\_\_\_

Географический регион (район, область, страна):

(рус) \_\_\_\_\_,

(англ) \_\_\_\_\_

Выделен кем:

(рус) \_\_\_\_\_,

(англ) \_\_\_\_\_

Дата: \_\_\_\_\_

Идентифицирован кем:

(рус) \_\_\_\_\_,

(англ) \_\_\_\_\_

Дата: \_\_\_\_\_

На основании каких признаков и по каким определителям штамм был идентифицирован:

*В случае, если не Вы выделили данный штамм, пожалуйста, укажите исследователя или коллекцию, из которой Вы получили данный штамм, дату получения, наименование штамма в момент получения, его обозначение и предыдущую историю, если она известна:*

*откуда:* \_\_\_\_\_ *дата:* \_\_\_\_\_ *название:* \_\_\_\_\_ *номер:* \_\_\_\_\_

*откуда:* \_\_\_\_\_ *дата:* \_\_\_\_\_ *название:* \_\_\_\_\_ *номер:* \_\_\_\_\_

**ХАРАКТЕРНЫЕ ПРИЗНАКИ:**

1. Морфология: \_\_\_\_\_

2. Размер клеток: \_\_\_\_\_

3. Клеточная стенка и реакция по Граму (указать метод анализа): \_\_\_\_\_

3. Спорообразование, количество, расположение в клетке и форма спор: \_\_\_\_\_

4. Тип деления, почкование: \_\_\_\_\_

5. Простеки: \_\_\_\_\_

6. Подвижность: \_\_\_\_\_ 7. Жгутикование: \_\_\_\_\_
8. Пигментация колоний/биомассы на стандартной среде (для фотосинтезирующих бактерий указать также тип фотосинтетического аппарата и хлорофилла): \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
9. Выделяемый в среду пигмент: \_\_\_\_\_
10. Селективные тест-среды (если существуют) и характерные признаки роста на этих средах: \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
11. Оксидаза: \_\_\_\_\_ 12. Каталаза: \_\_\_\_\_
13. Отношение к кислороду: \_\_\_\_\_ 14. Рост при Eh: \_\_\_\_\_
15. Используемые источники углерода: \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
16. Проверенные неиспользуемые источники углерода: \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
- (примечание к пп. 15 и 16: отметить возможность аэробного роста на ацетате и цитрате – ключевых субстратов для ряда видов)
17. Аэробно окисляемые неорганические субстраты – источники энергии (сера, тиосульфат, железо, аммоний, нитрит): \_\_\_\_\_
18. Акцепторы электронов при анаэробном дыхании (нитрат, нитрит, тиосульфат, сера, карбонат): \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
19. Используемые источники углерода при анаэробном дыхании: \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
20. Проверенные неиспользуемые источники углерода при анаэробном дыхании: \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
21. Сбраживаемые соединения углерода: \_\_\_\_\_
22. Продукты брожения: \_\_\_\_\_
23. Отношение к рН: \_\_\_\_\_ 24. Отношение к NaCl: \_\_\_\_\_
25. Отношение к температуре: \_\_\_\_\_
26. Оптимальная температура культивирования: \_\_\_\_\_
27. Отношение к антибиотикам: \_\_\_\_\_
28. Цитохромы: \_\_\_\_\_ 29. Менахиноны: \_\_\_\_\_
30. Тип пептидогликана, качественный состав: \_\_\_\_\_
31. Сахара клеточной стенки (целых клеток): \_\_\_\_\_
32. Миколовые кислоты: \_\_\_\_\_
33. Тейхоевые кислоты: \_\_\_\_\_
34. Фосфолипидный состав: \_\_\_\_\_
35. Полиамины: \_\_\_\_\_
36. Доминирующие жирные кислоты: \_\_\_\_\_
37. % ГЦ: \_\_\_\_\_
38. Потребность в факторах роста или специальных добавках: \_\_\_\_\_
39. Данные секвенирования гена 16S рРНК и других генов, номер регистрации последовательности в ГенБанке: \_\_\_\_\_

40. Дополнительные сведения: \_\_\_\_\_

41. Используемая литература: \_\_\_\_\_

(\* Примечание: пункты, содержание которых не используется в таксономической характеристике определенных групп бактерий, можно удалить при заполнении паспорта)

Любая дополнительная информация, которую хочет сообщить депозитор: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Рекомендуемые условия культивирования:**

Среда (состав)\*: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Аэробный  Анаэробный  Температура °C: \_\_\_\_\_

Особые условия для роста: \_\_\_\_\_

*\*Пожалуйста, укажите литературные ссылки и приложите ксерокопии, если возможно*

**Хранение:**

Криоконсервация:  Лиофилизация:  Неизвестно

Рекомендуемые условия (жидкость для суспендирования, криопротектор, скорость замораживания, другие.): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Штамм патогенен для:**

Человека: Да  Нет  Неизвестно

Животных: Да  Нет  Неизвестно

Растений: Да  Нет  Неизвестно

**Специальные свойства и прикладное значение:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Штамм был патентован: Да  Нет , номер патента: \_\_\_\_\_

Ограничения по распространению или требования безопасности: \_\_\_\_\_

Полное и сокращенное наименование организации-депозитора, адрес и телефон:

(рус) \_\_\_\_\_,

(англ) \_\_\_\_\_

Авторский коллектив (фамилии, и.о. всех авторов штамма (рус) и (анг.)):

указать телефон контактного лица), подписи авторов:

Подпись лица, заверяющего подписи авторов.

Печать

Дата

**ДОГОВОР №**  
по введению культур микроорганизмов в коллекционный фонд  
Всероссийской коллекции микроорганизмов

г. Пущино  
Организация

"\_\_" \_\_\_\_\_ 201\_ г.

(наименование Организации-заявителя)

именуемая «Заказчик», с одной стороны, и *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина Российской академии наук*, Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ) именуемое в дальнейшем «Исполнитель», в лице заместителя директора Института д.б.н. М.Б. Вайнштейна, действующего на основании доверенности № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_ 201\_ г., с другой стороны, заключили настоящий договор о нижеследующем.

### **1. Предмет договора**

**1.1.** Исполнитель принимает на себя обязательства по введению культур микроорганизмов, указанных в **Приложении 1**, в коллекционный фонд Всероссийской коллекции микроорганизмов, а Заказчик предоставляет культуры микроорганизмов, информацию о них в виде информационных форм, заполненных по соответствующему стандарту и передает все права пользования исполнителю.

**1.2.** Приложения 1-3 являются неотъемлемой частью Договора.

### **2. Права и обязанности сторон**

#### **2.1. Исполнитель обязуется:**

2.1.1. Предоставить Заказчику Справку (Certificate) о введении культур микроорганизмов в коллекционный фонд Всероссийской коллекции микроорганизмов и его доступности на сайте ВКМ – на русском или английском языках (Приложение 2).

#### **2.2. Заказчик обязан:**

2.2.1. Провести проверку жизнеспособности, чистоты и аутентичности культур, указанных в Приложении 1 в течение 2 (двух) месяцев после предоставления Исполнителем реплик штаммов, заложенных на длительное хранение в ВКМ.

2.2.2. Выдать Исполнителю Справку о результатах проверки (Приложение 3).

#### **2.3. Заказчик имеет право:**

2.3.1. Проверить выполнение Исполнителем Договора по наличию информации о введении культур микроорганизмов в коллекционный фонд Всероссийской коллекции микроорганизмов и его доступности на сайте ВКМ: <http://www.vkm.ru>.

### **3. Цена договора и порядок расчетов**

3.1. Все работы по договору совершаются на безвозмездной основе.

### **4. Порядок разрешения споров**

4.1. Споры и разногласия, которые могут возникнуть при исполнении настоящего договора, будут по возможности разрешаться путем переговоров между сторонами.

## 5. Заключительные положения

5.1. Любые изменения и дополнения к настоящему договору действительны лишь при условии, что они совершены в письменной форме и подписаны уполномоченными на то представителями сторон. Приложения к настоящему договору составляют его неотъемлемую часть.

5.2. Настоящий договор составлен в двух экземплярах на русском языке. Оба экземпляра идентичны и имеют одинаковую силу. У каждой из сторон находится один экземпляр настоящего договора.

**Заказчик:**

**Исполнитель: ИБФМ РАН**

	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН, ВКМ)
	Адрес: 142290, Московская область, г. Пущино, Проспект Науки, д.5
	Заместитель директора, д.б.н., профессор М.Б. Вайнштейн _____

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

Стандартная операционная процедура по хранению культур методом субкультивирования.

Составлено: С.М. Озерская, д.б.н., зав. лабораторией.

Содержание и назначение: Определяет протокол по хранению культур микроорганизмов в методом субкультивирования.

Местонахождение: Отдел ВКМ, ИБФМ РАН.

Пересмотр: при необходимости

Хранение культур микроорганизмов методом субкультивирования в ВКМ осуществляется при температурах от 5°C до 20°C с использованием бытовых холодильников и холодных комнат.

1 Подготовка культур для хранения.

1.1 Бактериальные культуры выращивают в пробирках, 4-6 пробирок на штамм, в соответствии с рекомендациями по культивированию для каждого штамма.

1.2 Обертывают пробку, захватывая верхнюю часть пробирки, парафильмом (VWR Scientific, Inc.; № 52858-000) или полиэтиленом, закрепленным резинкой.

1.3 Пробирки ставят в штатив.

1.4 Штатив с пробирками помещают в бытовой холодильник или холодную комнату.

2 Документирование.

Сведения о местонахождении каждого штамма (номер штатива, номер холодильника или холодной комнаты), даты пересева документируют в компьютерной базе данных и/или журнале консервации культур.

3 Хранение.

Период хранения (от 3 до 5 месяцев) для каждой культуры индивидуальный. В течение хранения проводят проверку пробирок 1-2 раза в месяц на предмет выявления высыхания среды и роста посторонней микрофлоры.

4 Пересев.

4.1 Пересев культуры проводят через определенный период хранения на соответствующую питательную среду в пробирке и чашке Петри для проверки на чистоту.

4.2 Культивирование проводят в соответствии с рекомендациями для штамма.

5 Оценка жизнеспособности культур.

Оценку жизнеспособности культуры осуществляют по наличию роста после соответствующего периода культивирования.

Результат документируют.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Стандартная операционная процедура по лиофилизации культур ВКМ с использованием разных режимов первичной и вторичной сушки.

Составлено: С.М. Озерская, д.б.н., зав. лабораторией.

Содержание и назначение: Определяет протокол по лиофилизации культур ВКМ с использованием разных режимов первичной и вторичной сушки.

Местонахождение: Отдел ВКМ, ИБФМ РАН.

Пересмотр: при необходимости.

Ллиофилизация культур микроорганизмов ВКМ осуществляется с помощью двухэтапного процесса с использованием следующего оборудования.

Оборудование:

- Автоклав - стерилизатор паровой ВК-75 для убивки отработанного материала
- Автоклав вертикальный программир. MLS 3750 для стерилизации
- Адаптер для констриктора ампул/788/18,09,08
- Весы ВЛТЭ-500 (ВТЛ-500)/1555
- Водяная баня ЛВ-4
- Камера холодильная из пенополиуретан. панелей
- Микроскоп световой "Биолам-И"
- Термостат с водяной рубашкой НП-3
- Установка MicroModulyo-230 (фирма ThermoElectron, США)
- Установка лиофильной сушки LYOLAB 3000 в комплекте
- Холодильник "Зил"
- Шкаф сушильно-стерилизац.ШСС-250п

Ллиофилизация культур микроорганизмов ВКМ состоит из ряда последовательных процедур, включающих подготовку материалов, культур и собственно процесса лиофилизации.

### 1 Подготовка ампул

Стеклянные ампулы (нейтральное стекло, диаметр 7 мм, длина 110 мм):

- промывают последовательно детергентом, проточной водопроводной водой и дистиллированной водой, высушивают;
- тампонируют рыхлыми тампонами хлопковой ваты на глубину 1 см от края ампулы;
- маркируют с нанесением номера культуры и даты лиофилизации (месяц, год)
- стерилизуют сухим жаром при 160°C, 2 часа.

## 2 Подготовка защитной среды.

2.1 Для культур мицелиальных грибов используют натуральное снятое молоко, сепарированное три раза, или сухое молоко для бактериологических целей (Difco, США) в концентрации 10%.

### Защитную среду

- разливают в стеклянные пробирки (20 мл) по 5 мл;
- 3 раза стерилизуют текучим паром и проверяют стерильность путем инкубации 3 суток при 37°C;
- хранят при 5°C не более 1 месяца.

2.2 Для культур бактерий, включая актиномицеты, и дрожжей используют либо сахарозо-желатиновый агар (СЖА) (10% сахарозы, 1,5% желатина, 0,1% агар-агара в дистиллированной воде), либо натуральное снятое молоко, сепарированное три раза, или сухое молоко для бактериологических целей (Difco, США) в концентрации 10%.

### 2.2.1 СЖА

- разливает в стеклянные пробирки (12 мл) по 5 мл;
- стерилизуют при 1 атм, 20 мин.

2.2.2 Натуральное снятое молоко, сепарированное три раза, или сухое молоко для бактериологических целей фирмы (Difco, США) в концентрации 10%

- разливают в стеклянные пробирки (12 мл) по 5 мл;
- 3 раза стерилизуют текучим паром и проверяют стерильность путем инкубации 3 суток при 37°C .

2.3 Защитные среды хранят при 5°C не более 1 месяца.

3. Подготовка культур микроорганизмов перед лиофилизацией осуществляют в соответствии со «Стандартной операционной процедурой по подготовке к криоконсервации культур микроорганизмов ВКМ разных таксономических групп» с использованием вместо криопротектора адекватной защитной среды для лиофилизации.

Подбор адекватной защитной среды для лиофилизации, обеспечивающей гарантированное сохранение жизнеспособности культуры данного штамма, производят:

- для штаммов ВКМ – по каталогу ВКМ, где дана ссылка на соответствующую методику,
- для депонируемых культур – по сведениям депозитора,
- для оригинальных штаммов/изолятов – по сведениям соответствующих данных литературы, каталогов других коллекций или авторов.

#### 4 Заполнение ампул.

4.1 В подготовленные ампулы заливают около 0,2 мл суспензии клеток микроорганизмов или спор в случае спорогенных микроорганизмов. Процедуру проводят в стерильных аэробных условиях с использованием пастеровских пипеток.

4.2 Один образец суспензии используют для определения жизнеспособности культуры перед лиофилизацией, для чего его помещают на поверхность агаризованной среды, обеспечивающей оптимальный рост культуры.

#### 5 Лيوфилизация мицелиальных грибов.

##### 5.1 I ступень высушивания (первичная сушка).

5.1.1 Образцы помещают в сублиматор лиофильной сушки (для первого этапа высушивания), включают центрифугирование и через 1 – 2 мин откачивают воздух, что приводит к замораживанию образцов вследствие быстрого испарения воды.

5.1.2 Через 15 – 20 мин центрифугу выключают и образцы высушивают за счет сублимации льда в течение 3 часов при давлении 0,15 – 0,20 мм рт.ст. (температура рефрижератора – 45°C) до остаточной влажности 5 – 10%.

5.1.3 По окончании I ступени высушивания вакуумный насос выключают, систему заполняют воздухом, ампулы извлекают из сублиматора.

##### 5.2 Подготовка ампул для II ступени высушивания.

Для облегчения последующей отпайки ампул в условиях пониженного давления в них («под вакуумом») производят перетяжку ампул до диаметра 2 – 3 мм на расстоянии 50 мм от дна ампулы с использованием констриктора ампул.

##### 5.3 II ступень высушивания (вторичная сушка).

5.3.1 Ампулы подсоединяют к резиновым ниппелям сушки MicroModulyo-230 (фирма ThermoElectron, США).

5.3.2 В ампулах создается разрежение до 0,15 – 0,20 мм рт. ст. и в течение 2,5 ч производится досушивание до остаточной влажности 2 – 5%.

5.3.3 Ампулы отпайвают в области перетяжки с помощью газовой горелки.

5.4 Оценивают наличие разреженной атмосферы в ампулах («вакуум») с помощью высокочастотного тестера (Edwards, Великобритания). Удовлетворительным считается наличие в ампулах характерного свечения голубого или слегка лилового оттенка.

##### 5.5 Контроль жизнеспособности культур.

5.5.1 Через 24 часа после лиофилизации поверхность контрольной ампулы стерилизуют 70% этиловым спиртом и вскрывают после нанесения на стекле насечки с использованием алмазного стеклореза или металлического надфиля.

5.5.2 В ампулу с помощью пастеровской пипетки вносят 0,2 – 0,3 мл стерильной водопроводной воды для регидратации.

5.5.3 Через 30 мин (после полной регидратации) суспензию слегка пипетируют пастеровской пипеткой и помещают на поверхность агаризованной среды, обеспечивающей оптимальное развитие культуры.

#### 5.6 Хранение.

Ампулы с образцами хранят при 5 – 8°C в темноте.

#### 6 Лиофилизация бактерий, включая актиномицеты, и дрожжей.

##### 6.1 I ступень высушивания (первичная сушка).

6.1.1 Образцы помещают в сублиматор лиофильной сушки, включают центрифугирование и через 1 – 2 мин откачивают воздух, что приводит к замораживанию образцов вследствие быстрого испарения воды.

6.1.2 Через 15 – 20 мин центрифугу выключают и образцы высушивают за счет сублимации льда в течение 4 часов при температуре сублиматора 23 - 25°C и давлении  $0,04 \pm 0,002$  мм.рт.ст. (температура холодильника –50 °C) до остаточной влажности 5 – 10%.

6.1.3 По окончании I ступени высушивания вакуумный насос выключают, систему заполняют воздухом, ампулы извлекают из сублиматора.

##### 6.2 Подготовка ампул для II ступени высушивания.

Для облегчения последующей отпайки ампул в условиях пониженного давления в них («под вакуумом») производят перетяжку ампул до диаметра 2 – 3 мм на расстоянии 50 мм от дна ампулы с использованием констриктора ампул.

##### 6.3 II ступень высушивания (вторичная сушка).

6.3.1 Ампулы подсоединяют к резиновым ниппелям установки для вторичной сушки.

6.3.2 В ампулах создается разрежение до  $1,0 \pm 0,2$  мм рт. ст. и в течение 0,5 ч производится досушивание.

6.3.3 Ампулы отпавляют в области перетяжки с помощью газовой горелки.

6.4 Оценивают наличие разреженной атмосферы в ампулах («вакуум») с помощью высокочастотного тестера (Edwards, Великобритания). Удовлетворительным считается наличие в ампулах характерного свечения голубого или слегка лилового оттенка.

6.5 Конец ампулы, который подвергался запаиванию газовой горелкой, покрывается расплавленным сургучом для герметизации потенциальных микротрещин.

## 6.6 Контроль жизнеспособности культур.

6.6.1 Через 24 часа после лиофилизации поверхность контрольной ампулы стерилизуют 70% этиловым спиртом и вскрывают после нанесения на стекле насечки с использованием алмазного стеклореза или металлического надфиля.

6.6.2 В ампулу с помощью пастеровской пипетки вносят 0,2 – 0,3 мл стерильной водопроводной воды, физраствора или иной адекватной для регидратации данной культуры жидкости.

6.6.3 Через 30 мин (после полной регидратации) суспензию слегка пипетируют пастеровской пипеткой и помещают на поверхность агаризованной среды, обеспечивающей оптимальное развитие культуры.

## 6.7 Хранение.

Ампулы с образцами хранят при 5 – 8°C в темноте.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Стандартная операционная процедура по криоконсервации культур бактерий с использованием системы «КРИОБАНК».

Составлено: Е.Б. Кудряшова, к.б.н., с.н.с, руководитель сектора.

Содержание и назначение: Определяет протокол по криоконсервации культур бактерий с использованием системы «КРИОБАНК».

Местонахождение: Отдел ВКМ, ИБФМ РАН.

Пересмотр: при необходимости.

Криоконсервация культур бактерий осуществляется при температурах от – 60°C до – 70°C в низкотемпературных холодильниках (SANYO Electric Co. Ltd., Япония).

Оборудование и материалы:

- Весы электронные OHAUS, 0.01 г;
- рН-метр Аквилон;
- Мешалка магнитная;
- Автоклавы для стерилизации и убивки отработанного материала;
- Стерилизатор суховоздушный;
- Дистилляционная установка;
- Холодильник бытовой с морозильной камерой -20°C;
- Морозильная камера SANYO, -70°C;
- Термостатная комната, +24°C, +28°C;
- Термостаты;
- Термометры;
- Термостаты с качалкой;
- Микроанаэроустат;
- Газовые баллоны с газовой смесью;
- Печь микроволновая;
- Вортекс Microspin FV-2400 (BioSan);
- Система «КРИОБАНК»;
- Компьютер персональный;
- Книга учета;
- Штатив для пробирок;
- Штатив охлаждающий;

- Бокс для микробиологических работ;
- Источник с бактерицидными лампами;
- Газовая горелка;
- Бактериологическая петля;
- Чашка Петри;
- Колба коническая, 100 мл, 200 мл, 250 мл;
- Пробирка стеклянная, 20 мл, 50 мл;
- Цилиндр мерный, 100 мл;
- Стакан термостойкий со шкалой, 250 мл;
- Пипетка стеклянная градуированная, 1 мл, 10 мл;
- Пипетка пастеровская стеклянная стерильная;
- Спирт 70°;
- Дезинфицирующие растворы;
- Перекись водорода;
- Вода дистиллированная стерильная;
- Химические реактивы, необходимые для приготовления питательных сред для архей, бактерий, в том числе актинобактерий;
- Готовые (фирменные) питательные среды для бактерий, в том числе актинобактерий;
- Вата хлопковая гигроскопическая;
- Моющее средство для стекла.

## 1 Подготовка культур для криоконсервации

1.1 Бактериальную культуру выращивают, в соответствии с рекомендациями по культивированию для данного штамма.

## 2 Использование готовой системы «Криобанк».

2.1 Достают из упаковки готовую к использованию криопробирку с бусинами и криопротектором.

## 3 Заполнение криопробирки с бусинами бактериальной культурой.

3.1 Выращенную на плотной питательной среде бактериальную культуру снимают бактериальной петлей и переносят в криопробирку с бусинами, с соблюдением правил асептики.

3.2 Бактериальную культуру, выращенную на жидкой питательной среде, декантируют.

3.3 Осадок (бактериальную биомассу) собирают с использованием пастеровской пипетки и переносят в криопробирку с бусинами, с соблюдением правил асептики.

3.2. Криопробирку мягко встряхивают для того, чтобы обеспечить проникновение микроорганизма в поры бусин.

4 Криопробирку оставляют на ночь при +6°C (в бытовом холодильнике).

5 На следующий день удаляют из криопробирки избыток криопротектора, с соблюдением правил асептики.

6 Плотнo закрывают пробирку, ставят в специальную маркированную коробку с ячейками, в которой местоположение каждой криопробирки однозначно фиксируется в двухкоординатной сетке.

7 Замораживание культур бактерий.

7.1 Коробку помещают в низкотемпературный холодильник с температурой от – 60°C до – 70°C. Скорость охлаждения при этом составляет  $\approx 4^\circ\text{C} / \text{мин}$ .

8 Документирование.

Сведения о местонахождении каждого образца, в виде однозначного «адреса» (положение в двухкоординатной сетке коробки, номер коробки, номер холодильника), документируют в компьютерной базе данных и/или журнале консервации культур.

9 Оживление бактериального образца.

9.1 Извлекают нужную криопробирку из коробки, хранящейся в низкотемпературном холодильнике и помещают в охлаждающий штатив.

9.2. Немедленно, в стерильных условиях стерильной бактериальной петлей достают бусину и переносят в пробирку с жидкой питательной средой либо плотной питательной средой, согласно рекомендациям для данного штамма.

9.3. Культивирование проводят в соответствии с рекомендациями для данного штамма.

9.4. Криопробирку с оставшимися бусинами немедленно помещают в холодильник в коробку на прежнее место.

10 Оценка жизнеспособности культур.

Оценку жизнеспособности культуры осуществляют по наличию роста после соответствующего периода культивирования. Результат документируют.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Стандартная операционная процедура по контролю качества сохранения жизнеспособности коллекционного фонда ВКМ.

Составлено: С.М. Озерская, д.б.н., зав. лабораторий.

Содержание и назначение: Определяет протокол по контролю качества сохранения жизнеспособности коллекционного фонда ВКМ.

Местонахождение: Отдел ВКМ, ИБФМ РАН.

Пересмотр: при необходимости.

### 1. Порядок поддержания коллекционных культур в ВКМ

1.1 Каждая культура коллекционного фонда ВКМ поддерживается ответственным за нее сотрудником группы микроорганизмов (куратором культуры).

1.2. Каждая культура ВКМ должна храниться разными методами (не менее трех) параллельно во избежание ее потери в процессе хранения.

1.3. Каждая культура ВКМ должна храниться в основном и дубликатном фондах параллельно во избежание ее потери в результате возможных катастроф природного или искусственного происхождения

2 Оборудование и материалы, необходимые для идентификации дрожжей и мицелиальных грибов:

- Автоклавы для стерилизации и убивки отработанного материала
- Вата медицинская хлопковая гигроскопическая
- Веревка джутовая
- Вода дистиллированная
- Вода водопроводная стерильная
- Детергент Tween 80
- Дозатор автоклавируемый одноканальный переменного объема V 0,2-20 мкл, наконечники
- Кислота уксусная
- Книга учета
- Колбы плоскодонные термостойкие, 1000 мл
- Компоненты питательных сред
- Компьютер персональный
- Крафт-бумага
- Марля медицинская
- Маска медицинская

- Масло иммерсионное
- Микологический крючок
- Микропробирки полимерные 1,5 мл типа Eppendorf
- Микроскопы световые, увеличение от 15x до 400x, например, «Биолам-И», «Микмед-6» с цифровой видеокамерой
- Микрошпатель с ложечкой и плоским концом
- Петля бактериологическая
- Пипетки стерильные градуированные, 3 мл
- Покровное стекло, 24x24 мм
- Порошок моющий «Лотос»
- Предметное стекло, 26x75x1 мм
- Пробирки стеклянные биологические, 20 мл
- Цилиндры измерительные для растворов, 1000 мл
- Спирт
- Среды питательные для грибов
- Стакан высокий термостойкий со шкалой, 600 мл
- Термостаты
- Чашки Петри пластиковые стерильные, 90 мм
- Халат лабораторный
- Шапочка медицинская одноразовая
- Шпатель металлический GLORIA
- Шпатель микробиологический (Дригальского)
- Электронные технические весы с погрешностью взвешивания 20 мг

### 3 Подготовка и стерилизация посуды, оборудования и сред

3.1 Новую посуду промывают в теплой проточной воде с моющим порошком, затем ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Из гигроскопической медицинской ваты готовят плотные пробки, которые затем обтягивают медицинской марлей. Приготовленными пробками закупоривают колбы и закрывают их крафт-бумагой и обвязывают веревкой. Завернутую в крафт-бумагу чистую посуду стерилизуют в сухожаровом шкафу при температуре 160°C в течение 2-х часов.

3.2 Питательные среды после смешения компонентов помещают в стерильные колбы, а затем стерилизуют в автоклаве одноразово паром. Режим стерилизации зависит от состава среды: 105°C в течение 40 минут или 121°C 30 мин.

#### 4 Состав питательных сред, рекомендуемых для проверки жизнеспособности

4.1 Состав сред для проверки жизнеспособности и условия культивирования варьируют в зависимости от принадлежности организма к определенному роду и основываются на имеющихся в литературе рекомендациях. Химические и природные компоненты, используемые в средах, отбирают металлическим шпателем и взвешивают в стеклянном стакане. После приготовления среды стерилизуют в автоклаве, соблюдая рекомендуемый режим стерилизации.

5 Методы хранения, используемые в ВКМ, и порядок определения жизнеспособности культур

##### 5.1 Криоконсервация

а) Куратор культуры определяет номер культуры и дату криоконсервации, подлежащих проверке жизнеспособности в данный момент. После этого куратор культуры заказывает размораживание требуемых ампул у сотрудников Группы консервации, записывая в соответствующий Журнал требований следующие данные:

номер культуры,  
дату криоконсервации,  
программу криоконсервации,  
количество требуемых ампул,

б) Сотрудник Группы консервации проверяет наличие соответствующих ампул в азотном или низкотемпературном хранилище и сообщает куратору культуры о возможной дате проведения работ по предоставлению размороженной культуры.

в) Сотрудник Группы консервации вынимает ампулу из азотного или низкотемпературного хранилища, проводит ее размораживание в водяной бане с температурой 37°C в течение 1 минуты и затем отмечает в базе данных по учету ампул криоконсервированных культур число размороженных ампул.

г) Куратор культуры проводит высеивание из ампулы на чашку Петри с питательной средой и ставит чашку Петри в термостат с оптимальной температурой для роста проверяемой культуры.

д) Через определенное время культивирования в термостате куратор культуры определяет характер и интенсивность роста культуры микроорганизма. Далее он заносит полученные данные в два журнала – Журнал проверки жизнеспособности культур, заложенных методом криоконсервации (общий для всех кураторов культур данной группы организмов) и Рабочий журнал куратора на соответствующую страницу по ведению данной культуры. Первый из этих двух журналов является основой базы данных ВКМ по хранению

методом криоконсервации и определению максимальных сроков жизнеспособности различных культур при использовании данного метода. Второй журнал используется куратором культуры для анализа результатов определения жизнеспособности разными методами по данной культуре.

### 5.2 Лиофилизация

а) Куратор культуры определяет, какие даты лиофилизации подлежат проверке жизнеспособности для данной культуры в данный момент. Требуемые ампулы куратор вынимает из специальных металлических контейнеров (нержавеющая сталь), находящихся на металлических стеллажах (нержавеющая сталь) в хранилище ВКМ (холодильная камера с температурой 4-5°C).

б) Куратор культуры вскрывает ампулу и проводит высев из ампулы на чашку Петри с питательной средой. Для восстановления культуры ампулы вскрывают следующим образом. Тампоном ваты, смоченным этиловым спиртом, обрабатывают поверхность ампулы. Затем отламывают конец ампулы, пастеровской пипеткой в ампулу добавляют 0,5 мл. стерильной воды. После абсорбции воды в течение 20 минут при комнатной температуре всю суспензию выливают на поверхность питательной среды одной чашки Петри и растирают стерильным микробиологическим шпателем (Дригальского).

Чашку Петри затем переносят в термостат с оптимальной температурой для роста проверяемой культуры.

в) Через определенное время культивирования в термостате куратор культуры определяет характер и интенсивность роста культуры микроорганизма. Далее он заносит полученные данные в два журнала – Журнал проверки жизнеспособности культур, заложенных методом лиофилизации (общий для всех кураторов культур данной группы организмов) и Рабочий журнал куратора на соответствующую страницу по ведению данной культуры. Первый из этих двух журналов является основой базы данных ВКМ по хранению методом лиофилизации и определению максимальных сроков жизнеспособности различных культур при использовании данного метода. Второй журнал используется куратором культуры для анализа результатов определения жизнеспособности разными методами по данной культуре.

### 5.3 Высушивание на силикагеле

а) Куратор культуры определяет, какие даты высушивания на силикагеле и температуры хранения на силикагеле подлежат проверке жизнеспособности для данной культуры в данный момент.

б) Куратор культуры заказывает выемку требуемых культур у сотрудников Группы консервации, записывая в соответствующий Журнал требований следующие данные:

номер культуры,  
дату высушивания на силикагеле,  
температуру хранения на силикагеле,  
количество требуемых ампул,

в) Сотрудник Группы консервации проверяет наличие соответствующих ампул в азотном, низкотемпературном хранилище или холодильном шкафу и сообщает куратору культуры о возможной дате проведения работ по предоставлению требуемых ампул культуры.

г) Сотрудник Группы консервации вынимает ампулу из азотного, низкотемпературного хранилища или холодильного шкафа, приносит ее в сосуде, который не допускает размораживания, и вместе с куратором культуры проводит выемку одного шарика силикагеля из ампулы (ампулы полипропиленовые, завинчивающиеся, объемом 2 мл). После проведения работы отмечает в базе данных дату проведенной работы.

д) Куратор культуры ставит чашку Петри с шариком силикагеля в термостат с оптимальной температурой для роста проверяемой культуры.

е) Через определенное время культивирования в термостате куратор культуры определяет характер и интенсивность роста культуры микроорганизма. Далее он заносит полученные данные в два журнала – Журнал проверки жизнеспособности культур, заложенных методом высушивания на силикагеле (общий для всех кураторов культур данной группы организмов) и Рабочий журнал куратора на соответствующую страницу по ведению данной культуры. Первый из этих двух журналов является основой базы данных ВКМ по хранению методом высушивания на силикагеле и определению максимальных сроков жизнеспособности различных культур при использовании данного метода. Вторым журналом используется куратором культуры для анализа результатов определения жизнеспособности разными методами по данной культуре.

#### 5.4 Высушивание в стерильной почве

а) Куратор культуры определяет, какие даты высушивания в стерильной почве подлежат проверке жизнеспособности для данной культуры в данный момент.

Требуемые пробирки с культурой в стерильной почве куратор вынимает из специальных металлических контейнеров (нержавеющая сталь), находящихся на металлических стеллажах (нержавеющая сталь) в хранилище ВКМ (холодильная камера с температурой 4-5°C).

б) Куратор культуры проводит перенос из пробирок с почвой специальным микрошпателем с ложечкой небольшого количества почвы с культурой на чашку Петри с питательной средой. Дополнительно на поверхность насыпанной почвы для ее увлажнения пастеровской пипеткой наносятся две капли стерильной водопроводной воды.

Чашку Петри затем переносят в термостат с оптимальной температурой для роста проверяемой культуры.

в) Через определенное время культивирования в термостате куратор культуры определяет характер и интенсивность роста культуры микроорганизма. Далее он заносит полученные данные в два журнала – Журнал проверки жизнеспособности культур, заложенных методом высушивания в стерильной почве (общий для всех кураторов культур данной группы организмов) и Рабочий журнал куратора на соответствующую страницу по ведению данной культуры. Первый из этих двух журналов является основой базы данных ВКМ по хранению методом высушивания в стерильной почве и определению максимальных сроков жизнеспособности различных культур при использовании данного метода. Второй журнал используется куратором культуры для анализа результатов определения жизнеспособности разными методами по данной культуре.

#### 5.5 Хранение под минеральным маслом

а) Куратор культуры определяет, какие даты закладки на хранение под минеральное масло подлежат проверке жизнеспособности для данной культуры в данный момент.

Требуемые пробирки с культурой под минеральным маслом куратор вынимает из специальных металлических контейнеров (нержавеющая сталь), находящихся на металлических стеллажах (нержавеющая сталь) в хранилище ВКМ (холодильная камера с температурой 4-5°C).

б) Куратор культуры проводит высеv культуры из пробирок с минеральным маслом на чашку Петри с питательной средой.

Чашку Петри затем переносят в термостат с оптимальной температурой для роста проверяемой культуры.

в) Через определенное время культивирования в термостате куратор культуры определяет характер и интенсивность роста культуры микроорганизма. Далее он заносит полученные данные в два журнала – Журнал проверки жизнеспособности культур, заложенных методом хранения под минеральным маслом (общий для всех кураторов культур данной группы организмов) и Рабочий журнал куратора на соответствующую страницу по ведению данной культуры. Первый из этих двух журналов является основой базы данных ВКМ по методу хранения под минеральным маслом и определению максимальных сроков

жизнеспособности различных культур при его использовании. Второй журнал используется куратором культуры для анализа результатов определения жизнеспособности разными методами по данной культуре.

#### 6 Периодичность проверки жизнеспособности

Периодичность проверки жизнеспособности устанавливается опытным путем в процессе хранения культуры.

#### 7 Информационная обработка полученных данных

Данные о методах и сроках гарантированного сохранения жизнеспособности каждой культуры ВКМ должны быть отражены в базе данных ВКМ по хранению культур и каталоге культур ВКМ.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Стандартная операционная процедура по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда дрожжей и мицелиальных грибов.

Составлено: С.М. Озерская, д.б.н., зав. лабораторий.

Содержание и назначение: Определяет протокол по контролю качества сохранения жизнеспособности коллекционного фонда ВКМ.

Местонахождение: Отдел ВКМ, ИБФМ РАН.

Пересмотр: при необходимости.

Проверка аутентичности чистых культур дрожжей и мицелиальных грибов производится путем их реидентификации на основании: культурально-морфологических признаков при выращивании в специальных условиях, рекомендуемых соответствующими современными определителями по отдельным таксономическим группам.

Проверка аутентичности чистых культур требуется периодически в процессе их длительного хранения различными методами и обычно проводится одновременно с проверкой жизнеспособности культур.

1 Оборудование и материалы, необходимые для идентификации дрожжей и мицелиальных грибов:

- Колбы плоскодонные термостойкие, 1000 мл
- Пробирки стеклянные биологические, 20 мл
- Цилиндры измерительные для растворов, 1000 мл
- Стакан высокий термостойкий со шкалой, 600 мл
- Пипетки стерильные градуированные, 3 мл
- Чашки Петри пластиковые стерильные, 90 мм
- Микропробирки полимерные 1,5 мл типа Eppendorf
- Вата медицинская хлопковая гигроскопическая
- Веревка джутовая
- Марля медицинская
- Порошок моющий «Лотос»
- Халат лабораторный
- Маска медицинская
- Шапочка медицинская одноразовая
- Масло иммерсионное
- Кислота уксусная

- Вода дистиллированная
- Крафт-бумага
- Предметное стекло, 26x75x1 мм
- Покровное стекло, 24x24 мм
- Спирт
- Среды питательные для грибов
- Дeterгент Tween 80
- Шпатель металлический GLORIA
- Микологический крючок
- Электронные технические весы с погрешностью взвешивания 20 мг
- Микроскопы световые, увеличение от 15x до 400x, например, «Биолам-И», «Микмед-6» с цифровой видеокамерой
- Дозатор автоклавируемый одноканальный переменного объема V 0,2-20 мкл, наконечники
- Термостаты
- Автоклавы для стерилизации и убивки отработанного материала
- Компьютер персональный
- Книга учета

## 2 Подготовка и стерилизация посуды, оборудования и сред

Новую посуду промывают в теплой проточной воде с моющим порошком, затем ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Из гигроскопической медицинской ваты готовят плотные пробки, которые затем обтягивают медицинской марлей. Приготовленными пробками закупоривают колбы и закрывают их крафт-бумагой и обвязывают веревкой. Завернутую в крафт-бумагу чистую посуду стерилизуют в сухожаровом шкафу при температуре 160°C в течение 2-х часов.

Питательные среды после смешения компонентов помещают в стерильные колбы, а затем стерилизуют в автоклаве одноразово паром. Режим стерилизации зависит от состава среды: 105°C в течение 40 минут или 121°C 30 мин.

## 3 Состав питательных сред, рекомендуемых для идентификации

Состав сред для видовой идентификации и условия культивирования варьируют в зависимости от принадлежности организма к определенному роду и основываются на имеющихся в литературе рекомендациях. Перечень и состав питательных сред используемых для идентификации дрожжей и мицелиальных грибов приведен ниже. Химические вещества, используемые в средах, отбирают металлическим шпателем и взвешивают в стеклянном стакане. После приготовления среды стерилизуют в автоклаве,

соблюдая рекомендуемый режим стерилизации.

#### 1) Среда Чапека-Докса (CZ)

NaNO <sub>3</sub>	3,0 г
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 г
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5г
KCl	0,5 г
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5 г
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,01 г
Сахароза	30,0 г
Агар	20,0 г
Вода дистиллированная	1000 мл

Стерилизация: 105°С, 40 минут

Среда рекомендована для идентификации почвенных микромицетов различных таксонов.

#### 2) Мальц агар (МА)

Сусло солодовое 3,5°Б	1000,0 мл
Агар	20,0 г

Стерилизация: 105°С, 40 минут

Среда рекомендована для идентификации микромицетов, относящихся к родам *Absidia* (25, 30, 37, 45°С, 7 дней), *Acremonium* (20-30°С, 7-14 дней), *Mucor* (10, 20, 25, 30, 37°С, 7 дней), (*Paecilomyces* (25°С, 14 дней), *Phialophora* (25°С, 18 дней), *Phoma* (20-22°С, 7 дней), *Rhizopus* (25, 37, 45°С, 1-3 дня), *Scopulariopsis* (25°С, 10 дней), *Sporotrichum* (25°С, 10 дней) и др.

#### 3) Картофельно-глюкозный агар (PDA)

Картофель тертый	200,0 г
Глюкоза	20,0 г
Агар	20,0 г
Вода водопроводная	1,0 л

Картофель варят 1 час в 1 л воды, фильтруют через марлю, доливают водой до первоначального объема, добавляют глюкозу и агар.

Стерилизация: 105°С, 40 минут.

Среда рекомендована для идентификации микромицетов, относящихся к родам *Botrytis* (25°С, 10 дней), *Chaetomium* (20-25°С, 10 дней), *Cladosporium*, *Ulocladium* (25°С, 10 дней), *Colletotrichum* (25°С, 10 дней), *Fusarium* (25°С, 7-14 дней), *Oidiodendron* (20-25°С, 10 дней) и др.

#### 4) Овсяный агар (ОА)

Овес (овсяные хлопья)	30,0 г
Агар	20,0 г
Вода водопроводная	1,0 л

Овес выдерживать на водяной бане при 58° С в течение 1 час., профильтровать через 2 слоя марли, довести до 1 л водой, добавить агар.

Стерилизация: 121 С 30 мин.

Среда рекомендована для идентификации микромицетов, относящихся к родам *Acremonium* (20-30°С, 7-14 дней), *Fusarium* (25°С, 7-14 дней), *Phoma* (20-22°С, 7 дней) и др.

#### 5) Агар Чапека с дрожжевым экстрактом (СУА):

К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	1,0 г
Концентрат Чапека	10,0 мл
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Сахароза	30,0 г
Агар	20,0 г
Вода дистиллированная	1,0 л

Стерилизация: 105°С, 40 минут.

Температура культивирования: 5°С (только для *Penicillium*), 25°С и 37°С (для *Aspergillus* и *Penicillium*). Время культивирования: 7 суток

#### 6) Агар Чапека с дрожжевым экстрактом и 20% сахарозы (СУ20S):

К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	1,0 г
Концентрат Чапека	10,0 мл
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Сахароза	200,0 г
Агар	20,0 г
Вода дистиллированная	1,0 л

Стерилизация: 105°С, 40 минут.

Температура культивирования: 25°С (только для *Aspergillus*).

Время культивирования: 7 суток

#### 7) 25 % глицерин-нитратный агар (GN25):

К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	0,75 г
Концентрат Чапека	7,5 мл
Дрожжевой экстракт	3,7 г
Глицерин, аналитически чистый	250,0 г

Агар	12,0 г
Вода дистиллированная	750 мл

Стерилизация: 105°C, 40 минут.

Температура культивирования: 25°C (только для *Penicillium*).

Время культивирования: 7 суток

Концентрат Чапека

NaNO <sub>3</sub>	30,0 г
KCl	5,0 г
MnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	5,0 г
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,1 г
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,1 г
CuSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,05 г

8) Мальц экстракт агар (МЕА)

Мальц экстракт, порошковый (Difco)	20,0 г
Пептон	1,0 г
Глюкоза	20,0г
Агар	20,0 г
Вода дистиллированная	1,0 л

Стерилизация: 105°C, 40 минут.

Температура культивирования: 25°C. Время культивирования: 7 суток

Идентификация видов родов *Aspergillus* (включая телеоморфы, относящиеся к роду *Eurotium*) и *Penicillium* производится с использованием комбинации питательных сред №№ 5-8 и культивирования при разных температурах. Таким образом, схемы идентификации могут быть представлены следующим образом:

для грибов рода *Penicillium* -

- СУА- 5°C, 25°C, 37°C
- МЕА-25°C
- G25N -25°C

для грибов рода *Aspergillus* -

- СУА- 25°C, 37°C
- СУА- 25°C, 37°C
- МЕА-25°C

- CY20S - 25°C.

#### 4 Способы инокуляции мицелиальных грибов для целей идентификации

Для целей идентификации мицелиальный материал гриба переносится на поверхность чашки Петри с помощью микологического крючка.

Споровый материал наносят в виде суспензии, приготовленной путем смывания спор стерильной водой с косяка спороносящей культуры. Для этого в пробирку с культурой стерильно приливают 5 мл воды и не острой стороной микологического крючка смывают споры, получая споровую суспензию.

Для грибов с гидрофобными спорами, имеющимися, например, у видов родов *Aspergillus* и *Penicillium*, при приготовлении спорового инокулюма используют воду с добавлением агара (0,2%), детергента (например, Tween 80) в концентрации 0,05%. Полученный раствор разливают по 0,2-0,4 мл в микропробирки полимерные типа Eppendorf и стерилизуют. Одну петлю спор со скошенного агара переносят в микропробирку и тщательно перемешивают. Для стандартизации посева суспензию следует наносить дозатором. Объем нанесенной суспензии составляет 2-5 мкл. Культуры после инокуляции культивируют в термостатах при разных температурах.

#### 5 Диагностические признаки при идентификации мицелиальных грибов

Идентификация микромицетов проводится на основании культурально-морфологических признаков с использованием различных специализированных определителей.

##### Макроморфологические признаки

Основными диагностическими культуральными (макроморфологическими) признаками мицелиальных грибов, выявляемых при изучении внешнего вида колонии, являются:

- Размер колонии
- Высота мицелия (для зигомицетовых грибов)
- Окраска колонии
- Окраска обратной стороны (реверса) колонии
- Строение края и центра
- Характер поверхности
- Наличие экссудата
- Наличие и характер запаха
- Наличие и характер репродуктивных органов

## Микроморфологические признаки

Морфологические (микроморфологические) признаки мицелиальных грибов выявляются при световой микроскопии. Для выявления спороношения культуры производится микроскопия непосредственно на чашке Петри с использованием световых микроскопов (увеличение от 16х до 400х), например, «Биолам-И». Для фиксации картины микроскопических исследований с помощью микроскопа «Микмед-6» с присоединенной видеокамерой и монитором производится снимок, хранящийся впоследствии на компьютере.

Для дальнейшего исследования готовится препарат, для чего на предметное стекло наносят каплю воды или 0,1% раствора уксусной кислоты, помещают в нее исследуемый материал. Препарат покрывают покровным стеклом, с помощью фильтровальной бумаги удаляют излишки жидкости. Исследование проводят сначала при малом (увеличение объектива 10), затем при большом (увеличение объектива- 40) увеличении.

Основными диагностическими морфологическими (микроморфологическими) признаками мицелиальных грибов, выявляемых при микроскопии, являются:

- Тип спорообразования
- Наличие столонов и ризоидов (для зигомицетовых грибов)
- Размер, форма и способ образования спороносных структур
- Размер спор
- Форма спор
- Окраска спор
- Поверхность спор
- Количество клеток в споре, тип перегородок
- Наличие хламидоспор, оидий, гемм и других образований на мицелии
- Наличие азигоспор и зигоспор

Результат реидентификации культуры фиксируется в рабочем журнале с указанием даты проведения проверки.

## 6 Обеззараживание отработанных материалов

После проведения работ все емкости с культурами и расходные материалы помещаются в металлические биксы и подвергаются термической обработке в автоклаве при режиме 1,5 атм. в течение 1-го часа.

## ПРИЛОЖЕНИЕ И

Стандартная операционная процедура по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда мицелиальных актиномицетов.

Составлено: О.В. Буева, н.с.

Содержание и назначение: Определяет протокол по лиофилизации культур ВКМ с использованием разных режимов первичной и вторичной сушки.

Местонахождение: Отдел ВКМ, ИБФМ РАН.

Пересмотр: при необходимости.

Проверка аутентичности чистых культур стрептомицетов производится путем их реидентификации на основании: культурально-морфологических признаков при выращивании на диагностических средах, предложенных в «Определителе актиномицетов» Г.Ф. Гаузе с соавт.

Проверка аутентичности чистых культур требуется периодически в процессе их длительного хранения в лиофильно-высушенном состоянии и обычно проводится одновременно с проверкой жизнеспособности культур.

1 Оборудование и материалы, необходимые для идентификации стрептомицетов:

- Колбы круглодонные термостойкие, 1000 мл
- Пробирки стеклянные биологические, 20 мл
- Цилиндры измерительные для растворов, 1000 мл
- Стакан высокий термостойкий со шкалой, 600 мл
- Пипетки стерильные градуированные, 2 мл
- Пастеровские пипетки стерильные
- Чашки Петри стеклянные стерильные, 90 мм
- Вата медицинская хлопковая гигроскопическая
- Вербка джутовая
- Марля медицинская
- Порошок моющий «Лотос»
- Халат лабораторный
- Маска медицинская
- Шапочка медицинская одноразовая
- Масло иммерсионное
- Вода дистиллированная
- Крафт-бумага

- Предметное стекло, 26x75x1 мм
- Покровное стекло, 24x24 мм
- Спирт
- Среды питательные для актиномицетов
- Шпатель металлический GLORIA
- Бактериологическая петля
- Электронные технические весы с погрешностью взвешивания 20 мг
- Микроскопы световые, увеличение от 15х до 400х, например, «Биолам-И»
- Микроскоп электронный JEM - 100В, JEOL, Япония
- Термостаты
- Автоклавы для стерилизации и убивки отработанного материала
- Компьютер персональный
- Книга учета

## 2 Подготовка и стерилизация посуды, оборудования и сред

Новую посуду промывают в теплой проточной воде с моющим порошком, затем ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Из гигроскопической медицинской ваты готовят плотные пробки, которые затем обтягивают медицинской марлей. Приготовленными пробками закупоривают колбы и закрывают их крафт-бумагой и обвязывают веревкой. Завернутую в крафт-бумагу чистую посуду стерилизуют в сухожаровом шкафу при температуре 160°C в течение 2-х часов.

Питательные среды после смешения компонентов помещают в стерильные колбы, а затем стерилизуют в автоклаве одноразово паром. Режим стерилизации зависит от состава среды: 105°C в течение 40 минут или 121°C 30 мин.

## 3 Состав питательных сред, рекомендуемых для идентификации

### 1) Минеральный агар 1

крахмал (растворимый)	20,0г
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5г
MgSO <sub>4</sub>	0,5г
KNO <sub>3</sub>	1г
NaCl	0,5г
FeSO <sub>4</sub>	0,01г
Агар	30,0г
Вода	1л
pH = 7,2-7,4	

## 2) Овсяный агар (ISP 3)

овсяная мука	20г
солевой раствор А	1,0мл
агар	20,0г
дистиллированная вода	1л

pH = 7,2

### Солевой раствор А

FeSO <sub>4</sub>	0,1г
ZnSO <sub>4</sub>	0,1г
MnCl <sub>2</sub>	0,1г
дистиллированная вода	100мл

## 3) Органический агар 2

бульон Хоттингера	30мл
пептон	5,0г
глюкоза	10г
NaCl	5,0г
Агар	20,0г
вода водопроводная	1л

pH = 7,2-7,4

## 4) Пептонно-дрожжевой агар с железом (ISP6)

Бакто-пептонный агар с железом

Дифко	36,0г
дрожжевой экстракт	1,0г
дистиллированная вода	1000мл

pH = 7,0-7,2

## 5) Среда ISP 2

Глюкоза	4,0г
дрожжевой экстракт	4,0г
солодовой экстракт	10,0г
агар	15,0г
дистиллированная вода	1000мл

pH = 7,2

## 6) Крахмально-аммиачный агар ISP 4

растворимый крахмал	10,0г
---------------------	-------

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0г
MgSO <sub>4</sub>	1,0г
NaCl	1,0г
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0г
CaCO <sub>3</sub>	2,0г
солевой раствор А	1,0мл
агар	25г
дистиллированная вода	1000мл
pH =7,0 - 7,2	

#### 7) Глицерин-аспарагиновой агар ISP 5

Аспарагин	1,0г
Глицерин	10,0г
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0г
солевой раствор А	1,0мл
агар	25г
дистиллированная вода	1000мл
pH = 7,0 - 7,2	

#### 4 Способы инокуляции стрептомицетов для целей идентификации

Лиофильно-высушенная культура из ампулы высевается на питательную среду, рекомендованную в каталоге ВКМ, и выращивается при указанной температуре в течение 10-14 дней.

Высев лиофилизированной культуры из ампулы производится следующим образом. Запаянный конец ампулы предварительно обрабатывается этиловым спиртом с помощью ватного тампона и нагревается в пламени горелки. Для образования трещины к нагретому концу прикладывается стерильный ватный тампон (ватная пробка), смоченный стерильной водой. Пинцетом, скальпелем, другим подходящим инструментом конец ампулы по трещине откалывается, соблюдая стерильность. Ватный тампон внутри ампулы (если он имеется) вынимается пинцетом и с помощью пастерки в ампулу вносится 0,5 мл стерильной водопроводной воды или соответствующей питательной среды. После 20 минут реактивации при комнатной температуре суспензия может использоваться для инокуляции питательной среды, рекомендованной в каталоге ВКМ.

## 5 Диагностические признаки при идентификации стрептомицетов

Определение аутентичности стрептомицетов производится на основании диагностических признаков культур - морфологических и культуральных, предложенных Г.Ф.Гаузе с соавторами в "Определителе актиномицетов" (1983).

Для изучения морфологического строения репродуктивных структур культуры актиномицетов выращивают на средах, наиболее благоприятных для спороношения, обычно на минеральном агаре 1 или овсяном агаре, в чашках Петри или на скошенном агаре в пробирках. Тип цепочек и характер поверхности спор определяют у зрелых культур обычно на 7-14 день роста.

Для определения формы цепочек спор кусочек агара с мицелием помещают на предметное стекло, срезав предварительно лишний агар, и просматривают в световом микроскопе при увеличении 10х. У стрептомицетов различают три типа спороношения: 1) прямые и извитые цепочки (RF); 2) цепочки спор в виде крючков, петель и неправильных спиралей (RA); 3) спиральные цепочки спор (S).

Поверхность спор изучали с помощью электронного микроскопа (JEM - 100B, JEOL, Япония) без фиксации при увеличении 8000 - 10000. Для приготовления образца для просмотра в электронном микроскопе слегка прикасались сеткой с нанесенной на нее коллодиевой пленкой к поверхности спороносящего воздушного мицелия.

Под культуральными признаками обычно подразумевают цвет воздушного и субстратного мицелия и цвет растворимых пигментов, которые окрашивают среду.

Определение цвета проводится на 7, 14, 21 день роста культуры при дневном освещении. Для стандартизации процедуры используется ШКАЛА ЦВЕТОВ Бондарцева.

Окраску воздушного мицелия определяли на минеральном агаре 1 или овсяном агаре, поскольку эти среды наиболее благоприятны для образования спороносящего воздушного мицелия.

Окраску субстратного мицелия (цвет обратной стороны колонии), а также образование растворимых (окрашивающих среду) пигментов определяли на органическом агаре 2.

Образование меланоидных пигментов определяли на пептонно-дрожжевом агаре, содержащем железо, на 2-4-е сутки роста. Наличие темно-зелено-бурого, бурого или черного растворимого пигмента указывает на образование культурой меланоидных пигментов.

Видовая аутентификация штамма стрептомицета проводится по ключу, предложенному в "Определителе актиномицетов" Гаузе Г.Ф. с соавт.

## 6 Обеззараживание отработанных материалов

После проведения работ все емкости с культурами и расходные материалы помещаются в металлические биксы и подвергаются термической обработке в автоклаве при режиме 1,5 атм в течение 1-го часа.

### 8 Литература.

- 1) Гаузе Г.Ф., Преображенская Т. П., Свешникова М, А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. 1983. Изд. " Наука" --245с.
- 2) Бондарцев А.С. Шкала цветов (Пособие для биологов при научных и научно-прикладных исследованиях). 1954. Изд. АН СССР.
- 3) Bergey's manual of systematic bacteriology, ed. by Williams S.T., Sharpe M.E., Holt J. G., v. 4. 1989. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 4) Kämpfer, P. Genus I. Streptomyces Waksman and Henrici 1943, 339 emend. Witt and Stackebrandt 1990, 370 emend. Wellington, Stackebrandt, Sanders, Wolstrup and Jorgensen 1992, 159.
- 5) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012, 5: 1455-1767. Springer, NY. Shirling, E. T., and Gottlieb, D. Methods for characterization of Streptomyces species 1. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16(3): 313-340.

## ПРИЛОЖЕНИЕ К

Стандартная операционная процедура по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда бактерий и архей ВКМ.

Составлено: Е.Б. Кудряшова, к.б.н., с.н.с, руководитель сектора.

Содержание и назначение: Определяет протокол по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда бактерий и архей ВКМ.

Местонахождение: Отдел ВКМ, ИБФМ РАН.

Пересмотр: при необходимости.

Проверка качества (аутентичности) бактерий и архей проводится систематически и гарантирует сохранность поддерживаемого фонда «Всероссийской коллекции микроорганизмов» (ВКМ). Процедура обеспечивает своевременное выявление единиц хранения, не отвечающих видовой принадлежности, требованиям чистоты культуры и жизнеспособности.

СОП по проверке качества (аутентичности) бактерий и архей сопряжен с выполнением Стандартных операционных процедур:

- Стандартная операционная процедура по анализу бактерий методом матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной время-пролетной масс-спектрометрии (МАЛДИ-ВП МС);
- Стандартная операционная процедура по анализу бактерий и архей фонда ВКМ методом секвенирования фрагментов генов 16S rRNA и «генов домашнего хозяйства».

Решение о выполнении данных анализов принимается куратором для каждой проверяемой единицы хранения.

Проверку качества (аутентичности) проводят для всех штаммов бактерий и архей поддерживаемого фонда ВКМ, для каждой партии, заложенной на длительное хранение в разные даты разными способами.

Оборудование и материалы:

- Весы электронные OHAUS, 0.01 г;
- Весы электронные OHAUS, 0.0001 г;
- рН-метр Аквилон;
- Мешалка магнитная;
- Холодильник бытовой с морозильной камерой -20°C;

- Морозильная камера SANYO, -70°C;
- Термостатная комната, +24°C, +28°C;
- Холодная комната, +4°C;
- Термостаты;
- Термометры;
- Термостаты с качалкой;
- Люминостаг;
- Микроанаэростат;
- Газовые баллоны с газовой смесью;
- Микроскоп световой LOMO с фазово-контрастным устройством;
- Компьютер персональный;
- Рабочий журнал;
- Штатив для пробирок;
- Контейнер для чашек Петри;
- Бокс для микробиологических работ;
- Газовая горелка;
- Бактериологическая петля;
- Бикс;
- Чашка Петри;
- Колба коническая, 100 мл и 200 мл;
- Пробирка стеклянная, 20 мл, 50 мл;
- Пробирка стеклянная Хангейта;
- Цилиндр мерный, 100 мл;
- Цилиндр мерный, 1000 мл;
- Стакан термостойкий со шкалой, 250 мл;
- Пипетка пастеровская стеклянная;
- Вата хлопковая гигроскопическая;
- Марля медицинская хлопчатобумажная;
- Крафт-бумага;
- Спирт 70°;
- Дезинфицирующие растворы;
- Вода дистиллированная стерильная;
- Вода водопроводная стерильная;

- Химические реактивы, необходимые для приготовления питательных сред для архей, бактерий, в том числе актинобактерий;
- Готовые (фирменные) питательные среды для бактерий, в том числе актинобактерий;
- Стекло предметное;
- Стекло покровное;
- Масло иммерсионное;
- Петля бактериологическая;
- Фильтровальная бумага;
- Моющее средство для стекла.

1 Процедура включает методы:

- анализа культурально-морфологических характеристик;
- матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной время-пролетной масс-спектрометрии (МАЛДИ-ВП МС);
- секвенирования и анализа фрагментов генов 16S rRNA и домашнего хозяйства (“house-keeping genes”).

2 Проводят отбор единицы хранения штамма бактерий/архей из партии, заложенной на длительное хранение в определенную дату определенным способом.

3 Оживление штамма проводят с учетом способа сохранения и группы микроорганизмов, которую представляет данный штамм.

4 Подготавливают микробиологический бокс к работе. Готовят дезинфицирующие растворы. Готовят питательные среды согласно прописи, используя стерильную посуду. Регистрируют в журналах учета.

5 Высев выполняют:

- в чашку Петри на плотную питательную среду, указанную для данного штамма на сайте ВКМ (<http://www.vkm.ru>), или
- в колбу/пробирку с жидкой питательной средой, указанной для данного штамма на сайте ВКМ.

6 Культивирование проводят в условиях, рекомендуемых для данного штамма. Проводят контроль температуры.

7 После необходимого для данного штамма срока культивирования выполняют анализ культурально-морфологических признаков в сравнении с паспортными данными штамма и характеристикой соответствующего рода, вида, приведенной в издании Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology или статье с описанием данного микроорганизма. Обращают внимание на форму, размер, поверхность, профиль, край, структуру,

консистенцию, наличие блеска и прозрачность, цвет колоний и наличие пигмента, выделяемого в среду.

8 Выполняют микроскопирование препарата «раздавленная капля» с использованием фазово-контрастного устройства.

8.1 Подготовка препарата для микроскопирования.

8.1.1 Подготовка предметного и покровного стекла. На тщательно очищенное предметное стекло наносят стерильной пипеткой каплю стерильной дистиллированной воды или питательной среды.

8.1.2 Стерильной бактериологической петлей переносят биомассу с изолированной колонии в каплю воды на предметном стекле и тщательно перемешивают до равномерного распределения клеток. При культивировании штамма в жидкой питательной среде на предметное стекло наносится капля культуральной жидкости.

8.1.3 Каплю, с равномерно распределенными клетками, накрывают тщательно очищенным покровным стеклом, слегка придавливают. Излишнюю часть жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Наносят каплю иммерсионного масла на покровное стекло.

8.2 Микроскопирование препарата.

8.2.1 Включают микроскоп, устанавливают фазовый объектив 100 х ф.

8.2.2 Препарат помещают на предметный столик, опускают окуляр и фокусируют препарат.

8.2.3 Просматривают не менее 10 полей зрения. Обращают внимание на форму клеток, размер, наличие спор (форма спор, спорангия, диаметр спор, расположение спор в клетке), на подвижность и характер движения, наличие включений и характерные морфологические формы.

9 Куратор, ведущий данную культуру, по полученным результатам принимает решение о необходимости проведения анализов методами МАЛДИ-ВП МС или секвенирования фрагментов генов 16S rRNA и домашнего хозяйства.

10 Анализы выполняются по Стандартным операционным процедурам:

«СОП по анализу бактерий методом матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной время-пролетной масс-спектрометрии (МАЛДИ-ВП МС)»;

«СОП по анализу бактерий и архей фонда ВКМ методом секвенирования фрагментов генов 16S rRNA и «генов домашнего хозяйства».

10.1 Для анализа методом МАЛДИ-ВП МС готовят культуру разного возраста. Проводят пересев и культивирование в соответствии с рекомендациями для штамма.

10.2 Для секвенирования фрагментов генов 16S rRNA и генов домашнего хозяйства бактериального штамма проводят пересев и культивирование в соответствии с рекомендациями для штамма.

11 Для анализа используют биомассу культуры, собранную в конце экспоненциальной фазы роста.

12 Результаты регистрируют в рабочем журнале и в компьютерной базе данных.

13 Отработанный материал инактивируют путем автоклавирования.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Стандартная операционная процедура по определению оптимальных методов консервации для новых штаммов при пополнении фонда культур ВКМ.

Составлено: С.М. Озерская, д.б.н., зав. лабораторий.

Содержание и назначение: Определяет протокол по определению оптимальных методов консервации для новых штаммов при пополнении фонда культур ВКМ.

Местонахождение: Отдел ВКМ, ИБФМ РАН.

Пересмотр: при необходимости.

Каждый штамм микроорганизма в ВКМ сохраняется различными методами параллельно (не менее 3-х). Определение оптимальных методов консервации для новых культур при пополнении фонда состоит из ряда последовательных процедур.

1 Ввод нового штамма в фонд ВКМ осуществляют в соответствии с требованиями «Стандартной операционной процедуры по введению штамма микроорганизма в коллекционный фонд ВКМ».

2 Выбор методики консервации осуществляют путем анализа имеющихся в ВКМ данных о методах консервации и сроках гарантированного хранения близких групп микроорганизмов, полученных в результате проверки жизнеспособности в соответствии с СОП по лиофилизации, консервации и т.д.

3 Подбор условий (состав питательной среды, состав газовой атмосферы, температура и т.п.) и времени культивирования, обеспечивающих оптимальный рост и/или формирование спор у спорообразующих микроорганизмов, производят по соответствующим данным, полученным от авторов штаммов, сведениям из литературы и каталогов других коллекций, а также с учетом опыта специалистов ВКМ.

4 Подготовку штамма микроорганизма к консервации по различным разработанным или модифицированным в ВКМ методикам для конкретной группы микроорганизмов проводят в соответствии с требованиями следующих документов:

- «Стандартная операционная процедура по подготовке к криоконсервации штаммов микроорганизмов разных таксономических групп»;
- «Стандартная операционная процедура по контролю сохранения жизнеспособности коллекционного фонда ВКМ сразу после закладки на хранение конкретным методом»;
- «Стандартная операционная процедура по криоконсервации штаммов микроорганизмов ВКМ с использованием разных режимов программируемого замораживания»;

- «Стандартная операционная процедура по лиофилизации штаммов микроорганизмов ВКМ с использованием разных режимов первичной и вторичной сушки»;
- «Стандартная операционная процедура по высушиванию в стерильной почве штаммов микроорганизмов ВКМ»;
- «Стандартная операционная процедура по хранению под минеральным маслом штаммов микроорганизмов ВКМ»;
- «Стандартная операционная процедура по высушиванию на силикагеле штаммов мицелиальных грибов ВКМ»;
- «Стандартная операционная процедура по хранению культур мицелиальных грибов методом периодических пересевов на питательных средах»;
- «Стандартная операционная процедура по низкотемпературной консервации культур бактерий на носителе (пористых бусинах)»;
- «Стандартная операционная процедура по низкотемпературной консервации культур бактерий на носителе (глауконите)».

5 Оценка жизнеспособности штамма непосредственно после консервации и, дополнительно, после его хранения в течение месяца (при 37°C в случае использования метода лиофилизации), является основным критерием эффективности выбранной методики. Работа проводится в соответствии со «Стандартной операционной процедурой по контролю сохранения жизнеспособности коллекционного фонда ВКМ».

5.1 Последующая проверка эффективности консервации производится вышеописанным способом после года хранения культуры.

5.2 Культуры с удовлетворительными показателями численности жизнеспособных клеток и неизменными ключевыми фенотипическими характеристиками (способность образовывать споры, воздушный мицелий, продуцировать антибиотики и т.п.), закладывают на длительное хранение.

5.3 Культуры с неудовлетворительными показателями жизнеспособности и/или утратившие при консервации «основными» методами ключевые фенотипические характеристики поддерживаются путем посева и являются объектами направленных исследований по подбору других условий консервации.

6 Журнал по хранению коллекционных культур ведется исключительно по порядку присвоения уникальных номеров коллекционным культурам, в связи с возможными изменениями названий культуры в процессе ее поддержания в коллекции.

Записи о хранении культуры микроорганизма должны содержать:

- номер культуры с индексом группы (например, F-1490 и т.д.),

- название культуры,
- авторов видового названия и год описания вида,
- историю движения культуры до ее поступления в ВКМ,
- методы хранения культуры,
- даты и результаты проверки жизнеспособности и аутентичности.

Каждый метод хранения культуры должен быть описан стандартным образом:

- название метода,
- дата закладки,
- число имеющихся единиц хранения по данной закладке,
- температура хранения,
- место хранения,
- данные о жизнеспособности сразу после закладки на хранение,
- данные о жизнеспособности через определенные промежутки времени в процессе хранения,
- число оставшихся единиц хранения после проверки жизнеспособности или выдачи заявителю,
- описание возможных изменений культурально-морфологических признаков культуры в процессе хранения,
- данные о возможных изменениях биологической активности культуры в процессе хранения.

#### 7 Информационная обработка полученных данных.

Данные о методах, определенных для хранения новых культур ВКМ должны быть отражены в базе данных ВКМ по хранению культур и каталоге культур ВКМ.

## ПРИЛОЖЕНИЕ М

Стандартная операционная процедура по определению липидных компонентов (жирных кислот) клеток бактерий и архей.

Составлено: А.Н. Автух, к.б.н., н.с.

Содержание и назначение: Определяет протокол по определению оптимальных методов консервации для новых штаммов при пополнении фонда культур ВКМ.

Местонахождение: Отдел ВКМ, ИБФМ РАН.

Пересмотр: при необходимости.

Анализ низкомолекулярных жирных кислот (длиной от 9 до 20 атомов углерода) производится для решения ряда научных и практических задач, в том числе, в связи с описанием микроорганизмов в качестве новых видов и родов. Более чем 300 жирных кислот и их производных, выделяемых из микроорганизмов, можно проанализировать с помощью газовой хроматографии. При этом важна не только качественная (присутствие или отсутствие конкретной кислоты), но и количественная информация. Жирные кислоты – это органические кислоты с длинной углеродной цепью (9–20 и более атомов углерода). Цепь может быть насыщенной, ненасыщенной или содержит гидроксильные группы, разветвленной (изо- или антеизо-), неразветвленной или содержит цикл (Таблица М. 1).

Таблица М. 1 - Типы жирных кислот в бактериальных клетках

Тип кислоты	Структурная формула	Название кислоты
<i>n</i> – с неразветвленной цепью	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$	<i>n</i> -гексадекановая кислота (C16:0 пальмитиновая)
<i>i</i> – с разветвленной изоцепью	$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{CH}_3}{\text{HC}}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$	14-метилпентадекановая кислота ( <i>i</i> -C16:0)
<i>a</i> – с разветвленной антеизоцепью	$\text{H}_3\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\underset{\text{CH}_3}{\text{HC}}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$	12-метилпентадекановая кислота ( <i>a</i> -C16:0)
<i>n</i> :1 – мононенасыщенная	$\text{H}_3\text{C}-(\text{H}_2\text{C})_5-\text{HC}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_9-\text{COOH}$	11-октадеценовая кислота ( $\Delta$ 11-C18:1)
$\Delta$ – циклопропановая	$\text{H}_3\text{C}-(\text{H}_2\text{C})_5-\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}-\text{CH}}-(\text{CH}_2)_9-\text{COOH}$	11,12-метиленоктадекановая кислота ( $\Delta$ C19:0)

3ОН – 3-гидроксикислота	$\text{H}_3\text{C}-(\text{H}_2\text{C})_{10}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	3-гидроксидекановая кислота (3-ОН С14:0)
2ОН – 2-гидроксикислота	$\text{H}_3\text{C}-(\text{H}_2\text{C})_9-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{COOH}$	2-гидроксидекановая кислота (2-ОН С12:0)

В некоторых грамположительных бактериях преобладают кислоты с разветвленной цепью, в то время как короткоцепочечные гидроксикислоты часто характеризуют липополисахариды грамотрицательных бактерий. Неразветвленные насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты, среди которых доминируют n-гексадекановая (С16:0), n-гексадеценная (С16:1) и n-октадеценная кислоты (С18:1), характерны для родов *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Actinomyces* и *Kineosporia*, изо- или антеизоразветвленные жирные кислоты – для родов *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* и др., разветвленные и неразветвленные жирные кислоты – для родов *Actinomadura*, *Microtetraspora*, *Microbispora*, *Nocardioides*, гидроксикислоты для родов – *Aeromicrobium*, *Marmoricola*, *Nocardioides* (Komagata & Suzuki, 1987; Suzuki et al., 1993).

Из-за наличия функциональной карбоксильной группы соединение будет называться жирной кислотой, хотя фактически оно может быть альдегидом, углеводородом или диметилацеталем и обычно анализируются как метиловый эфир. Система номенклатуры жирных кислот состоит в том, чтобы подсчитать атомы углерода с «омега» конца (т.е. напротив карбоксильной группы) и указать другие функциональные группы. Различные сочетания признаков могут приводить к очень большому количеству жирных кислот.

Состав жирных кислот зависит от условий культивирования (среда, температура, рН) и возраста культуры, но при стандартизации условий выращивания постоянен. Жирнокислотный состав является важным хемотаксономическим признаком и используется главным образом на родовом уровне. Имеются огромные базы данных о профилях жирных кислот типовых микроорганизмов.

С помощью газовой хроматографии метиловых эфиров жирных кислот осуществляется количественный и качественный анализ сложных смесей кислот и их препаративное разделение. Жирные кислоты могут непосредственно метилироваться в испарителе газового хроматографа при 360–380°C в присутствии гидроокиси тетраметиламмония (Нестеренко с соавт., 1985).

## 1 Область применения.

Стандартная операционная процедура по определению липидных компонентов (жирных кислот) клеток бактерий и архей используется в качестве стандарта персоналом лаборатории, выполняющим данную процедуру, а также для обучения нового персонала.

## 2 Техника безопасности и охрана труда.

Соблюдение правил техники безопасности и санитарного режима на рабочем месте является неукоснительным требованием для выполнения всем персоналом, допущенным к работе в лаборатории.

Ответственность за организацию безопасных условий труда в подразделении возлагается в соответствии с приказом по учреждению на руководителя соответствующего подразделения или специально назначенное ответственное лицо.

Правила техники безопасности по каждому виду работ разрабатывает заведующий подразделением совместно с ответственным сотрудником, прошедшим специальную подготовку по указанным вопросам. Инструкции по технике безопасности по каждому виду лабораторных работ после согласования с комиссией местного профсоюзного комитета утверждает руководитель учреждения. Копии всех необходимых инструкций выдаются в каждое структурное подразделение лаборатории.

Комплект инструкций по технике безопасности подвергают регулярному пересмотру: в плановом порядке (1 раз в 5 лет); внепланово в связи с возникновением внештатной ситуации; в связи с внедрением в практику новых методов исследования или приобретением нового вида лабораторного оборудования.

Каждый сотрудник получает первичный инструктаж по технике безопасности при приеме на работу или возвращении к данному виду деятельности после длительного перерыва, о чем делают запись по установленной форме в «Журнале проведения инструктажа по технике безопасности».

Повторный плановый инструктаж проводят ежегодно, а внеплановый – при возникновении аварийных ситуаций или по распоряжению администрации учреждения.

О прохождении инструктажа и допуске к самостоятельной работе в лаборатории делают отметку под роспись сотрудника в «Журнале проведения инструктажа по технике безопасности».

По согласованию с администрацией учреждения проверку знаний по технике безопасности у работников лаборатории контролируют путем собеседования, принятия зачета или экзамена, анкетирования, инспектирования в процессе работы.

### 3 Ответственность персонала.

Сотрудники лаборатории несут персональную ответственность за выполнение ими правил техники безопасности, соблюдение санитарного и противопожарного режимов на рабочем месте.

Сотрудникам лаборатории запрещено без разрешения администрации учреждения выносить за пределы рабочей зоны образцы микробиологических материалов, штаммы, культуры и рабочую документацию подразделения.

Сотрудники лаборатории должны правильно маркировать предоставляемые образцы, правильно и своевременно вести разработанную документацию.

Сотрудники лаборатории обеспечивают качественное выполнение подготовки образцов к исследованиям, соблюдают правила выполнения аналитического этапа исследований и своевременное и полное предоставление результатов исследований в соответствии с разработанными условиями (заполнение бланков исследования, электронных носителей информации, другое). Сотрудники лаборатории предупреждают нецелевое расходование реагентов и расходных материалов, обеспечивают сохранность лабораторного оборудования на всех этапах исследования образца.

### 4 Материалы и оборудование.

#### 4.1 Оборудование для отбора образцов.

- Бокс бактериальной воздушной среды БАВп-«Ламинар-С» (фирма LAMSYSTEMS, Россия)
- Горелка спиртовая
- Микробиологическая петля
- Микропипетка объемом 100–1000 мкл (фирма Eppendorf, Германия)

#### 4.2 Оборудование для пробоподготовки образцов.

- Электронные технические весы с погрешностью взвешивания 20 мг
- Шейкер Microspin FV-2400 (фирма BIOSAN, Россия)
- Микропипетки емкостью 10–100 мкл, 100-1000 мкл (фирма Eppendorf, Германия)
- Центрифуга Centrifuge 5415R (фирма Eppendorf, Германия)
- Водоструйный насос
- Пипетка емкостью 0,1-2,5 мкл (фирма Eppendorf, Германия)
- Несколько мерных цилиндров на 100 мл
- Микропробирки полимерные 1.5 мл (фирма Eppendorf, Германия)
- Пробирки для культивирования на 10 мл

#### 4.3 Оборудование для анализа.

- Хромато-масс-спектрометр газовый Agilent 5977B GC/MSD с газовым хроматографом 7890В и с программным обеспечением
- Колонка HP-5MS (5% фенилметилсиликон, 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм)
- Автосемплер на 16 образцов (7693A Autoinjector)
- Шприцы на 10 мкл для автосемплера

#### 4.4 Расходные материалы.

- Гидроксид натрия
- Метанол
- 6N соляная кислота
- Н-гексан
- Трет-бутил-метилловый эфир
- Смесь метиловых эфиров жирных кислот FAME 1000 мг/мл
- Смесь метиловых эфиров VAME 10 мг/мл
- Газ-носитель (гелий)

#### 5 Процедура.

Качественное и количественное определение липидных компонентов (жирных кислот) клеток бактерий и архей с помощью хромато-масс-спектрометра газового Agilent 5977B GC/MSD с газовым хроматографом 7890В состоит из ряда последовательных процедур (Рисунок М. 1), включающих в себя культивирование и отбор образцов, омыление и метилирование, экстракция, анализ, идентификация профиля жирных кислот с помощью Библиотеки спектров NIST 2014 и программного обеспечения производителя.



Рисунок М. 1 - Общая схема процедуры.

##### 5.1 Культивирование и отбор образцов.

Для достижения стабильных и воспроизводимых результатов необходимо тщательно контролировать условия роста клеток бактерий и архей. На состав бактериальных липидных компонентов влияет температура и питательная среда, поэтому каждая библиотека относится к конкретной среде и температуре и роста.

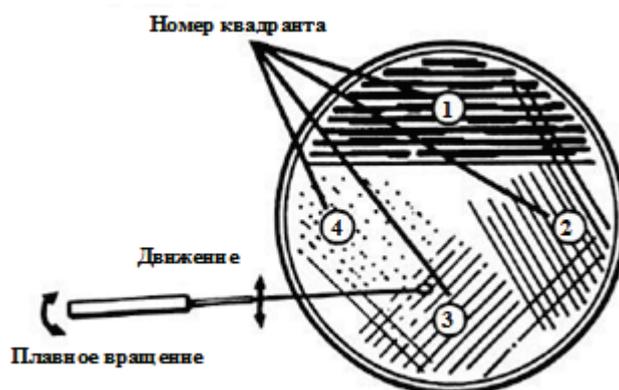


Рисунок М. 2 - Сбор образца.

Стандартизация физиологического возраста культуры получается путем выбора сектора из квадрантной полосы на чашке Петри (Рисунок М. 2). Медленно растущие организмы могут быть инкубированы в течение периода времени, необходимого для обеспечения адекватного роста.

### 5.2 Приготовление реагентов для пробоподготовки образцов.

Для экстракции требуются четыре реагента:

- Реагент 1 – 45 г гидроксида натрия, 150 мл метанола и 150 мл дистиллированной воды;
- Реагент 2 – 325 мл 6.0 Н соляной кислоты и 275 мл метанола;
- Реагент 3 – 200 мл гексана и 200 мл метил-трет-бутилового эфира;
- Реагент 4 – 10.8 г гидроксида натрия и 900 мл дистиллированной воды.

Приготовленные реагенты рекомендуются хранить при комнатной температуре в закрытых пробирках не более 30 дней.

### 5.3 Пробоподготовка образцов.

Пробоподготовка образцов состоит из пяти этапов (Рисунок М. 3).

Первый этап – сбор клеток бактерий и архей. С помощью микробиологической петли размером 4 мм перенести около 40 мг (2 мм) микробной культуры из третьего квадранта (второго или первого квадранта при медленном росте) чашки Петри в чистую пробирку с 300 мкл деионизированной воды и ресуспензировать с помощью шейкера Microspin FV-2400. В начале и в конце работы, а так же после отбора каждой пробы микробиологическую петлю обжечь в пламени горелки.

Второй этап – омыление. В результате омыления жирные кислоты отщепляются от липидов клеток и превращаются в их натриевые соли. В пробирку, содержащую клетки, добавить 1 мл Реагента 1, плотно закрыть тефлоновой крышкой, встряхнуть и нагревать на кипящей водяной бане около 5 мин. Затем пробирку энергично встряхивать в течение 5–10 сек и продолжить нагревать на кипящей (95–100°C) водяной бане 30 мин.



Рисунок М. 3 - Этапы пробоподготовки образца.

Третий этап – метилирование. Метилирование превращает жирные кислоты (в виде солей натрия) в метиловые эфиры жирных кислот, что увеличивает летучесть жирных кислот для анализа методом газовой хроматографии. Охладить пробирку, открыть крышку и добавить 2 мл Реагента 2. Закрывать пробирку крышкой и несколько раз встряхнуть. Затем нагревать пробирку в течение  $10 \pm 1$  мин при  $80 \pm 1$  °C.

Четвертый этап – экстракция. Метиловые эфиры жирных кислот переводят из водной фазы в органическую фазу с помощью экстракции. Охладить пробирку, открыть крышку и добавить 1.25 мл Реагента 3. Закрывать пробирку крышкой и слабо встряхивать на шейкере Microspin FV-2400 в течение 10 мин. Открыть крышку и отобрать водную фазу (нижнюю) и перенести в новую пробирку с помощью микропипетки. Водная фаза далее не используется.

Пятый этап – промывка. Добавить к органической фазе, оставшейся в пробирке, около 3 мл Реагента 4, закрыть пробирку крышкой и встряхивать на шейкере Microspin FV-2400 в течение 5 мин. Открыть крышку и перенести около 2/3 органической фазы в отдельную пробирку с помощью микропипетки для использования в газовой хроматографии или отправки на хранения. Закрывать пробирку крышкой.

Подготовленные образцы хранятся при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до 7 суток.

#### 5.4 Газовая хроматография подготовленных образцов.

Газовая хроматография подготовленных образцов включает в себя несколько этапов: калибровку, загрузку образцов в автосамплер, хроматографирование и получение хроматограмм.

##### 5.4.1 Калибровка.

Для калибровки используются два калибровочных стандарта: Стандарт 1 (1200-A) и Стандарт быстрой калибровки (1300-AA). Оба калибровочных стандарта содержат одни и те же соединения и автоматически запускаются дважды в начале каждой партии и автоматически повторно анализируются после каждой 11-й инъекции образца.

Стандарты калибровки поставляются в стеклянных ампулах на 2 мл. Ампулы имеют срок годности до трех лет. Закрытые ампулы могут храниться при комнатной температуре. После открытия калибровочный стандарт должен быть охлажден, но перед использованием доведен до комнатной температуры. Когда ампула открыта, ее следует разделить на меньшие объемы и хранить до использования.

Открыв ампулу нужно перенести содержимое с помощью стеклянной пипетки в стеклянный флакон с автоматическим пробоотборником, который содержит вставные вкладыши низкого объема.

##### 5.4.2 Загрузка образцов в автосамплер.

В системах 7890 в автосамплер для образцов помещаются один флакон со стандартом для калибровки и до 99 флаконов с образцами. Как правило, за калибровочным стандартом следует холостая и контрольный образец. Остальные позиции используются для образцов. Для каждого метода должны быть отдельные флаконы калибровочного стандарта. Каждый флакон в автосамплере для образцов должен зарегистрирован (записан) в таблице образцов на компьютере. Перед началом измерений нужно убедиться, что описания, зарегистрированные в таблице образцов, соответствуют флаконам в автосамплере для образцов.

##### 5.4.3 Хроматографирование и получение хроматограмм.

Используются следующие условия хроматографирования:

- хромато-масс-спектрометр газовый – Agilent 5977B GC/MSD
- газовый хроматограф – Agilent 7890B
- колонка HP-5MS (5% фенилметилсиликон, 30м × 0.25 мм × 0.25 мкм)
- вид ионизации – электронный удар
- ввод проб – режим «без деления потока»

- расход газа-носителя (гелия) – 1.2 мл/мин в режиме постоянного потока
- метод ввода пробы – пульсирующий
- давление в испарителе – 175.76 кПа
- температура испарителя – 300°C
- температура интерфейса МСД – 250°C
- температура источника ионов – 230°C
- температура квадруполя МСД – 150°C
- режим программирования температуры термостата колонок: 45°C – 2.25 мин, конечная температура 300°C – 0 мин: скорость нагрева 40°C/мин
- режим стандартного сканирования масс от 50 до 350 а.е.м.
- задержка хроматограммы – 5 мин
- автоматический выбор области шума
- области шума – 0.5 мин
- вид шума – RMS
- сигнал – высота пика

Программное обеспечение контролирует весь процесс анализа.

На экране компьютера отображается получаемая хроматограмма и формируется отчет (Рисунки М. 4, М. 5).

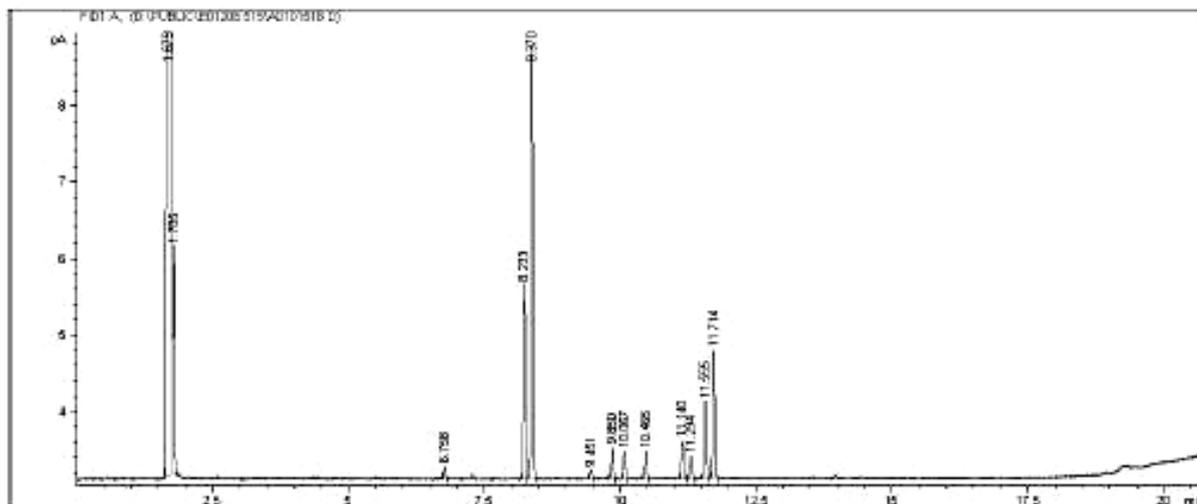


Рисунок М. 4 - Отображение хроматограммы на экране.

Type: Samp      Bottle: 20      Method: TSBA60

Created: 2/8/06 4:07:34 PM

Created By: redding

**Sample ID: UN-Company X-5E(1728-010692B)**

Profile:

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.679	3.453E+8	0.027	—	7.012	SOLVENT PEAK	—	< min rt	
1.785	—	—	—	7.225		—	< min rt	
6.758	771	0.034	1.004	13.619	ISO	1.17	ECL deviates 0.000	Reference 0.009
8.233	12955	0.041	0.973	14.823	15:0 ISO	19.11	ECL deviates 0.000	Reference 0.009
8.370	28869	0.040	0.971	14.713	15:0 ANTEISO	42.48	ECL deviates 0.000	Reference 0.008
9.451	663	0.039	0.954	15.387	16:1 w7c alcohol	0.96	ECL deviates 0.000	
9.850	2118	0.041	0.949	15.627	16:0 ISO	3.05	ECL deviates 0.000	Reference 0.008
10.067	1936	0.040	0.946	15.758	16:1 w11c	2.78	ECL deviates 0.001	
10.465	1913	0.040	0.941	15.999	16:0	2.73	ECL deviates -0.001	Reference 0.007
11.140	2839	0.046	0.934	16.390	ISO 17:1 w10c	4.02	ECL deviates 0.002	
11.294	1631	0.042	0.933	16.479	Sum In Feature 4	2.31	ECL deviates 0.003	17:1 ISO I/ANTEI B
11.555	5794	0.046	0.930	16.631	17:0 ISO	8.17	ECL deviates 0.001	Reference 0.008
11.714	9398	0.043	0.929	16.723	17:0 ANTEISO	13.23	ECL deviates 0.000	Reference 0.007
—	1631	—	—	—	Summed Feature 4	2.31	17:1 ISO I/ANTEI B	17:1 ANTEISO B/i I

ECL Deviation: 0.001

Reference ECL Shift: 0.008

Number Reference Peaks: 7

Total Response: 68887

Total Named: 68887

Percent Named: 100.00%

Total Amount: 65965

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA60 6.00	0.785	Bacillus-subtilis

Рисунок М. 5 - Формируемый отчет по результатам.

Указатель литературы.

1) Komagata K. & Suzuki K.-I. Lipid and cell wall analysis in bacterial systematics // In Colwell R.R. and Grigorova R. ed. Methods in microbiology. Academic Press: New York. 1987. V. 19. P. 161–207.

2) Suzuki K. & Komagata K. Taxonomic significance of cellular fatty acid composition in some coryneform bacteria // Int. J. Syst. Bacteriol. 1983. V. 33. P. 188–200.

3) Нестеренко О.А., Квасников Е.И. и Ногина Т.М. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии // Наукова думка: Киев. 1985. С. 334.

4) Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. 1996. Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa // Canadian J Microbiology. V. 42. pp. 989–1005.

5) Kuykendall, L.D., Roy, M.A., O'Neill, J.J., Devine, T.E. 1988. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum* // International Journal of Systematic Bacteriology. V. 38. pp. 358–361.

6) Miller, L.T. 1982. A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids // Journal of Clinical Microbiology. V. 16. pp. 584–586.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Н

Перечень штаммов, включенных в фонд ВКМ, и информация по ним (верификация СОПа по введению культуры микроорганизма в коллекционный фонд ВКМ).

На русском языке.

### *Acremonium charticola* (J. Lindau 1907) W. Gams 1971

- F-4769 <-- Понизовская В.Б. КМА МГУ, R7. Получен как: *Acremonium charticola*. Штукатурка внутри помещения, собор Рождества Пресвятой Богородицы, Боголюбский монастырь. Владимирская область, Суздальский район, с. Боголюбово. Россия. Номер в NCBI: LT598643. Группа патогенности: 4. (Среда 11, 25 С, С-8, F-1, S-5)

### *Aureobasidium melanogenum* (Hermanides-Nijhof 1977) Zalar, Gostincar et Gunde-Cimerman 2014

- F-4756 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3278. Получен как: *Aureobasidium melanogenum*. Почва, грунт, место утечки нефтепродуктов (дизельное топливо, бензин и авиационный керосин) в месте массового складирования 200-литровых бочек, глубина отбора 2-7 см, разрез LA56-Dr-01 (н\п), станция "Дружная-4", нунатак Лэндинг, Земля Мак-Робертсон, Антарктида. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5).

### *Bjerkandera adusta* (Willdenow 1787) P. Karsten 1879

- F-4751 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3261. Получен как: *Bjerkandera adusta*. Почва, грунт в постоянно используемой дорожной колее гусеничной техники, работающей на дизельном топливе, глубина отбора 0-5 см, разрез LA56-Dr-01 (дор), станция «Дружная-4», нунатак Лэндинг, Земля Мак-Робертсон, Антарктида. Номер в NCBI: MF120203. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-11, S-4, S-5)

### *Cadophora fastigiata* Lagerberg et Melin 1927

- F-4748 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3257. Получен как: *Cadophora fastigiata*. Почва, грунт в постоянно используемой дорожной колее гусеничной техники, работающей на дизельном топливе, глубина отбора 0-5 см, разрез LA56-Dr-01 (дор), станция «Дружная-4», нунатак Лэндинг, Земля Мак-Робертсон, Антарктида. Номер в NCBI: MF494621. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5)

***Cadophora fastigiata*** Lagerberg et Melin 1927

- F-4749 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3259. Получен как: *Cadophora fastigiata*. Почва, грунт в постоянно используемой дорожной колее гусеничной техники, работающей на дизельном топливе, глубина отбора 0-5 см, разрез LA56-Dr-01 (дор), станция «Дружная-4», нунатак Лэндинг, Земля Мак-Робертсон, Антарктида. Номер в NCBI: MF494623. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5)

***Cadophora fastigiata*** Lagerberg et Melin 1927

- F-4761 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3300. Получен как: *Cadophora fastigiata*. Почва, грунт дорожной колеи в непосредственной близости от ДЭС, глубина отбора 0-5 см, разрез LA57-VI-04 (1), станция «Беллинсгаузен», остров Кинг-Джордж, Антарктида. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5).

***Cadophora fastigiata*** Lagerberg et Melin 1927

- F-4772 <-- Грум-Гржимайло О.А. КМА МГУ. Получен как: *Cadophora fastigiata*. Торф сфагновый (0.15 м), заболоченный берег полупресного озера, ББС МГУ. Карельская республика, пос. Приморский. Россия. Номер в NCBI: JX535145. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, S-5, F-1, C-8).

***Cadophora luteo-olivacea*** (J.F.H. Веума 1940) Т.С. Harrington et McNew 2003

- F-4745 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3240. Получен как: *Cadophora luteo-olivacea*. Почва, дорожная колея гусеничной техники, глубина отбора 0-5 см, разрез LA56-Vn-03, научная станция «Оазис», оазис Бангера, Земля Уилкса, Антарктида. Номер в NCBI: MF494614. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5)

***Cadophora luteo-olivacea*** (J.F.H. Веума 1940) Т.С. Harrington et McNew 2003

- F-4746 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3241. Получен как: *Cadophora luteo-olivacea*. Почва, дорожная колея гусеничной техники, глубина отбора 0-5 см, разрез LA56-Vn-03, научная станция «Оазис», оазис Бангера, Земля Уилкса, Антарктида. Номер в NCBI: MF494615. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5)

***Cadophora luteo-olivacea*** (J.F.H. Веума 1940) Т.С. Harrington et McNew 2003

- F-4773 <-- Грум-Гржимайло О.А. КМА МГУ. Получен как: *Cadophora luteo-olivacea*. Торф сфагновый (0.1 m). заболоченный берег полупресного озера, ББС МГУ. Карельская республика, пос. Приморский. Россия. Номер в NCBI: JX535132. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, S-5, F-1, C-8)

*Cadophora malorum* (Kidd et Beaumont 1924) W. Gams 2000

- F-4744 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3239. Получен как: *Cadophora malorum*. Почва, дорожная колея гусеничной техники, глубина отбора 0-5 см. разрез LA56-Bn-03, научная станция «Оазис», оазис Бангера, Земля Уилкса, Антарктида. Номер в NCBI: MF494613. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5)

*Cadophora malorum* (Kidd et Beaumont 1924) W. Gams 2000

- F-4747 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3256. Получен как: *Cadophora malorum*. Почва, грунт в постоянно используемой дорожной колее гусеничной техники, работающей на дизельном топливе, глубина отбора 0-5 см разрез LA56-Dr-01 (дор), станция «Дружная-4», нунатак Лэндинг, Земля Мак-Робертсон, Антарктида. Номер в NCBI: MF494620. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5)

*Chordomyces antarcticus* Bilanenko, Georgieva, A.A. Grum-Grzhimaylo 2015

- F-4770 <-- Понизовская В.Б. КМА МГУ, Т8. Получен как: *Chordomyces antarcticum*. Штукатурка внутри помещения, флигель, Тверская областная картинная галерея. Тверь. Россия. Номер в NCBI: LT549083. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5)

*Coniochaeta* sp.

- F-4750 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3260. Получен как: *Coniochaeta* sp. Почва, грунт в постоянно используемой дорожной колее гусеничной техники, работающей на дизельном топливе, глубина отбора 0-5 см разрез LA56-Dr-01 (дор), станция «Дружная-4», нунатак Лэндинг, Земля Мак-Робертсон, Антарктида. Номер в NCBI: MF120202. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5).

*Cosmospora berkeleyana* (P. Karsten 1891) Grafenhan, Seifert et Schroers 2011

- F-4760 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3298. Получен как: *Cosmospora berkeleyana*. Почва, грунт дорожной колеи в непосредственной близости от ДЭС, глубина отбора 0-5 см. разрез LA57-BI-04 (1), станция «Беллинсгаузен», остров Кинг-Джордж, Антарктида. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5)

*Cytospora* sp.

- F-4752 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3262. Получен как: *Cytospora* sp. Почва, грунт в постоянно используемой дорожной колее гусеничной техники, работающей на дизельном топливе, глубина отбора 0-5 см разрез LA56-Dr-01 (дор), станция «Дружная-4», нунатак Лэндинг, Земля Мак-

Робертсон, Антарктида. Номер в NCBI: MF120204. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5). ()

***Exophiala xenobiotica*** de Hoog, J.S. Zeng, Harrak et Deanna A. Sutton 2006

F-4754 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3267. Получен как: *Exophiala xenobiotica*. Почва, грунт в постоянно используемой дорожной колее гусеничной техники, работающей на дизельном топливе, глубина отбора 0-5 см разрез LA56-Dr-01 (дор), станция «Дружная-4», нунатак Лэндинг, Земля Мак-Робертсон, Антарктида. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5). ()

***Fomitopsis pinicola*** (Swartz 1810) P. Karsten 1881

F-4741 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3232. Получен как: *Fomitopsis pinicola*. Почва, дорожная колея гусеничной техники, глубина отбора 0-5 см. разрез LA56-Bn-03, научная станция «Оазис», оазис Бангера, Земля Уилкса, Антарктида. Номер в NCBI: MF120199. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-11, S-4, S-5)

***Fusicladium peltigericola*** Crous et Diederich 2010

F-4740 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3226. Получен как: *Fusicladium peltigericola*. Почва, поверхностный органо-минеральный горизонт (маломощная моховая подушка), глубина отбора 0-2 см, разрез LA55-Pr-02, станция «Прогресс-2», оазис Холмы Ларсеманна, Земля Мак-Робертсон, Антарктида. Номер в NCBI: MF494608. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5).

***Isaria farinosa*** (Holmskjold 1781) Fries 1832

F-4739 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3224. Получен как: *Isaria farinosa*. Почва, поверхностный органо-минеральный горизонт (маломощная моховая подушка), глубина отбора 0-2 см, разрез LA55-Pr-02, станция «Прогресс-2», оазис Холмы Ларсеманна, Земля Мак-Робертсон, Антарктида. Номер в NCBI: MF494607. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5)

***Mammaria echinobotryoides*** Cesati 1854

F-4762 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3304. Получен как: *Mammaria echinobotryoides*. Почва, грунт дорожной колеи в непосредственной близости от ДЭС, глубина отбора 0-5 см, разрез LA57-BI-04 (1), станция «Беллинсгаузен», остров Кинг-Джордж, Антарктида. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, С-8, F-1, S-5).

***Mucor hiemalis*** Wehmer 1903

- F-4774 <-- Грум-Гржимайло О.А. КМА МГУ. Получен как: *Mucor hiemalis*. Подзолистая почва, горизонт А, северо-таежный хвойный лес, ББС МГУ. Карельская республика, пос. Приморский. Россия. Номер в NCBI: JX535127. Группа патогенности: 4. (Среда 9, 25 С, S-5, F-1, C-8)

***Paraphoma fimeti*** (Brunaud 1889) Gruyter, Aveskamp et Verkley 2012

- F-4743 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3237. Получен как: *Paraphoma fimeti*. Почва, дорожная колея гусеничной техники, глубина отбора 0-5 см. разрез LA56-Bn-03, научная станция «Оазис», оазис Бангера, Земля Уилкса, Антарктида. Номер в NCBI: MF494612. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, C-8, F-1, S-5).

***Paraphoma fimeti*** (Brunaud 1889) Gruyter, Aveskamp et Verkley 2016

- F-4753 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3265. Получен как: *Paraphoma fimeti*. Почва, грунт в постоянно используемой дорожной колее гусеничной техники, работающей на дизельном топливе, глубина отбора 0-5 см разрез LA56-Dr-01 (дор), станция «Дружная-4», нунатак Лэндинг, Земля Мак-Робертсон, Антарктида. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, C-8, F-1, S-5)

***Phaeosphaeria* sp.**

- F-4755 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3272. Получен как: *Phaeosphaeria* sp. Почва, грунт, место утечки нефтепродуктов (дизельное топливо, бензин и авиационный керосин) в месте массового складирования 200-литровых бочек, глубина отбора 2-7 см, разрез LA56-Dr-01, станция "Дружная-4", нунатак Лэндинг, Земля Мак-Робертсон, Антарктида. Номер в NCBI: MF120205. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 С, C-8, F-1, S-5). ( )

***Phoma herbarum*** Westendorp 1852

- F-4757 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3290. Получен как: *Phoma herbarum*. Почва, поверхностный органо-минеральный горизонт (маломощная моховая подушка), глубина отбора 2-7 см, разрез LA56-Ml-03, станция "Молодежная", оазис Холмы Тала, Земля Эндерби, Антарктида. Группа патогенности: 4. (Среда 9, 25 С, C-8, F-1, S-5).

***Pseudeurotium hygrophilum*** (Sogonov, W. Gams, Summerbell et Schroers 2005) Minnis et D.L. Lindner 2013

- F-4764 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3311. Получен как: *Pseudeurotium hygrophilum*. Почва, грунт дорожной колеи в непосредственной близости от ДЭС, глубина отбора 0-5 см, разрез LA57-Bl-04 (1),

станция "Беллинсгаузен", остров Кинг-Джордж, Антарктида. Группа патогенности: нет. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5)

***Sarocladium kiliense*** (Grütz 1925) Summerbell 2011

F-4771 <-- Понизовская В.Б. КМА МГУ, 45G. Получен как: *Sarocladium kiliense* Штукатурка внутри помещения, Государственный научно-исследовательский институт реставрации. Москва. Россия. Номер в NCBI: LT549067. Группа патогенности: нет. (Среда 11, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Thelebolus microsporus*** (Berkeley et Broome 1865) Kimbrough 1967

F-4759 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3295. Получен как: *Thelebolus microsporus*. Почва, подповерхностный (под карбонатной коркой) горизонт минеральной почвы криогенного полигона, глубина отбора 1-6 см, разрез LA56-Dг-03, станция "Дружная-4", нунатак Лэндинг, Земля Мак-Робертсон, Антарктида. Номер в NCBI: MF120208. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 20 C, C-8, F-1, S-5)

***Trichosporiella cerebriformis*** (G.A. de Vries et Kleine-Natrop) W. Gams 1971

F-4763 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3308. Получен как: *Trichosporiella cerebriformis*. Почва, грунт дорожной колеи в непосредственной близости от ДЭС, глубина отбора 0-5 см. разрез LA57-BI-04 (1), станция «Беллинсгаузен», остров Кинг-Джордж, Антарктида. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Venturia tremulae*** Aderhold 1897

F-4742 <-- ВКМ ИБФМ, ВКМ FW-3234. Получен как: *Venturia tremulae*. Почва, дорожная колея гусеничной техники, глубина отбора 0-5 см. разрез LA56-Bп-03, научная станция «Оазис», оазис Бангера, Земля Уилкса, Антарктида. Номер в NCBI: MF494610. Группа патогенности: нет. (Среда 9, 20 C, C-8, F-1, S-5)

На английском языке.

***Acremonium charticola*** (J. Lindau 1907) W. Gams 1971

F-4769 <-- Ponizovskaya V.B. DMA MSU, R7. Received as: *Acremonium charticola*. Ex: plaster, indoor, cathedral of the Nativity of the Blessed Virgin, Bogolyubsky Monastery. Vladimir Region, Suzdal District, Bogoliubovo. Russia. DNA sequences: LT598643. Risk group: 4. (Medium 11, 25 C, C-8, F-1, S-5).

*Aureobasidium melanogenum* (Hermanides-Nijhof 1977) Zalar, Gostincar et Gunde-Cimerman 2014

F-4756 <-- VKM IBPM, VKM FW-3278. Received as: *Aureobasidium melanogenum*. Ex: soil, ground in the immediate vicinity of the incinerator plant that burns household waste and operates on diesel oil, depth 0-5 cm, soil pit LA56-Dr-01 (n\p), Druzhnaya-4 Station, Landing nunatak, MacRobertson Land, Antarctica. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

*Bjerkandera adusta* (Willdenow 1787) P. Karsten 1879

F-4751 <-- VKM IBPM, VKM FW-3261. Received as: *Bjerkandera adusta*. Ex: soil, constantly used caterpillar track on the ground (diesel oil), depth 0-5 cm, soil pit LA56-Dr-01 (road), Base Druzhnaya-4, Landing Nunatak, MacRobertson Land, Antarctica. DNA sequences: MF120203. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-11, S-4, S-5).

*Cadophora fastigiata* Lagerberg et Melin 1927

F-4748 <-- VKM IBPM, VKM FW-3257. Received as: *Cadophora fastigiata*. Ex: soil, constantly used caterpillar track on the ground (diesel oil), depth 0-5 cm, soil pit LA56-Dr-01 (road), Base Druzhnaya-4, Landing Nunatak, MacRobertson Land, Antarctica. DNA sequences: MF494621. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

*Cadophora fastigiata* Lagerberg et Melin 1927

F-4749 <-- VKM IBPM, VKM FW-3259. Received as: *Cadophora fastigiata*. Ex: soil, constantly used caterpillar track on the ground (diesel oil), depth 0-5 cm, soil pit LA56-Dr-01 (road), Base Druzhnaya-4, Landing Nunatak, MacRobertson Land, Antarctica. DNA sequences: MF494623. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

*Cadophora fastigiata* Lagerberg et Melin 1927

F-4761 <-- VKM IBPM, VKM FW-3300. Received as: *Cadophora fastigiata*. Ex: soil, caterpillar track on the ground in close proximity to diesel generator, depth 0-5 cm, soil pit LA57-BI-04 (1), Bellingshausen Station, King George Island, Antarctica. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

*Cadophora fastigiata* Lagerberg et Melin 1927

F-4772 <-- Grum-Grzhimaylo O.A. DMA MSU. Received as: *Cadophora fastigiata*. Ex: sphagnum peat (0.15 m), boggy coast of the fresh-marine lake, White Sea Biological Station MSU. Republic Karelia, Poselok Primorskiy. Russia DNA sequences: JX535145. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, S-5, F-1, C-8).

***Cadophora luteo-olivacea*** (J.F.H. Beyma 1940) T.C. Harrington et McNew 2003

F-4745 <-- VKM IBPM, VKM FW-3240. Received as: *Cadophora luteo-olivacea*. Ex: soil, caterpillar track on the ground, depth 0-5 cm, soil pit LA56-Bn-03, Oasis Station, Bunger Oasis, Wilkes Land, Antarctica. DNA sequences: MF494614. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Cadophora luteo-olivacea*** (J.F.H. Beyma 1940) T.C. Harrington et McNew 2003

F-4746 <-- VKM IBPM, VKM FW-3241. Received as: *Cadophora luteo-olivacea*. Ex: soil, caterpillar track on the ground, depth 0-5 cm, soil pit LA56-Bn-03, Oasis Station, Bunger Oasis, Wilkes Land, Antarctica. DNA sequences: MF494615. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Cadophora luteo-olivacea*** (J.F.H. Beyma 1940) T.C. Harrington et McNew 2003

F-4773 <-- Grum-Grzhimaylo O.A. DMA MSU. Received as: *Cadophora luteo-olivacea*. Ex: sphagnum peat (0.1 m), boggy coast of the fresh-marine lake, White Sea Biological Station MSU. Republic Karelia, Poselok Primorskiy. Russia DNA sequences: JX535132. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, S-5, F-1, C-8).

***Cadophora malorum*** (Kidd et Beaumont 1924) W. Gams 2000

F-4744 <-- VKM IBPM, VKM FW-3239. Received as: *Cadophora malorum*. Ex: soil, caterpillar track on the ground, depth 0-5 cm, soil pit LA56-Bn-03, Oasis Station, Bunger Oasis, Wilkes Land, Antarctica. DNA sequences: MF494613. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Cadophora malorum*** (Kidd et Beaumont 1924) W. Gams 2000

F-4747 <-- VKM IBPM, VKM FW-3256. Received as: *Cadophora malorum*. Ex: soil, constantly used caterpillar track on the ground (diesel oil), depth 0-5 cm, soil pit LA56-Dr-01 (road), Base Druzhnaya-4, Landing Nunatak, MacRobertson Land, Antarctica. DNA sequences: MF494620. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Chordomyces antarcticus*** Bilanenko, Georgieva, A.A. Grum-Grzhimaylo 2015

F-4770 <-- Ponizovskaya V.B. DMA MSU, T8. Received as: *Chordomyces antarcticum*. Ex: plaster, indoor, Wing, Tver Regional Picture Gallery. Tver. Russia. DNA sequences: LT549083. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Coniochaeta* sp.**

F-4750 <-- VKM IBPM, VKM FW-3260. Received as: *Coniochaeta* sp. Ex: soil, constantly used caterpillar track on the ground (diesel oil), depth 0-5 cm, soil

pit LA56-Dr-01 (road), Base Druzhnaya-4, Landing Nunatak, MacRobertson Land, Antarctica. DNA sequences: MF120202. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Cosmospora berkeleyana*** (P. Karsten 1891) Grafenhan, Seifert et Schroers 2011

F-4760 <-- VKM IBPM, VKM FW-3298. Received as: *Cosmospora berkeleyana*. Ex: soil, caterpillar track on the ground in close proximity to diesel generator, depth 0-5 cm, soil pit LA57-BI-04 (1), Bellingshausen Station, King George Island, Antarctica. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Cytospora* sp.**

F-4752 <-- VKM IBPM, VKM FW-3262. Received as: *Cytospora* sp. Ex: soil, constantly used caterpillar track on the ground (diesel oil), depth 0-5 cm, soil pit LA56-Dr-01 (road), Base Druzhnaya-4, Landing Nunatak, MacRobertson Land, Antarctica. DNA sequences: MF120204. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Exophiala xenobiotica*** de Hoog, J.S. Zeng, Harrak et Deanna A. Sutton 2006

F-4754 <-- VKM IBPM, VKM FW-3267. Received as: *Exophiala xenobiotica*. Ex: soil, constantly used caterpillar track on the ground (diesel oil), depth 0-5 cm, soil pit LA56-Dr-01 (road), Base Druzhnaya-4, Landing Nunatak, MacRobertson Land, Antarctica. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Fomitopsis pinicola*** (Swartz 1810) P. Karsten 1881

F-4741 <-- VKM IBPM, VKM FW-3232. Received as: *Fomitopsis pinicola*. Ex: soil, caterpillar track on the ground, depth 0-5 cm, soil pit LA56-Bn-03, Oasis Station, Bunge Oasis, Wilkes Land, Antarctica. DNA sequences: MF120199. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-11, S-4, S-5).

***Fusicladium peltigericola*** Crous et Diederich 2010

F-4740 <-- VKM IBPM, VKM FW-3226. Received as: *Fusicladium peltigericola*. Ex: soil, surface organic-mineral horizon (low-power moss layer), depth 0-2 cm, soil pit LA55-Pr-02, Progress-2 Station, Larsemann Hills Oasis, MacRobertson Land, Antarctica. DNA sequences: MF494608. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Isaria farinosa*** (Holmskjöld 1781) Fries 1832

F-4739 <-- VKM IBPM, VKM FW-3224. Received as: *Isaria farinosa*. Ex: soil, surface organic-mineral horizon (low-power moss layer), depth 0-2 cm, soil pit LA55-Pr-02, Progress-2 Station, Larsemann Hills Oasis, MacRobertson

Land, Antarctica. DNA sequences: MF494607. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Mammaria echinobotryoides*** Cesati 1854

F-4762 <-- VKM IBPM, VKM FW-3304. Received as: *Mammaria echinobotryoides*. Ex: soil, caterpillar track on the ground in close proximity to diesel generator, depth 0-5 cm, soil pit LA57-BI-04 (1), Bellingshausen Station, King George Island, Antarctica. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Mucor hiemalis*** Wehmer 1903

F-4774 <-- Grum-Grzhimaylo O.A. DMA MSU. Received as: *Mucor hiemalis*. Ex: podzolic soil, A horizon, northern-taiga forest, White Sea Biological Station MSU. Republic Karelia, Poselok Primorskiy. Russia DNA sequences: JX535127. Risk group: 4. (Medium 9, 25 C, S-5, F-1, C-8).

***Paraphoma fimeti*** (Brunaud 1889) Gruyter, Aveskamp et Verkley 2012

F-4743 <-- VKM IBPM, VKM FW-3237. Received as: *Paraphoma fimeti*. Ex: soil, caterpillar track on the ground, depth 0-5 cm, soil pit LA56-Bn-03, Oasis Station, Bunge Oasis, Wilkes Land, Antarctica. DNA sequences: MF494612. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Paraphoma fimeti*** (Brunaud 1889) Gruyter, Aveskamp et Verkley 2016

F-4753 <-- VKM IBPM, VKM FW-3265. Received as: *Paraphoma fimeti*. Ex: soil, constantly used caterpillar track on the ground (diesel oil), depth 0-5 cm, soil pit LA56-Dr-01 (road), Base Druzhnaya-4, Landing Nunatak, MacRobertson Land, Antarctica. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Phaeosphaeria* sp.**

F-4755 <-- VKM IBPM, VKM FW-3272. Received as: *Phaeosphaeria* sp. Ex: soil, ground in the immediate vicinity of the incinerator plant that burns household waste and operates on diesel oil, depth 0-5 cm, soil pit LA56-Dr-01, Base Druzhnaya-4, Landing Nunatak, MacRobertson Land, Antarctica. DNA sequences: MF120205. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Phoma herbarum*** Westendorp 1852

F-4757 <-- VKM IBPM, VKM FW-3290. Received as: *Phoma herbarum*. Ex: soil, surface organic-mineral horizon (low-power moss layer), depth 2-7 cm, soil pit LA56-MI-03, Molodyozhnaya Station, Thala Hills Oasis, Enderby Land, Antarctica. Risk group: 4. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Phoma herbarum*** Westendorp 1852

- F-4758 <-- VKM IBPM, VKM FW-3293. Received as: *Phoma herbarum*. Ex: soil, surface organic-mineral horizon (under loosely bound layer of lichen), depth 2-6 cm, soil pit LA56-Dr-02, Base Druzhnaya-4, Landing Nunatak, MacRobertson Land, Antarctica. Risk group: 4. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Pseudeurotium hygrophilum*** (Sogonov, W. Gams, Summerbell et Schroers 2005) Minnis et D.L. Lindner 2013

- F-4764 <-- VKM IBPM, VKM FW-3311. Received as: *Pseudeurotium hygrophilum*. Ex: soil, caterpillar track on the ground in close proximity to diesel generator, depth 0-5 cm, soil pit LA57-BI-04 (1), Bellingshausen Station, King George Island, Antarctica. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Sarocladium kiliense*** (Grütz 1925) Summerbell 2011

- F-4771 <-- Ponizovskaya V.B. DMA MSU, 45G. Received as: *Sarocladium kiliense*. Ex: plaster, indoor, National Institute of Restoration. Moscow. Russia. DNA sequences: LT549067. Risk group: no. (Medium 11, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Thelebolus microsporus*** (Berkeley et Broome 1865) Kimbrough 1967

- F-4759 <-- VKM IBPM, VKM FW-3295. Received as: *Thelebolus microsporus*. Ex: soil, subsurface horizon (under the carbonate crust) of the mineral soil of the cryogenic region, depth 1-6 cm, soil pit LA56-Dr-03, Base Druzhnaya-4, Landing Nunatak, MacRobertson Land, Antarctica. DNA sequences: MF120208. Risk group: no. (Medium 9, 20 C, C-8, F-1, S-5).

***Trichosporiella cerebriformis*** (G.A. de Vries et Kleine-Natrop) W. Gams 1971

- F-4763 <-- VKM IBPM, VKM FW-3308. Received as: *Trichosporiella cerebriformis*. Ex: soil, caterpillar track on the ground in close proximity to diesel generator, depth 0-5 cm, soil pit LA57-BI-04 (1), Bellingshausen Station, King George Island, Antarctica. Risk group: no. (Medium 9, 25 C, C-8, F-1, S-5).

***Venturia tremulae*** Aderhold 1897

- F-4742 <-- VKM IBPM, VKM FW-3234. Received as: *Venturia tremulae*. Ex: soil, caterpillar track on the ground, depth 0-5 cm, soil pit LA56-Bn-03, Oasis Station, Bunge Oasis, Wilkes Land, Antarctica. DNA sequences: MF494610. Risk group: no. (Medium 9, 20 C, C-8, F-1, S-5).

## ПРИЛОЖЕНИЕ П

Библиографический список публикаций, подготовленных в результате выполнения научно-исследовательской работы в рецензируемых журналах (Scopus, WoS):

1) Ryzhmanova, Y. Oshurkova V. Troshina O., Abashina T., Ariskina E., Avtukh A., Shcherbakova V. *Anoxyatronum buryatiense* sp. nov., an anaerobic alkaliphilic bacterium from a low mineralization soda lake in Buryatia, Russia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, Vol. 67, P. 4704-4709. DOI 10.1099/ijsem.0.002365.

2) Oshurkova V., Trubitsyn V., Ryzhmanova Ya., Levko O., Shcherbakova V. *Methanosarcina gilichinskyana* sp. nov., a novel methanogenic archaeon isolated from Holocene permafrost, North East Russia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (представлена к печати, Ms. No. IJSEM-D-17-00719).

3) Dorofeeva L.V., Starodumova I.P., Prisyazhnaya N.V., Krauzova V.I., Lysanskaya V.Y., Vinokurova, Evtushenko L.I. *Rathayibacter oskolensis* sp. nov., a novel actinobacterium from *Androsace koso-poljanskii* Ovcz., an endemic plant to Central Russian Upland, Russia *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (представлена к печати, Ms. No. IJSEM-D-17-00762).