

**Стандартная операционная процедура по криоконсервации культур
алканотрофных актинобактерий**

**Региональная профилированная коллекция алканотрофных
микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ)**

Верификация штаммов:

1. *Gordonia alkanivorans* ИЭГМ 748
2. *Gordonia rubripertincta* ИЭГМ 96
3. *Gordonia rubripertincta* ИЭГМ 731
4. *Gordonia terrae* ИЭГМ 136
5. *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 10
6. *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 20
7. *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 186
8. *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 200
9. *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 204
10. *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 270
11. *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 487
12. *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 708
13. *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 767
14. *Rhodococcus fascians* ИЭГМ 34
15. *Rhodococcus fascians* ИЭГМ 35
16. *Rhodococcus fascians* ИЭГМ 40
17. *Rhodococcus opacus* ИЭГМ 56
18. *Rhodococcus opacus* ИЭГМ 249
19. *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 63
20. *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 66
21. *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 608
22. *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 647
23. *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 219
24. *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 230
25. *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231

26. *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 235

27. *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 326

28. *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 327

29. *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 338

30. *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 346

Криоконсервация (при -86°C) коллекционных бактериальных культур осуществляется следующим образом.

Этап 1. Проверка на аутентичность в соответствии с требованиями СОП по проверке качества (аутентичности) поддерживаемого фонда алканотрофных актинобактерий.

Этап 2. Выращивание бактерий на агаризованных питательных средах в оптимальных условиях, обозначенных в Каталоге Коллекции ИЭГМ (www.iegmc.org).

Этап 3. Бактерии, находящиеся в начале стационарной фазы роста, суспендируют с помощью микровстряхивателя в 10 мл дистиллированной воды до начальной концентрации порядка 10^8 – 10^9 клеток/мл.

Этап 4. Стерильные пластиковые криопробирки с винтовой крышкой объемом 2,0 мл (Simport) не менее 2-х для каждой коллекционной культуры маркируют с указанием номера штамма и даты (месяц, год) криоконсервации.

Этап 5. В качестве криопротектора используют 20% глицерин, который разливают в стеклянные пробирки (20 мл) по 10 мл и стерилизуют автоклавированием при 1 атм. в течение 20 мин.

Этап 6. В стерильные криопробирки (не менее 2-х для каждой культуры) разливают по 0,9 мл бактериальной суспензии, добавляют по 0,9 мл 20% глицерина и закрывают крышками.

Этап 7. Полученную бактериальную взвесь (0,1 мл) используют для определения жизнеспособности культуры перед криоконсервацией. При этом бактериальную взвесь помещают на поверхность агаризованной среды, обеспечивающей оптимальный рост культуры.

Этап 8. После 15-ти минутной эквilibрации заполненные криопробирки помещают в пластиковые коробки с ячейками и приступают к низкотемпературному охлаждению с помощью вертикального низкотемпературного морозильника (-86°C , Sanyo, Япония).

Этап 9. Перед использованием замороженный образец размораживают при комнатной температуре и проверяют жизнеспособность культуры с помощью высокоточного респирометра Micro-Oxymax[®] (Columbus Instruments, США).

Криоконсервация (при -86°C) бактериальных культур осуществляется с использованием следующего оборудования, материалов и реагентов: автоклав вертикальный, термостат, микровстряхиватель, вертикальный низкотемпературный морозильник, респирометр, одноканальный механический дозатор переменного объема (рабочий объем 0,1–1,0 мл) с набором наконечников, стерильные пластиковые криопробирки с винтовой крышкой объемом 2,0 мл, микробиологическая петля, спиртовка стеклянная, штатив пластиковый для пробирок, пластиковые коробки с ячейками, стеклянные пробирки с дистиллированной водой, этиловый спирт, 20% раствор глицерина, питательный агар для культивирования.

Штамм *G. alkanivorans* ИЭГМ 748 помещен на криохраниение 06.04.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86°C . Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *G. alkanivorans* ИЭГМ 748 в присутствии криопротектора при температуре -86°C обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение пяти и более лет.

Штамм *G. rubripertincta* ИЭГМ 96 помещен на криохраниение 06.04.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86°C . Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *G. rubripertincta* ИЭГМ 96 в присутствии криопротектора при температуре -86°C обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение четырех и более лет.

Штамм *G. rubripertincta* ИЭГМ 731 помещен на криохраниение 11.04.2017 г. Бактериальная суспензия ИЭГМ 731 хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86°C . Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *G. rubripertincta* ИЭГМ 731 в присутствии криопротектора при температуре -86°C обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение четырех и более лет.

Штамм *G. terrae* ИЭГМ 136 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 11.04.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86°C . Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *G. terrae* ИЭГМ 136 в присутствии криопротектора при температуре -86°C обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение четырех и более лет.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 10 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 14.04.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 10 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение четырех и более лет.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 20 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 14.04.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 20 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение четырех и более лет.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 186 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 14.04.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 186 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение четырех и более лет.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 200 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 31.05.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 200 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение четырех и более лет.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 204 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 31.05.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 204 в присутствии криопротектора при температуре -86°С

обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение трех и более лет.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 270 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 31.05.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 270 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение четырех и более лет.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 487 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 31.05.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 487 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение четырех и более лет.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 708 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 05.06.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 708 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение четырех и более лет.

Штамм бактерии *R. erythropolis* ИЭГМ 767 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 05.06.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 767 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение четырех и более лет.

Штамм *R. fascians* ИЭГМ 34 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 05.06.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной

операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. fascians* ИЭГМ 34 в присутствии криопротектора при температуре -86°C обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение четырех и более лет.

Штамм *R. fascians* ИЭГМ 35 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 08.06.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86°C . Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. fascians* ИЭГМ 35 в присутствии криопротектора при температуре -86°C обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение четырех и более лет.

Штамм *R. fascians* ИЭГМ 40 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 08.06.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86°C . Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. fascians* ИЭГМ 40 в присутствии криопротектора при температуре -86°C обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение четырех и более лет.

Штамм *R. opacus* ИЭГМ 56 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 08.06.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86°C . Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. opacus* ИЭГМ 56 в присутствии криопротектора при температуре -86°C обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение пяти и более лет.

Штамм *R. opacus* ИЭГМ 249 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 13.06.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86°C . Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. opacus* ИЭГМ 249 в присутствии криопротектора при температуре -86°C обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение пяти и более лет.

Штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 63 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 13.06.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в

криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 63 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение одиннадцати и более лет.

Штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 13.06.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение трех и более лет.

Штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 608 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 15.06.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 608 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение трех и более лет.

Штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 15.06.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение трех и более лет.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 219 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 19.07.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. ruber* ИЭГМ 219 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение трех и более лет.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 230 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 19.07.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. ruber* ИЭГМ 230 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение трех и более лет.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 231 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 02.02.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение трех и более лет.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 235 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 07.02.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. ruber* ИЭГМ 235 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение трех и более лет.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 326 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 07.02.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. ruber* ИЭГМ 326 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение трех и более лет.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 327 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 07.02.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. ruber* ИЭГМ 327 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает

гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение трех и более лет.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 338 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 07.02.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. ruber* ИЭГМ 338 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение трех и более лет.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 346 помещен на криохраниение в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов 07.02.2017 г. Бактериальная суспензия хранится в криопробирках в 20% растворе глицерина при температуре -86 °С. Проверка на аутентичность осуществлялась согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре. Хранение бактериальных клеток *R. ruber* ИЭГМ 346 в присутствии криопротектора при температуре -86°С обеспечивает гарантированное сохранение их высокой жизнеспособности в течение трех и более лет.