

**Стандартная операционная процедура по проверке качества  
(аутентичности) поддерживаемого фонда алканотрофных  
микроорганизмов**

**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

Оценка аутентичности коллекционных штаммов (соответствия паспортным данным и видовым свойствам) проводится путем проверки морфолого-культуральных, хемотаксономических и генетических признаков бактерий.

Экспертиза аутентичности коллекционных штаммов проводится систематически (через определенные промежутки времени) в процессе их длительного хранения различными методами и параллельно с проверкой жизнеспособности и чистоты культур.

Основные направления организации контроля качества: (1) контроль за соблюдением требований к условиям проведения микробиологических исследований: лабораторные помещения, воздушная среда, температурные режимы инкубации и хранения, режимы дезинфекции и стерилизации и т.д.; (2) выполнение регламентированных процедур ведения коллекционных бактериальных культур; (3) контроль качества питательных сред; (4) систематический анализ результатов контрольных процедур в целях совершенствования СОП по качеству.

Последовательность действий по экспертизе аутентичности: лиофилизированная (криоконсервированная) культура тест-штамма – восстановление культуры – контроль качества: проверка на чистоту роста и отсутствие диссоциации, проверка основных свойств, подтверждающих подлинность бактериального штамма, согласно Паспорту. В случае обнаружения более 25% полиморфных колоний и/или несоответствия паспортным свойствам – бактериальная культура не может быть использована в работе.

**Этап 1.** *Восстановление лиофилизированной культуры:* оттянутый конец ампулы с лиофилизированной культурой нагревают над пламенем горелки, влажным концом стерильного ватного тампона прикасаются к нагретой части, в результате чего появляются трещины. Конец ампулы накрывают трехслойной марлевой салфеткой, смоченной этиловым спиртом (70°) и хорошо отжатой, и обламывают пинцетом. После вскрытия ампула остается накрытой той же салфеткой в течение 1–2 мин. Затем салфетку осторожно снимают и вместе с остатками стекла погружают в дезраствор. В ампулу вносят к 0,3 мл питательного бульона для регидратации. Содержимое ампулы перемешивают, переносят стерильной пастеровской пипеткой или шприцем в пробирку с питательным бульоном и инкубируют при 30°С в течение 48–72 ч. Оставшуюся бульонную культуру используют для оценки

степени диссоциации тестируемого штамма. После инкубации из питательного бульона делают высев петлей на скошенный питательный агар в две пробирки. При восстановлении штамма посев осуществляется на скошенный питательный агар. Посевы инкубируют при 30°C 48–72 ч. Одну пробирку с посевом используют для постановки тестов на соответствие полученного штамма видовым и паспортным свойствам. Второй посев на скошенном питательном агаре используют для создания запасов рабочей культуры. Культура с измененными свойствами в работу не допускается.

Восстановление криоконсервированной культуры: деконсервацию клеток осуществляют путем отогрева криопробирки на водяной бане при температуре 37°C. Из криопробирки с бактериальной суспензией в растворе криопротектора отбирают аликвоту 100 мкл и производят посев в жидкую питательную среду или на соответствующую плотную питательную среду в чашки Петри. Культивирование бактериальных клеток осуществляют при 28°C в течение 48–72 ч.

1.1. *Создание запасов рабочей культуры.* При удовлетворительном прохождении контрольных тестов культуру со скошенного питательного агара засевают уколом в столбик с полужидким агаром. В зависимости от интенсивности работы лаборатории посев проводят в 4–7 пробирок, из расчета по 1–2 пробирки на 1 месяц работы и в 1 пробирку для восполнения запасов рабочей культуры через три месяца на следующий квартал. Посевы инкубируют 72 ч при 30°C. При наличии роста пробирки закрывают 48–72 ч резиновыми пробками и закладывают на хранение при температуре 4–8°C. Одну из пробирок с культурой, предназначенной для восполнения рабочих запасов, маркируют и хранят отдельно. Запасы рабочей культуры желательнее хранить в отдельном холодильнике.

1.2. *Восполнение запасов рабочей культуры.* Восполнение запасов рабочей культуры производится в конце третьего, шестого и девятого месяца с момента вскрытия ампулы или криопробирки (каждые 3 мес). Для восполнения запасов рабочей культуры используется субкультура на среде хранения, полученная ранее при создании запасов или при очередном их восполнении. Из пробирки с культурой, предназначенной для восполнения запасов, производят посев в питательный бульон. Посевы инкубируют при 30°C в течение 48–72 ч. Оставшуюся бульонную культуру используют для оценки степени диссоциации. После инкубации из питательного бульона делают высев петлей в две пробирки со скошенным питательным агаром. Посевы инкубируют при 30°C 48–72 ч. Один из посевов используют для постановки тестов на соответствие полученного штамма видовым, паспортным свойствам. Второй посев на скошенном питательном агаре используют для восполнения запасов рабочей культуры. При удовлетворительном прохождении контрольных тестов процедура закладки культуры на хранение осуществляется согласно п. 1.1. Восполнение запасов рабочей культуры проводят только 3 раза. По истечении года необходимо получить новую эталонную культуру из Коллекции ИЭГМ ([www.iegmcol](http://www.iegmcol)).

**Этап 2. Проверка культуры на чистоту:** готовят суспензию культуры и высевают ее на адекватные агаризованные питательные среды, обозначенные в Каталоге Коллекции ИЭГМ ([www.iegmcol](http://www.iegmcol)), глубинным методом либо используют рассев петлей. Засеянные чашки Петри или пробирки инкубируют в оптимальных условиях, обозначенных в Каталоге Коллекции ИЭГМ ([www.iegmcol](http://www.iegmcol)), в течение 3–6 сут. Совпадение морфологии и микроскопической картины выросших колоний свидетельствует о высоком показателе чистоты культуры.

**Этап 3. Проверка степени диссоциации культуры:** из 24-часовой бульонной культуры делают 10-кратные разведения физиологическим раствором. По 0,1 мл из 5-го и 6-го разведений засевают на 2 чашки питательного агара, предварительно подсушенные в термостате. Шпателем посева распределяют по поверхности агара до полного исчезновения влаги и инкубируют в термостате при температуре 30°C в течение 48–72 ч. Выбирают чашки, на которых выросло от 30 до 100 колоний. Проверку штамма на диссоциацию производят путем визуального просмотра изолированных колоний на чашках в прямом и косонаправленном свете через бинокулярную лупу или микроскоп на малом увеличении. В *R*-форме колонии бактерий более плоские, большего размера, неправильной формы с неровными краями и шероховатой, матовой поверхностью. При наличии диссоциации (по размеру, *M*-, *S*- и *R*-диссоциация) подсчитывают количество измененных колоний и общее количество просмотренных колоний. Общее количество просмотренных бактерий не должно быть менее 30. Рассчитывают процент диссоциации по формуле: % диссоциации = (количество измененных колоний/общее количество просмотренных колоний) × 100%. Если численность диссоциированных колоний превышает 25%, то данная культура не пригодна для дальнейшего использования. В связи с выраженным полиморфизмом колоний для штаммов отдельных видов актинобактерий рода *Rhodococcus* оценка *M-R-S* диссоциации не проводится.

**Этап 4. Оценка морфолого-культуральных, хемотаксономических и генетических свойств** бактериальной культуры согласно паспортным данным.

4.1. *Определение морфологии* клеток проводят в окрашенных разбавленным метиленовым синим препаратах (так как большинство других методов окраски может значительно повлиять на морфологию и размеры клеток), при этом учитывают размер клеток – длину и ширину с помощью окуляр-микрометра, предварительно определив цену деления по объект-микрометру, и общую морфологию клетки.

4.2. *Окраску по Граму* проводят по классическому методу, готовят стандартный мазок (тонкий), фиксируют в пламени горелки, на мазок кладут полоску фильтровальной бумаги, наносят первый краситель генциан-виолет – так, чтобы бумага была полностью увлажнена и «блестела», выдерживают 5 мин. Затем снимают бумагу петлей и, не промывая мазок, наносят несколько капель раствора Люголя. Выдерживают до 1 мин, при этом препарат должен потемнеть, но не почернеть. Раствор Люголя сливают.

Препарат опускают в ванночку с этиловым спиртом (96°) на 45 сек. При этом каретку несколько раз приподнимают и опускают. Препарат промывают до “чистой воды”. Наносят второй краситель фуксин на 2 мин. Препарат промывают и подсушивают на воздухе. Грамположительные бактерии – сине-фиолетовая окраска (1-й краситель), грамотрицательные бактерии – красно-розовая окраска (2-й краситель).

4.3. Для выявления *соответствия видовых свойств* бактериальной культуры паспортным сведениям проводится типирование культуры по физиолого-биохимическим свойствам до вида. Идентификацию рекомендуется проводить с использованием тест-систем биохимической идентификации конкретного макротаксона (Сем. *Nocardiaceae*, в частности), разрешенных к применению. При этом следует руководствоваться рекомендациями производителя. Правомочна постановка отдельных биохимических тестов для подтверждения следующих основных свойств: способность к образованию кислоты из глюкозы, фруктозы, глицерина, маннозы и неспособности продуцировать ее из сорбозы, рамнозы, целлобиозы, дульцита и рафинозы; способность усваивать соли пировиноградной, fumarовой, уксусной, пропионовой и масляной, но не щавелевой и винной кислот; рост и образование кислоты на арабинозе, галактозе, лактозе, мальтозе, сахарозе, инозите, салицине и  $\alpha$ -метил-*D*-глюкозиде, а также усвоение натриевых солей  $\alpha$ -кетоглутаровой,  $\gamma$ -аминомасляной, лимонной, молочной, фенилуксусной и янтарной кислот; разложение тирозина и наличие уреазы.

4.4. *Хемотаксономические признаки* культуры определяют при несоответствии результатов ранее проведенных (см. пп. 4.1–4.3) морфолого-культуральных и физиолого-биохимических тестов паспортным сведениям.

*Определение моносахаридного состава гидролизатов целых клеток* проводят методом бумажной хроматографии. Для этого к 200 мг сырой биомассы добавляют 5,0 мл 2 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, запаивают в ампулу и нагревают на водяной бане в течение 4 ч. Содержимое переносят в центрифужную пробирку и нейтрализуют, приливая по каплям (около 10 мл) насыщенный раствор Ba(OH)<sub>2</sub> до уровня pH 7,0. Полученный раствор центрифугируют (3000 об/мин, 10 мин), надосадочную жидкость фильтруют через бумажный фильтр в фарфоровую ступку и упаривают на водяной бане (80°С) до объема 0,1 мл. Образец наносят на хроматографическую бумагу типа FN1 (7x40) (“FILTRAK”, Германия) пастеровской пипеткой в три-четыре приема в одну точку после высушивания на воздухе предыдущей капли. Между опытными образцами наносят растворы “метчиков” (по 1,0 мкл каждого сахара после высушивания предыдущей капли). Бумагу с нанесенными образцами помещают в предварительно насыщенную парами растворителей хроматографическую камеру. Разделение исследуемых веществ методом восходящей хроматографии происходит в течение 6 сут с интервалами 2, 4, 7,

12 и три раза по 24 ч. Визуализацию пятен сахаров на хроматограмме осуществляют путем опрыскивания проявителем и нагревания в течение 15 мин при 105°C в сухожаровом шкафу. Пятна сахаров с четным количеством атомов углерода (гексоз) имеют буро-коричневую, с нечетным (пентоз) – коричнево-розовую окраску на светло-желтом фоне. При идентификации сахаров измеряют и сравнивают расстояния, пройденные “метчиками” сахаров и веществами, которые предполагалось обнаружить в анализируемой смеси.

*Определение изомеров диаминопимелиновой кислоты (ДАПК)* проводят в гидролизатах клеток коллекционных культур методом бумажной хроматографии. Для этого 10–15 капель гидролизата с помощью капилляра наносят на хроматографическую бумагу в одну точку, подсушивая бумагу на воздухе перед каждым последующим нанесением образца. Расстояние между образцами на хроматографической бумаге – 2 см. На бумагу в качестве контроля наносят 5–10 мкл гидролизата клеток типового штамма соответствующего вида актинобактерий, содержащих мезо-ДАПК, и стандартный раствор изомеров ДАПК. Бумагу с нанесенными образцами помещают в предварительно насыщенную парами растворителей хроматографическую камеру. Разделение исследуемых веществ методом восходящей хроматографии на бумаге происходит в течение 18 ч, после чего бумагу вынимают из камеры, высушивают на воздухе и опрыскивают проявляющим реактивом с последующим высушиванием на воздухе и прогреванием при 105°C в течение 15 мин. Пятна диаминокислоты имеют зеленовато-желтый цвет, на хроматограмме располагаются ниже пятен других аминокислот, имеющих пурпурно-фиолетовую окраску. Пятно мезо-ДАПК располагается ближе к линии старта, LL-ДАПК – дальше.

*Определение свободных жирных кислот* коллекционных культур проводят с помощью хроматомасс-спектрометрии, для этого 15–30 мг клеточных липидов, экстрагированных из биомассы смесью хлороформ – метанол (2:1), помещают в колбу с боковым отростком. Растворитель удаляют в токе азота при 30°C. К остатку прибавляют 5,0 мл 0,3N метанольного раствора NaOH. Смесью кипятят, после кипячения охлаждают в течение 2 ч. К реакционной смеси общих липидов добавляют 3 капли раствора фенолфталеина и 90%-ный раствор метанола с таким расчётом, чтобы раствор продуктов реакции заполнил весь объём бокового отростка колбы. В результате добавления фенолфталеина смесь окрашивается в малиновый цвет, что свидетельствует об успешном проведении щелочного гидролиза. Полученный раствор переливают в делительную воронку, и порционно (3–4 раза по 5 мл) приливают петролейный эфир для экстракции

неомыляемых веществ (алкен-1-иловые эфиры глицерина, стерины, углеводороды, каротиноиды, высшие спирты и др.). Верхний слой (неомыляемые вещества) постоянно сливают в предварительно взвешенную колбу с притёртой крышкой. Водно-спиртовую фазу (нижний слой) подкисляют бн HCl (0,3 мл) до обесцвечивания раствора и экстрагируют свободные жирные кислоты, порционно (3–4 раза по 5 мл) приливая петролейный эфир. Верхний слой (свободные жирные кислоты) постоянно сливают в предварительно взвешенную колбу с притёртой крышкой, упаривают досуха в токе азота, сушат в вакуум-эксикаторе над NaOH. Полученный препарат свободных жирных кислот заливают свежеприготовленной смесью хлороформ – метанол (2:1) и хранят при температуре 4°C неограниченное время. Для идентификации свободные жирные кислоты переводят в метиловые эфиры с помощью кислотного гидролиза (2,5%-ный раствор хлористого водорода в метаноле) и анализируют на газовом хроматографе Agilent 6890N с квадрупольным масс-спектрометром “Agilent MSD 5973N” (“Agilent Technologies”, США). Для анализа используют капиллярную колонку RTX-5MS (30 м/0,25 мм/0,25 мкм с 5-ти метровой предколонкой). Кислоты идентифицируют путем сравнения характеристик удерживания неизвестных метиловых эфиров жирных кислот бактерий с таковыми стандартных метиловых эфиров жирных кислот.

*Определение свободных миколовых кислот* (липида LCN-A) проводят методом тонкослойной хроматографии метанолизатов целых клеток коллекционных культур. Для этого 200 мг сухой биомассы помещают в пробирку со шлифом, добавляют 5 мл метанола, 5 мл толуола и 0,2 мл концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, закрывают крышкой и выдерживают в термостате при 50 °C не менее 12 ч. По истечении этого времени пробирки остужают до комнатной температуры, метилмиколяты экстрагируют в 2 мл *n*-гексана. С помощью микрокапилляра 5,0 мкл образца наносят в виде отдельного пятна диаметром 10 мм на тонкослойную хроматографическую пластинку типа Silufol UV 254 (150x150 мм, “Merck”, Германия) в несколько приемов в одну и ту же точку, при этом тщательно высушивая пятно на воздухе или с помощью вентилятора перед каждым последующим нанесением опытного образца. *Следует помнить*: непосредственный контакт следует осуществлять со слоем сорбента так, чтобы из микрокапилляра полностью выходил весь раствор. В качестве контроля используют метилмиколяты эталонных штаммов актинобактерий известной систематической принадлежности и с известным значением R<sub>f</sub> пятен липида LCN-A на хроматограмме. Хроматографическое разделение миколовых кислот проводят в стеклянной камере, насыщенной парами растворителей. После подъема растворителя на

высоту 13,5 см пластинку удаляют из камеры и высушивают на воздухе до полного испарения растворителя. Хроматографическое разделение миколовых кислот повторяют трижды. *Визуализацию пятен миколовых кислот на хроматограмме.* Проводят после опрыскивания фосфорномолибденовой кислотой и нагревания в сушильном шкафу при 105 °С до появления пятен. Пятна свободных миколовых кислот располагаются между стартовой линией и дополнительно выявляемыми на хроматограмме пятнами не идентифицированных жирных кислот. Тип свободных миколовых кислот определяют по значениям коэффициента  $R_f$  разделенных метилмиколатов:

$$R_f = X / X_1,$$

где  $X$  – расстояние (см), пройденное веществом от точки старта (от исходного пятна на линии старта до середины пятна разделенного вещества);  $X_1$  – расстояние (см), пройденное фронтом подвижной фазы за это же время: от линии старта (а не от края пластинки) до места, где находился фронт в момент окончания процесса хроматографирования.

4.5. *Генотипирование коллекционных культур* путем видоспецифичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводят при несоответствии результатов ранее проведенных (см. пп. 4.1–4.3) морфолого-культуральных и физиолого-биохимических тестов паспортным сведениям.

Клеточные лизаты получают путем суспендирования единичной бактериальной колонии в 40 мкл 0,05М NaOH. Полученную суспензию инкубируют при 95°С в течение 15 мин, а затем замораживают – 15 мин. Цикл лизирования повторяют трижды. После этого лизаты центрифугируют при 14 тыс. об/мин в течение 2 мин с использованием микроцентрифуги (MiniSpin®, Eppendorf, Германия). Для приготовления 25 мкл ПЦР-смеси используют 1 мкл полученного супернатанта. Амплификацию проводят с использованием программируемого термоциклера MJ Mini™ (Bio–Rad Laboratories, США) и пар праймеров, сконструированных для экологически значимых видов актинобактерий. Реакционная смесь объемом 25 мкл имеет следующий состав (все реактивы производства “Синтол”, Россия): 10 мМ ПЦР-буфер; 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub> (в случае праймеров 27f и 1492r, а также Ru1 Ru2) и 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub> (для праймеров Re1 и Re2); 0,2 мМ смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ); по 0,2 мкМ прямого и обратного праймера; 0,4 ед. Taq-ДНК полимеразы; 1 мкл ДНК, деионизированная вода. Используют температурно-временные режимы амплификации, специализированные для каждой пары праймеров. Полученные продукты амплификации анализируют при помощи электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле (Sigma, США) с использованием однократного TBE-буфера

следующего состава ( $10 \times$  г/л): трис, 10,8 (99,8 %, Sigma, США); борная кислота для электрофореза, 5,5 (Sigma, США); ЭДТА, 4 мл 0,5М, рН 8,0 (99,4 %, Sigma); дистиллированная вода, 1 л (Short Protocols in Molecular Biology, 1995). Электрофоретическое разделение проводят при напряжении 80 В, силе тока 33 мА и мощности 3 Вт в течение 30–40 мин. По окончании электрофореза гель окрашивают водным раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Окрашенный гель просматривают в ультрафиолетовом свете с использованием трансиллюминатора Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories, США). Результаты ПЦР-диагностики документируют с помощью системы гель-документации Quantity One<sup>®</sup> 1-D Analysis Software (Bio-Rad).

Если культура не соответствует паспортным видовым свойствам или выявлено наличие посторонних микроорганизмов, то она не пригодна для дальнейшего использования.

Проверка качества (аутентичности) коллекционного фонда осуществляется с использованием следующего оборудования и материалов: Тринокулярный микроскоп Axiostar plus MC-400, Цифровая камера Olympus Camedia C-2040Zoom, Система ввода изображения “Видео-Тест-Размер”, Программное обеспечение для анализа изображений “Размер 5”, Видеоадаптер для цифровой камеры Olympus, Компьютер, Микроскоп оптический лабораторный “Аксиостар”, Флуоресцентный блок, Термостат, Инкубатор-теплообменник GFL 3033, Дозаторы на 1 мл, 10 мкл, 200 мкл, Холодильник Стинол-256 Q002 двухкамерный, Автоклав вертикальный, Счетчик колоний, Гельдокументирующая система Bio-Rad GelDoc XR PLUS, Камера для горизонтального электрофореза Wide Mini-Sub Cell System, Лаборатория-комплект/Аmplifier, Бокс для ПЦР UVK/T-AR, Компьютер Ноутбук, Трансиллюминатор TFX-20LC, Система горизонтального электрофореза, Источник питания для электрофореза, Центрифуга MiniSpin для микропробирок, Шкаф вытяжной 1700\*750\*2200, Хроматомасс-спектрометр Hewlett-Packard 6890/5973N MSD, Водяной электрический термостат с цифровым управлением Assistant, Стерилизатор воздушный ГП-80, Центрифуга с ротором Z200A; пробирки лабораторные, чашки Петри, стеклянные ампулы ШПВ-3, спиртовка стеклянная, цилиндр стеклянный 1 л, цилиндр стеклянный 2,0 л, шпатель, поддон для окраски препаратов из нержавеющей стали, пробирка мерная со шлифом, колбы конические, микрокапилляры, стеклянная воронка, делительная воронка, эксикатор, предметные стекла, покровные стекла, хроматографическая камера для 20x20 см пластин с крышкой, петля микробиологическая, пробки

ватно-марлевые для пробирок, пластины для ТСХ Alugram, хроматографическая бумага FN1, пинцет общего назначения, виалы, штатив пластиковый для пробирок, универсальная индикаторная бумага для определения рН, фильтровальная бумага, фарфоровая ступка, пробирки микроцентрифужные, типа “Эппендорф” (1 или 2 мл), планшеты для иммунологических реакций, наконечники с фильтром до 200 мкл (в штативе 96 шт), стрипы 8-луночные, центрифужные пробирки, наконечники на 10 мкл, 200 мкл, 1 мл, набор для проведения ПЦР, краситель GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10000X в ДМСО, 1,5%, ТВЕ-буфер, маркер длин ДНК, Orange DNA loading day, набор для выделения ДНК, набор LIVE/DEAD BacLigh TM, набор реактивов для окраски мазков по Граму, диагностический набор углеводов, диагностический набор органических кислот, коммерческий набор для физиолого-биохимического анализа, питательный бульон для культивирования микроорганизмов (LB), питательный агар для культивирования микроорганизмов, водный р-р агарозы, стандартный набор моносахаридов, дистиллированная вода, (триметилсилил)диазометан р-р, метиловые эфиры жирных кислот (набор свидетелей для ГХ–МС), минеральная основа для среды с углеводами и органическими кислотами, 0,001% р-р DL-A-эпсилон диаминопимелиновой кислоты, ацетон х.ч., петролейный эфир х.ч., диэтиловый эфир х.ч., хлороформ х.ч., соляная кислота, нингидрин 10 г, фенолфталеин, н-бутанол, метанол, н-гексан, толуол, водный р-р NaOH 0,05М, серная кислота, уксусная кислота, анилин, изо-фталева кислота, Ва(ОН)<sub>2</sub>, раствор NaCl 0,9%, этиловый спирт, дезраствор, пиридин х.ч., метанольный р-р NaOH, 0,3 н, фосфорно-молибденовая кислота, метиленового синего раствор водный.

***Rhodococcus erythropolis*** ИЭГМ 10, ИЭГМ 20, ИЭГМ 186, ИЭГМ 200, ИЭГМ 204, ИЭГМ 270, ИЭГМ 487, ИЭГМ 708, ИЭГМ 767

1. Лиофилизированные штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 10 (от 21.04.1997), ИЭГМ 20 (от 23.11.2006), ИЭГМ 186 (от 30.05.2004), ИЭГМ 200 (от 14.02.1991), ИЭГМ 204 (от 15.03.1991), ИЭГМ 270 (от 18.06.1998), ИЭГМ 487 (от 30.05.2004), ИЭГМ 708 (от 17.12.1999), ИЭГМ 767 (от 28.04.2003) восстановили из ампул согласно вышеописанным рекомендациям.

Криоконсервированные штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 10 (от 14.05.2013), ИЭГМ 20 (от 14.05.2013), ИЭГМ 186 (от 14.05.2013), ИЭГМ 200 (от 24.05.2013), ИЭГМ 204 (от 24.05.2013), ИЭГМ 270 (от 18.06.2013), ИЭГМ 487 (от 18.06.13), ИЭГМ 708 (от 02.10.2013), ИЭГМ 767 (от 02.10.2013) восстановили из криопробирок согласно вышеописанным рекомендациям.

1.1. Восстановленные штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 10, ИЭГМ 20, ИЭГМ 186, ИЭГМ 200, ИЭГМ 204, ИЭГМ 270, ИЭГМ 487, ИЭГМ 708,

ИЭГМ 767 со скошенного питательного агара заседали уколом в столбик с полужидким агаром для создания запасов рабочей культуры. Запас рабочей культуры хранится в отдельном холодильнике.

1.2. Восполнение запасов рабочей культуры производилось каждые 3 месяца.

2. Проверка штаммов *R. erythropolis* ИЭГМ 10, ИЭГМ 20, ИЭГМ 186, ИЭГМ 200, ИЭГМ 204, ИЭГМ 270, ИЭГМ 487, ИЭГМ 708, ИЭГМ 767 на чистоту и жизнеспособность проводилась путем приготовления суспензий и последующего рассева петлей на агаризованные питательные среды. На стандартных лабораторных средах культуры образовывали колонии мягкой консистенции без воздушного мицелия с палево-телесным не диффундирующим пигментом, что соответствовало культуральным признакам вида *R. erythropolis*.

3. Результаты проведенной проверки диссоциации (не превышала 25%) штаммов *R. erythropolis* ИЭГМ 10, ИЭГМ 20, ИЭГМ 186, ИЭГМ 200, ИЭГМ 204, ИЭГМ 270, ИЭГМ 487, ИЭГМ 708, ИЭГМ 767 свидетельствовали о возможности дальнейшего использования данных культур в работе.

4. Проведена оценка морфолого-культуральных, хемотаксономических и генетических свойств бактериальной культуры согласно паспортным данным.

4.1. Морфологические признаки клеток штаммов ИЭГМ 10, ИЭГМ 20, ИЭГМ 186, ИЭГМ 200, ИЭГМ 204, ИЭГМ 270, ИЭГМ 487, ИЭГМ 708, ИЭГМ 767 в окрашенных разбавленным метиленовым синим препаратах: клетки палочковидные, шириной 0,6–0,9 мкм, длиной 2–5 до 7–12 мкм; характерное v-образное и палисадное расположение клеток, наличие плеоморфизма, трехстадийный морфогенетический цикл развития (кокки – палочки – кокки) соответствовали видовым характеристикам *R. erythropolis*.

4.2. Исследованные штаммы грамположительны.

4.3. В результате проведенных биохимических тестов установлено, что штаммы ИЭГМ 10, ИЭГМ 20, ИЭГМ 186, ИЭГМ 200, ИЭГМ 204, ИЭГМ 270, ИЭГМ 487, ИЭГМ 708, ИЭГМ 767 ферментировали ксилозу, сахарозу, усваивали ксилитол, инозит и молочную кислоту, не образовывали кислоту из рамнозы, мелибиозы и мелезитозы, расщепляли эскулин, проявляли уреазную активность. Выявленные физиолого-биохимические свойства соответствовали паспортным характеристикам представителей вида *R. erythropolis*.

4.4. Штаммы ИЭГМ 10, ИЭГМ 20, ИЭГМ 186, ИЭГМ 200, ИЭГМ 204, ИЭГМ 270, ИЭГМ 487, ИЭГМ 708, ИЭГМ 767 характеризуются IV хемотипом клеточной стенки: тип дифференцирующих сахаров А, мезо-ДАПК, миколовые кислоты (обнаружен липид LCN–A). Пептидогликан вариации  $A_{1\gamma}$  (аланин – глутаминовая кислота – мезо-ДАПК с молярным соотношением 1,99: 1,32: 1,0 (2:1:1) и Р II типом фосфолипидов. Состав жирных кислот штаммов ИЭГМ 10, ИЭГМ 20, ИЭГМ 186, ИЭГМ 200, ИЭГМ 204, ИЭГМ 270, ИЭГМ 487, ИЭГМ 708, ИЭГМ 767, приведенный в таблице, соответствовал видовым характеристикам *R. erythropolis*

### **Состав жирных кислот**

C <sub>12:0</sub>	0,4–0,6
C <sub>13:0</sub>	0,1–0,2
C <sub>14:0</sub>	5,8–7,4
C <sub>15:0</sub>	1,3–1,9
C <sub>16:0</sub>	30,0–32,2
10Me	0,1–1,2
C <sub>16:0</sub>	
C <sub>16:1</sub>	6,8–10,8
C <sub>17:0</sub>	1,0–1,5
су C <sub>17:0</sub>	2,5–3,9
10Me	–
C <sub>17:0</sub>	
C <sub>17:1</sub>	0,9–3,1
C <sub>18:0</sub>	6,4–13,1
10Me	10,9–17,1
C <sub>18:0</sub>	
C <sub>18:1</sub>	15,2–21,2
C <sub>19:1</sub>	0,6–3,0

4.5. Генетический анализ бактериальных штаммов ИЭГМ 10, ИЭГМ 20, ИЭГМ 186, ИЭГМ 200, ИЭГМ 204, ИЭГМ 270, ИЭГМ 487, ИЭГМ 708, ИЭГМ 767, проведенный на основании реакции ПЦР с использованием видоспецифических праймеров для *R. erythropolis*:

(Re1) 5' CGTСТААТАСССГГАТАТГАССТСССТАТС 3'

(Re2) 5' GCAAGСТАGСAGTTGAGСТGСТGGТ 3',

подтвердил таксономическую принадлежность штаммов к *R. erythropolis* АТСС 4277 (ИЭГМ 7<sup>T</sup>).

### ***Rhodococcus fascians* ИЭГМ 34, ИЭГМ 35, ИЭГМ 40**

1. Лиофилизированные штаммы *R. fascians* ИЭГМ 34 (от 28.04.1991), ИЭГМ 35 (от 30.05.2004), ИЭГМ 40 (от 28.04.1991) восстановили из ампул согласно вышеописанным рекомендациям.

Криоконсервированные штаммы *R. fascians* ИЭГМ 34 (от 17.04.2013), ИЭГМ 35 (от 28.01.2013), ИЭГМ 40 (от 28.01.2013) восстановили из криопробирок согласно вышеописанным рекомендациям.

1.1. Восстановленные штаммы *R. fascians* ИЭГМ 34, ИЭГМ 35, ИЭГМ 40 со скошенного питательного агара заседали уколком в столбик с полужидким агаром для создания запасов рабочей культуры. Запас рабочей культуры хранится в отдельном холодильнике.

1.2. Восполнение запасов рабочей культуры производилось каждые 3 месяца.

2. Проверка штаммов *R. fascians* ИЭГМ 34, ИЭГМ 35, ИЭГМ 40 на чистоту и жизнеспособность проводилась путем приготовления суспензий и последующего рассева петлей на агаризованные питательные среды. На стандартных лабораторных средах культуры образовывали колонии мягкой

консистенции без воздушного мицелия с интенсивно желтым не диффундирующим пигментом, что соответствовало культуральным признакам вида *R. fascians*.

3. Результаты проведенной проверки диссоциации (не превышала 25%) штаммов *R. fascians* ИЭГМ 34, ИЭГМ 35, ИЭГМ 40 свидетельствовали о возможности дальнейшего использования данных культур в работе.

4. Проведена оценка морфолого-культуральных, хемотаксономических и генетических свойств бактериальных штаммов согласно паспортным данным.

4.1. Морфологические признаки клеток штаммов ИЭГМ 34, ИЭГМ 35, ИЭГМ 40 в окрашенных разбавленным метиленовым синим препаратах: клетки палочковидные, шириной 0,6–0,9 мкм, длиной 2–5 до 7–12 мкм; характерное v-образное и палисадное расположение клеток, наличие плеоморфизма, трехстадийный морфогенетический цикл развития (кокки – палочки – кокки) соответствовали видовым характеристикам *R. fascians*.

4.2. Исследованные штаммы грамположительны.

4.3. В результате проведенных биохимических тестов установлено, что штаммы ИЭГМ 34, ИЭГМ 35, ИЭГМ 40 ферментировали трегалозу, усваивали сорбитол, не образовывали кислоты из лактозы, рамнозы, галактозы, целлобиозы, не использовали арабутин, муо-инозитол и натриевые соли  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, не расщепляли эскулин. Выявленные физиолого-биохимические свойства бактериальных культур соответствовали паспортным характеристикам вида *R. fascians*.

4.4. Штаммы ИЭГМ 34, ИЭГМ 35, ИЭГМ 40 характеризуются IV хемотипом клеточной стенки: тип дифференцирующих сахаров А, мезо-ДАПК, миколовые кислоты (обнаружен липид LCN–А). Пептидогликан вариации A $\gamma$  (аланин – глутаминовая кислота – мезо-ДАПК с молярным соотношением 1,99: 1,32: 1,0 (2:1:1) и Р II типом фосфолипидов. Состав жирных кислот штаммов ИЭГМ 34, ИЭГМ 35, ИЭГМ 40, представленный в таблице, соответствовал видовым характеристикам *R. fascians*.

#### ***Состав жирных кислот***

C <sub>12:0</sub>	0,5–1,4
C <sub>13:0</sub>	0,2–0,3
C <sub>14:0</sub>	4,1–5,6
C <sub>15:0</sub>	2,3–4,2
C <sub>16:0</sub>	34,4–35,6
10Me	0,1–0,4
C <sub>16:0</sub>	
C <sub>16:1</sub>	10,8–11,1
C <sub>17:0</sub>	0,8–1,3
су C <sub>17:0</sub>	–
10Me	0,1–1,0
C <sub>17:0</sub>	
C <sub>17:1</sub>	1,7–1,9

C <sub>18:0</sub>	5,0–5,9
10Me	6,7–8,1
C <sub>18:0</sub>	
C <sub>18:1</sub>	25,3–28,0
C <sub>19:1</sub>	1,0м1,3

### ***Rhodococcus opacus* ИЭГМ 56, ИЭГМ 249**

1. Лиофилизированные штаммы *R. opacus* ИЭГМ 56 (от 26.02.1999), ИЭГМ 249 (от 25.11.2014) восстановили из ампул согласно вышеописанным рекомендациям.

Криоконсервированные штаммы *R. opacus* ИЭГМ 56 (от 29.06.2012), ИЭГМ 249 (от 29.06.2012) восстановили из криопробирок согласно вышеописанным рекомендациям.

1.1. Восстановленные штаммы *R. opacus* ИЭГМ 56, ИЭГМ 249 со скошенного питательного агара заседали уколом в столбик с полужидким агаром для создания запасов рабочей культуры. Запас рабочей культуры хранится в отдельном холодильнике.

1.2. Восполнение запасов рабочей культуры производилось каждые 3 месяца.

2. Проверка штаммов *R. opacus* ИЭГМ 56, ИЭГМ 249 на чистоту и жизнеспособность проводилась путем приготовления суспензий и последующего посева петлей на агаризованные питательные среды. На стандартных лабораторных средах культуры образовывали колонии мягкой консистенции без воздушного мицелия с палево-телесным не диффундирующим пигментом, что соответствовало культуральным признакам вида *R. opacus*.

3. Результаты проведенной проверки диссоциации (не превышала 25%) штаммов *R. opacus* ИЭГМ 56, ИЭГМ 249 свидетельствовали о возможности дальнейшего использования данных культур в работе.

4. Проведена оценка морфолого-культуральных, хемотаксономических и генетических свойств бактериального штамма согласно паспортным данным.

4.1. Морфологические признаки штаммов ИЭГМ 56, ИЭГМ 249 в окрашенных разбавленным метиленовым синим препаратах: клетки палочковидные, шириной 0,6–0,9 мкм, длиной 2–5 до 7–12 мкм; характерное v-образное и палисадное расположение клеток, наличие плеоморфизма, трехстадийный морфогенетический цикл развития (кокки – палочки – кокки) соответствовали видовым характеристикам *R. opacus*.

4.2. Исследованные штаммы грамположительны.

4.3. В результате проведенных биохимических тестов установлено, что штаммы ИЭГМ 56, ИЭГМ 249 ферментировали мелибиозу, сахарозу, мелезитозу, усваивали инозит и молочную кислоту, не образовывали кислоту из рамнозы, ксилозы, не использовали ксилитол, не расщепляли эскулин, не проявляли уреазной активности. Выявленные физиолого-биохимические

свойства бактериальных культур соответствовали паспортным характеристикам вида *R. oracus*.

4.4. Штаммы ИЭГМ 56, ИЭГМ 249 характеризуются IV хемотипом клеточной стенки: тип дифференцирующих сахаров А, мезо-ДАПК, миколовые кислоты (обнаружен липид LCN-A). Пептидогликан вариации А<sub>1</sub>γ (аланин – глутаминовая кислота – мезо-ДАПК с молярным соотношением 1,99: 1,32: 1,0 (2:1:1) и Р II типом фосфолипидов. Состав жирных кислот штаммов ИЭГМ 34, ИЭГМ 35, ИЭГМ 40, представленный в таблице, соответствовал видовым характеристикам *R. oracus*.

#### **Состав жирных кислот**

C <sub>12:0</sub>	0,2
C <sub>13:0</sub>	0,1
C <sub>14:0</sub>	2,2–2,8
C <sub>15:0</sub>	3,1–4,6
C <sub>16:0</sub>	28,2–29,6
10Me C <sub>16:0</sub>	0,1–1,7
C <sub>16:1</sub>	9,4–9,7
C <sub>17:0</sub>	3,6–5,2
су C <sub>17:0</sub>	–
10Me C <sub>17:0</sub>	0,1–3,3
C <sub>17:1</sub>	5,2–5,7
C <sub>18:0</sub>	4,1–8,7
10Me C <sub>18:0</sub>	9,9–13,0
C <sub>18:1</sub>	18,9–27,7
C <sub>19:1</sub>	0,1–1,0

4.5. Генетический анализ бактериальных культур ИЭГМ 56, ИЭГМ 249, проведенный на основании реакции ПЦР с использованием видоспецифических праймеров для *R. oracus*:

(Ro1) 5' TATGACCTTCGGCTGCATGGCTGAG 3'

(Ro2) 5' CCGTATCGCCTGGAAGCTCGAG 3',

подтвердил таксономическую принадлежность исследованных штаммов к *R. oracus* ATCC 51881 (ИЭГМ 716<sup>Т</sup>).

#### ***Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 63, ИЭГМ 66, ИЭГМ 608, ИЭГМ 647**

1. Лиофилизированные штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 63 (от 30.05.2004), ИЭГМ 66 (от 18.06.1998), ИЭГМ 608 (от 18.06.1998), ИЭГМ 647 (от 18.06.1998) восстановили из ампул согласно вышеописанным рекомендациям.

Криоконсервированные штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 63 (от 23.11.2006), ИЭГМ 66 (от 13.01.2014), ИЭГМ 608 (от 13.01.14), ИЭГМ 647 (от 13.01.2014) восстановили из криопробирок согласно вышеописанным рекомендациям.

1.1. Восстановленные штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 63, ИЭГМ 66, ИЭГМ 608, ИЭГМ 647 со скошенного питательного агара засекали уколом в

столбик с полужидким агаром для создания запасов рабочей культуры. Запас рабочей культуры хранится в отдельном холодильнике.

1.2. Восполнение запасов рабочей культуры производилось каждые 3 месяца.

2. Проверка штаммов *R. rhodochrous* ИЭГМ 63, ИЭГМ 66, ИЭГМ 608, ИЭГМ 647 на чистоту и жизнеспособность проводилась путем приготовления суспензий и последующего посева петлей на агаризованные питательные среды. На стандартных лабораторных средах исследованные культуры образовывали колонии мягкой консистенции без воздушного мицелия с розовато-красным не диффундирующим пигментом, что соответствовало культуральным признакам вида *R. rhodochrous*.

3. Результаты проведенной проверки диссоциации (не превышала 25%) штаммов *R. rhodochrous* ИЭГМ 63, ИЭГМ 66, ИЭГМ 608, ИЭГМ 647 свидетельствовали о возможности дальнейшего использования данных культур в работе.

4. Проведена оценка морфолого-культуральных, хемотаксономических и генетических свойств бактериальной культуры согласно паспортным данным.

4.1. Морфологические признаки клеток штаммов ИЭГМ 63, ИЭГМ 66, ИЭГМ 608, ИЭГМ 647 в окрашенных разбавленным метиленовым синим препаратах: клетки палочковидные, шириной 0,6–0,9 мкм, длиной 2–5 до 7–12 мкм; характерное v-образное и палисадное расположение клеток, наличие плеоморфизма, трехстадийный морфогенетический цикл развития (кокки – ветвящиеся клетки – кокки) соответствовали видовым характеристикам *R. rhodochrous*.

4.2. Исследованные штаммы грамположительны.

4.3. В результате проведенных биохимических тестов установлено, что штаммы ИЭГМ 63, ИЭГМ 66, ИЭГМ 608, ИЭГМ 647 ферментировали маннозу, глюкозу, расщепляли эскулин, проявляли каталазную активность, не образовывали кислоту из сахарозы, усваивали натриевые соли  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, но не  $\gamma$ -аминомасляной. Выявленные физиолого-биохимические свойства бактериальных культур соответствовали паспортным характеристикам вида *R. rhodochrous*.

4.4. Штаммы ИЭГМ 63, ИЭГМ 66, ИЭГМ 608, ИЭГМ 647 характеризуются IV хемотипом клеточной стенки: тип дифференцирующих сахаров А, мезо-ДАПК, миколовые кислоты (обнаружен липид LCN-A). Пептидогликан вариации Al $\gamma$  (аланин – глутаминовая кислота – мезо-ДАПК с молярным соотношением 1,99: 1,32: 1,0 (2:1:1) и Р II типом фосфолипидов. Состав жирных кислот штаммов ИЭГМ 63, ИЭГМ 66, ИЭГМ 608, ИЭГМ 647, представленный ниже, соответствовал видовым характеристикам *R. rhodochrous*.

#### **Состав жирных кислот**

C <sub>12:0</sub>	1,6–1,8
C <sub>13:0</sub>	0,1–0,6

C <sub>14:0</sub>	3,8–4,5
C <sub>15:0</sub>	2,6–3,5
C <sub>16:0</sub>	31,2–33,1
10Me C <sub>16:0</sub>	4,5–6,8
C <sub>16:1</sub>	11,8–14,7
C <sub>17:0</sub>	1,1–2,9
су C <sub>17:0</sub>	–
10Me C <sub>17:0</sub>	–
C <sub>17:1</sub>	3,6–4,4
C <sub>18:0</sub>	7,9–8,3
10Me C <sub>18:0</sub>	6,9–7,9
C <sub>18:1</sub>	13,6–18,2
C <sub>19:1</sub>	–

4.5. Генетический анализ бактериальных культур ИЭГМ 63, ИЭГМ 66, ИЭГМ 608, ИЭГМ 647, проведенный на основании реакции ПЦР с использованием видоспецифических праймеров для *R. rhodochrous*:

(Rr1) 5' GAGGGGTGGAAAGTTTTTCGGTGCAGGATGA 3'

(Rr2) 5' AGCCATGCACCACCTGTCTACCGG 3',

подтвердил таксономическую принадлежность исследованных штаммов к *R. rhodochrous* ATCC 13808 (ИЭГМ 62<sup>T</sup>).

***Rhodococcus ruber*** ИЭГМ 219, ИЭГМ 230, ИЭГМ 231, ИЭГМ 235, ИЭГМ 326, ИЭГМ 327, ИЭГМ 338, ИЭГМ 346

1. Лиофилизированные штаммы *R. ruber* ИЭГМ 219 (от 07.12.2011), ИЭГМ 230 (от 30.05.2005), ИЭГМ 231 (от 13.09.2007), ИЭГМ 235 (от 23.05.2005), ИЭГМ 326 (от 24.05.2007), ИЭГМ 327 (от 24.06.2014), ИЭГМ 338 (от 23.05.2005), ИЭГМ 346 (от 20.05.1998) восстановили из ампул согласно вышеописанным рекомендациям.

Криоконсервированные штаммы *R. ruber* ИЭГМ 219 (от 02.02.2004), ИЭГМ 230 (от 23.06.2014), ИЭГМ 231 (от 02.02.2014), ИЭГМ 235 (от 15.01.2009), ИЭГМ 326 (от 15.01.09), ИЭГМ 327 (от 23.06.2014), ИЭГМ 338 (от 19.06.2014), ИЭГМ 346 (от 15.01.09) восстановили из криопробирок согласно вышеописанным рекомендациям.

1.1. Восстановленные штаммы *R. ruber* ИЭГМ 219, ИЭГМ 230, ИЭГМ 231, ИЭГМ 235, ИЭГМ 326, ИЭГМ 327, ИЭГМ 338, ИЭГМ 346 со скошенного питательного агара засекали уколком в столбик с полужидким агаром для создания запасов рабочей культуры. Запас рабочей культуры хранится в отдельном холодильнике.

1.2. Восполнение запасов рабочей культуры производилось каждые 3 месяца.

2. Проверка штаммов *R. ruber* ИЭГМ 219, ИЭГМ 230, ИЭГМ 231, ИЭГМ 235, ИЭГМ 326, ИЭГМ 327, ИЭГМ 338, ИЭГМ 346 на чистоту и жизнеспособность проводилась путем приготовления суспензий и последующего рассева петлей на агаризованные питательные среды. На стандартных лабораторных средах Исследованные культуры образовывали

колонии мягкой консистенции без воздушного мицелия с оранжево-красным не диффундирующим пигментом, что соответствовало культуральным признакам вида *R. ruber*.

3. Результаты проведенной проверки диссоциации (не превышала 25%) штаммов *R. ruber* ИЭГМ 219, ИЭГМ 230, ИЭГМ 231, ИЭГМ 235, ИЭГМ 326, ИЭГМ 327, ИЭГМ 338, ИЭГМ 346 свидетельствовали о возможности дальнейшего использования данных культур в работе.

4. Проведена оценка морфолого-культуральных, хемотаксономических и генетических свойств бактериальной культуры согласно паспортным данным.

4.1. Морфологические признаки клеток штаммов ИЭГМ 219, ИЭГМ 230, ИЭГМ 231, ИЭГМ 235, ИЭГМ 326, ИЭГМ 327, ИЭГМ 338, ИЭГМ 346 в окрашенных разбавленным метиленовым синим препаратах: клетки палочковидные, шириной 0,6–0,9 мкм, длиной 2–5 до 7–12 мкм; характерное v-образное и палисадное расположение клеток, наличие плеоморфизма, трехстадийный морфогенетический цикл развития (кокки – ветвящиеся клетки – кокки) соответствовали видовым характеристикам *R. ruber*.

4.2. Исследованные штаммы грамположительны.

4.3. В результате проведенных биохимических тестов установлено, что штаммы ИЭГМ 219, ИЭГМ 230, ИЭГМ 231, ИЭГМ 235, ИЭГМ 326, ИЭГМ 327, ИЭГМ 338, ИЭГМ 346 ферментировали глюкозу, сахарозу, не образовывали кислоту из маннозы, усваивали натриевые соли  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, но не  $\alpha$ -кетоглutarовой, не расщепляли эскулин, не проявляли каталазной активности. Выявленные физиолого-биохимические свойства бактериальных культур соответствовали паспортным характеристикам вида *R. ruber*.

4.4. Штаммы ИЭГМ 219, ИЭГМ 230, ИЭГМ 231, ИЭГМ 235, ИЭГМ 326, ИЭГМ 327, ИЭГМ 338, ИЭГМ 346 характеризуются IV хемотипом клеточной стенки: тип дифференцирующих сахаров А, мезо-ДАПК, миколовые кислоты (обнаружен липид LCN-A). Пептидогликан вариации А<sub>1</sub> $\gamma$  (аланин – глутаминовая кислота – мезо-ДАПК с молярным соотношением 1,99: 1,32: 1,0 (2:1:1) и Р II типом фосфолипидов. Состав жирных кислот штаммов ИЭГМ 219, ИЭГМ 230, ИЭГМ 231, ИЭГМ 235, ИЭГМ 326, ИЭГМ 327, ИЭГМ 338, ИЭГМ 346, представленный ниже, соответствовал видовым характеристикам *R. ruber*.

#### ***Состав жирных кислот***

C <sub>12:0</sub>	0,1–0,4
C <sub>13:0</sub>	0,1–0,2
C <sub>14:0</sub>	0,8–1,5
C <sub>15:0</sub>	0,3–1,0
C <sub>16:0</sub>	27,0–30,0
10Me C <sub>16:0</sub>	–
C <sub>16:1</sub>	3,8–6,7
C <sub>17:0</sub>	1,0–1,5

су C <sub>17:0</sub>	–
10Me C <sub>17:0</sub>	–
C <sub>17:1</sub>	0,3–0,5
C <sub>18:0</sub>	16,4–20,1
10Me C <sub>18:0</sub>	0,9–3,1
C <sub>18:1</sub>	37,5–40,2
C <sub>19:1</sub>	–

4.5. Генетический анализ бактериальных культур ИЭГМ 219, ИЭГМ 230, ИЭГМ 231, ИЭГМ 235, ИЭГМ 326, ИЭГМ 327, ИЭГМ 338, ИЭГМ 346, проведенный на основании реакции ПЦР с использованием видоспецифических праймеров для *R. ruber*:

(Rr1) 5' GTCTAATACCGGATAGGACCTCGGGA 3'

(Rr2) 5' TACCGTCACTTGCGCTTCGTCGGTAC 3',

подтвердил таксономическую принадлежность исследованных штаммов к *R. ruber* ATCC 27863 (ИЭГМ 70<sup>T</sup>).

#### ***Gordonia alkanivorans* ИЭГМ 748**

1. Лиофилизированный штамм *G. alkanivorans* ИЭГМ 748 (от 01.10.2007) восстановили из ампул согласно вышеописанным рекомендациям.

Криоконсервированный штамм *G. alkanivorans* ИЭГМ 748 (от 22.02.2012) восстановили из криопробирок согласно вышеописанным рекомендациям.

1.1. Восстановленный штамм *G. alkanivorans* ИЭГМ 748 со скошенного питательного агара заседали уколом в столбик с полужидким агаром для создания запасов рабочей культуры. Запас рабочей культуры хранится в отдельном холодильнике.

1.2. Восполнение запасов рабочей культуры производилось каждые 3 месяца.

2. Проверка штамма *G. alkanivorans* ИЭГМ 748 на чистоту и жизнеспособность проводилась путем приготовления суспензий и последующего рассева петлей на агаризованные питательные среды. На стандартных лабораторных средах культура образовывала колонии мягкой консистенции без воздушного мицелия с оранжево-красным не диффундирующим пигментом, что соответствовало культуральным признакам вида *G. alkanivorans*.

3. Результаты проведенной проверки диссоциации (не превышала 25 %) штамма *G. alkanivorans* ИЭГМ 748 свидетельствовали о возможности дальнейшего использования данной культуры в работе.

4. Проведена оценка морфолого-культуральных, хемотаксономических и генетических свойств бактериальной культуры согласно паспортным данным.

4.1. Морфологические признаки бактериальных клеток в окрашенных разбавленным метиленовым синим препаратах: клетки палочковидные,

длиной 0,3–0,5 до 1,0–2,3 мкм; характерное v-образное и палисадное расположение клеток, наличие плеоморфизма, трехстадийный морфогенетический цикл развития (кокки – палочки – кокки) соответствовали видовым характеристикам *G. alkanivorans*.

4.2. Штамм грамположительный.

4.3. В результате проведенных биохимических тестов установлено, что штамм ИЭГМ 748 ферментирует глюкозу, фруктозу, сахарозу, ксилозу, маннозу, усваивает маннит, не образует кислоту из лактозы, арабинозы, рамнозы, трегалозы, не расщепляет эскулин, не проявляет каталазную активность. Выявленные физиолого-биохимические свойства бактериальной культуры соответствовали паспортным характеристикам вида *G. alkanivorans*.

4.4. Штамм ИЭГМ 748 характеризуется IV хемотипом клеточной стенки: тип дифференцирующих сахаров А, мезо-ДАПК, миколовые кислоты (обнаружен липид LCN–А). Пептидогликан вариации A1 $\gamma$  (аланин – глутаминовая кислота – мезо-ДАПК с молярным соотношением 1,99: 1,32: 1,0 (2:1:1) и Р II типом фосфолипидов.

### ***Gordonia rubripertincta* ИЭГМ 96, ИЭГМ 731**

1. Лиофилизированные штаммы *G. rubripertincta* ИЭГМ 96 (от 17.12.1999), ИЭГМ 731 (от 18.05.2000) восстановили из ампул согласно вышеописанным рекомендациям.

Криоконсервированные штаммы *G. rubripertincta* ИЭГМ 96 (от 01.02.2013), ИЭГМ 731 (от 24.05.2013) восстановили из криопробирок согласно вышеописанным рекомендациям.

1.1. Восстановленные штаммы *G. rubripertincta* ИЭГМ 96, ИЭГМ 731 со скошенного питательного агара заседали уколом в столбик с полужидким агаром для создания запасов рабочей культуры. Запас рабочей культуры хранится в отдельном холодильнике.

1.2. Восполнение запасов рабочей культуры производилось каждые 3 месяца.

2. Проверка штаммов *G. rubripertincta* ИЭГМ 96, ИЭГМ 731 на чистоту и жизнеспособность проводилась путем приготовления суспензий и последующего посева петлей на агаризованные питательные среды. На стандартных лабораторных средах культура образовывала колонии мягкой консистенции без воздушного мицелия с оранжево-красным не диффундирующим пигментом, что соответствовало культуральным признакам вида *G. rubripertincta*.

3. Результаты проведенной проверки диссоциации (не превышала 25%) штаммов *G. rubripertincta* ИЭГМ 96, ИЭГМ 731 свидетельствовали о возможности дальнейшего использования их в работе.

4. Проведена оценка морфолого-культуральных, хемотаксономических и генетических свойств бактериальной культуры согласно паспортным данным.

4.1. Морфологические признаки штаммов ИЭГМ 96, ИЭГМ 731 в окрашенных разбавленным метиленовым синим препаратах: клетки палочковидные, длиной 0,3–0,5 до 1,0–2,3 мкм; характерное v-образное и палисадное расположение клеток, наличие плеоморфизма, трехстадийный морфогенетический цикл развития (кокки – палочки – кокки) соответствовали видовым характеристикам *G. rubripertincta*.

4.2. Штаммы грамположительны.

4.3. В результате проведенных биохимических тестов установлено, что штаммы ИЭГМ 96, ИЭГМ 731 ферментировали глюкозу, фруктозу, рамнозу, сахарозу, трегалозу, усваивали маннит, не образуют кислоту из лактозы, арабинозы, ксилозы, не расщепляли эскулин, не проявляли каталазной активности. Выявленные физиолого-биохимические свойства бактериальной культуры соответствовали паспортным характеристикам вида *G. rubripertincta*.

4.4. Штаммы ИЭГМ 96, ИЭГМ 731 характеризуется IV хемотипом клеточной стенки: тип дифференцирующих сахаров А, мезо-ДАПК, миколовые кислоты (обнаружен липид LCN–А). Пептидогликан вариации А<sub>1</sub>γ (аланин – глутаминовая кислота – мезо-ДАПК с молярным соотношением 1,99: 1,32: 1,0 (2:1:1) и Р II типом фосфолипидов.

#### ***Gordonia terrae* ИЭГМ 136**

1. Лиофилизированный штамм *G. terrae* ИЭГМ 136 (от 10.07.1989) восстановили из ампул согласно вышеописанным рекомендациям.

Криоконсервированный штамм *G. terrae* ИЭГМ 136 (от 19.04.2013) восстановили из криопробирок согласно вышеописанным рекомендациям.

1.1. Восстановленный штамм *G. terrae* ИЭГМ 136 со скошенного питательного агара засеивали уколом в столбик с полужидким агаром для создания запасов рабочей культуры. Запас рабочей культуры хранится в отдельном холодильнике.

1.2. Восполнение запасов рабочей культуры производилось каждые 3 месяца.

2. Проверка штамма *G. terrae* ИЭГМ 136 на чистоту и жизнеспособность проводилась путем приготовления суспензий и последующего засева петлей на агаризованные питательные среды. На стандартных лабораторных средах исследуемая культура образовывала колонии мягкой консистенции без воздушного мицелия с оранжево-красным не диффундирующим пигментом, что соответствовало культуральным признакам вида *G. terrae*.

3. Результаты проведенной проверки диссоциации (не превышала 25 %) штамма *G. terrae* ИЭГМ 136 свидетельствовали о возможности дальнейшего использования данных культур в работе.

4. Проведена оценка морфолого-культуральных, хемотаксономических и генетических свойств бактериальной культуры согласно паспортным данным.

4.1. Морфологические признаки бактериальных клеток штамма ИЭГМ 136 в окрашенных разбавленным метиленовым синим препаратах: клетки палочковидные длиной 0,3–0,5 до 1,0–2,3 мкм; характерное v-образное и палисадное расположение клеток, наличие плеоморфизма, трехстадийный морфогенетический цикл развития (кокки – палочки – кокки) соответствовали видовым характеристикам *G. terrae*.

4.2. Штамм грамположительный.

4.3. В результате проведенных биохимических тестов установлено, что штамм ИЭГМ 136 ферментировал глюкозу, фруктозу, рамнозу, сахарозу, трегалозу, усваивал маннит, не образовывал кислоты из лактозы, арабинозы, ксилозы, гидролизовал эскулин, проявлял каталазную активность. Выявленные физиолого-биохимические свойства бактериальной культуры соответствовали паспортным характеристикам вида *G. terrae*.

4.4. Штамм ИЭГМ 136 характеризуется IV хемотипом клеточной стенки: тип дифференцирующих сахаров А, мезо-ДАПК, миколовые кислоты (обнаружен липид LCN-A). Пептидогликан вариации Al $\gamma$  (аланин – глутаминовая кислота – мезо-ДАПК с молярным соотношением 1,99: 1,32:1,0 (2:1:1) и Р II типом фосфолипидов.