

**Стандартная операционная процедура по лиофилизации
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

Лиофилизация коллекционных бактериальных культур осуществляется следующим образом.

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

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

Этап 3. Бактериальные клетки, находящиеся в начале стационарной фазы роста, суспендируют с помощью микровстряхивателя в 5 мл дистиллированной воды до начальной концентрации порядка 10^8 – 10^9 клеток/мл.

Этап 4. Стеклообразные ампулы для лекарственных средств объемом 3,0 мл марки ШПВ-3, не менее 12 для каждой коллекционной культуры, закрывают ватными тампонами, стерилизуют сухим жаром при 160°C в течение 2 ч и маркируют с указанием номера штамма и даты (месяц, год) лиофилизации.

Этап 5. В качестве криопротектора используют стерильную сахарозо-желатиновую среду (среда М.М. Файбича, сахароза – 100 г, желатин – 15 г, агар-агар – 0,1 г, вода дистиллированная – 1000,0 мл).

Этап 6. В стерильные стеклообразные ампулы (не менее 12 для каждой культуры) разливают по 0,1 мл бактериальной суспензии, добавляют по 0,1 мл сахарозо-желатиновой среды и вновь закрывают ватными тампонами. Процедуру проводят в стерильных условиях.

Этап 7. Один образец бактериальной суспензии (0,1 мл) используют для определения жизнеспособности культуры перед лиофилизацией. При этом бактериальную взвесь помещают на поверхность агаризованной среды, обеспечивающей оптимальный рост культуры.

Этап 8. После 15-ти минутной эквilibрации содержимое ампулы замораживают путем погружения ее в жидкий азот (-196°C).

Этап 9. Замороженные ампулы поочередно присоединяют к резиновым патрубкам на колонну лиофилизатора Alpha 1-2 LD "CHRIST", Германия при глубине вакуума не более 0,12 mBar и высушивают в течение 24–30 ч.

Этап 10. По окончании сушки ампулы запаивают под вакуумом в области перетяжки с помощью газовой горелки.

Лиофилизация коллекционных бактериальных культур осуществляется с использованием следующего оборудования, материалов и реагентов: лиофилизатор; елочка для сушки ампул; вакуумный сенсор; термостат; дозатор на 1 мл; дозатор на 200 мкл; дозатор на 10 мкл; встряхиватель; автоклав вертикальный; газовая горелка; весы лабораторные; стерилизатор воздушный; фотометр планшетный; компьютер; счетчик колоний; компрессор; деионизированная вода; сахарозо-желатиновая среда; пробирки лабораторные; пробки ватно-марлевые для пробирок; стеклянные ампулы ШПВ-3; спиртовка стеклянная; колбы коническая на 500 мл; штатив пластиковый для пробирок; цилиндр стеклянный; чашки Петри; наконечники на 10 мкл; наконечники на 200 мкл; наконечники на 1 мл; планшеты для иммунологических реакций; синтетическая среда специального состава; питательный агар для культивирования микроорганизмов; раствор NaCl 0,9%; пропан; этиловый спирт; 0,2% водный раствор йодонитротетразолия хлорида; жидкий азот.

Штамм *G. alkanivorans* ИЭГМ 748 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 13.02.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей Стандартной операционной процедуре.

Штамм *G. rubripertincta* ИЭГМ 96 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 13.02.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *G. rubripertincta* ИЭГМ 731 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 15.02.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *G. terrae* ИЭГМ 136 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 15.02.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой

среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 10 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 20.03.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 20 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 20.03.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 186 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 22.03.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 200 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 22.03.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 204 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 06.04.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка культуры на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 270 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 06.04.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 487 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 06.04.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой

среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 708 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 11.04.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 767 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 11.04.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. fascians* ИЭГМ 34 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 14.04.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. fascians* ИЭГМ 35 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 14.04.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. fascians* ИЭГМ 40 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 14.04.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. opacus* ИЭГМ 56 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 15.05.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. opacus* ИЭГМ 249 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 15.05.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой

среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 63 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 31.05.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 31.05.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 608 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 05.06.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 31.05.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 219 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 08.06.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 230 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 8.06.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 231 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 31.05.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой

среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 235 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 08.06.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 326 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 21.08.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 327 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 21.08.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 338 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 04.12.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.

Штамм *R. ruber* ИЭГМ 346 помещен на хранение в лиофилизированном состоянии 04.12.2017 г. Бактериальные клетки, высушенные путем глубокого замораживания и высушивания (лиофилизации) в присутствии криопротектора (сахарозо-желатиновой среды), хранятся в стеклянных запаянных ампулах. Проверка на аутентичность осуществляется согласно соответствующей процедуре.