

Комплексный метод таксономической идентификации микроорганизмов

Ю.Е. Уварова^{1,2}✉, А.В. Брянская^{1,2}, А.С. Розанов^{1,2}, В.Н. Шляхтун^{1,2}, Е.А. Демидов^{1,2}, К.В. Старостин^{1,2}, Т.Н. Горячкова^{1,2}, С.В. Шеховцов^{1,2}, Н.М. Слынько^{1,2}, С.Е. Пельтек^{1,2}

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Курчатовский геномный центр Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: uvarovaye@bionet.nsc.ru

Аннотация. Для точной видовой идентификации микроорганизмов сегодня все чаще применяют сочетание стандартных микробиологических методов культивирования и визуального наблюдения с методами молекулярной биологии и генетики, помогающими различать виды и штаммы микроорганизмов на уровне молекул ДНК или РНК. Целью данной работы было проведение идентификации микроорганизмов из Коллекции ИЦиГ СО РАН с помощью комплексного подхода, сочетающего использование широкого спектра фенотипических и генотипических признаков. Для 93 штаммов микроорганизмов Коллекции ИЦиГ СО РАН описаны ключевые молекулярно-генетические и фенотипические свойства. Рассмотрены морфологические, физиологические, молекулярно-генетические и масс-спектрометрические характеристики штаммов. Установлены особенности роста штаммов на разных средах, изучена морфология клеток. Штаммы протестированы на способность использовать различные субстраты. Обнаружено, что исследованные штаммы значительно различались по своим биохимическим признакам. Определены физиологические особенности штаммов коллекции: отношение к кислороду, тип питания, диапазон температур и pH, отношение к NaCl и др. Исследованные микроорганизмы объединены в отдельные группы на основании сходства их фенотипических характеристик, что может при дальнейшей доработке и расширении спектра таксонов и их метаболических карт послужить основой для создания «искусственной» классификации, которая может быть использована в качестве ключа для упрощенной и более быстрой идентификации и распознавания микроорганизмов в рамках как Коллекции ИЦиГ СО РАН, так и других коллекций.

Ключевые слова: идентификация микроорганизмов; биохимические характеристики бактерий; хемосистематика; масс-спектрометрический анализ.

Для цитирования: Уварова Ю.Е., Брянская А.В., Розанов А.С., Шляхтун В.Н., Демидов Е.А., Старостин К.В., Горячкова Т.Н., Шеховцов С.В., Слынько Н.М., Пельтек С.Е. Комплексный метод таксономической идентификации микроорганизмов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4):376-382. DOI 10.18699/VJ20.630

An integrated method for taxonomic identification of microorganisms

Yu.E. Uvarova^{1,2}✉, A.V. Bryanskaya^{1,2}, A.S. Rozanov^{1,2}, V.N. Shlyakhtun^{1,2}, E.A. Demidov^{1,2}, K.V. Starostin^{1,2}, T.N. Goryachkovskaya^{1,2}, S.V. Shekhovtsov^{1,2}, N.M. Slynko^{1,2}, S.E. Peltek^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: uvarovaye@bionet.nsc.ru

Abstract. For accurate species-level identification of microorganisms, researchers today increasingly use a combination of standard microbiological cultivation and visual observation methods with molecular biological and genetic techniques that help distinguish between species and strains of microorganisms at the level of DNA or RNA molecules. The aim of this work was to identify microorganisms from the ICG SB RAS Collection using an integrated approach that involves a combination of various phenotypic and genotypic characteristics. Key molecular-genetic and phenotypic characteristics were determined for 93 microbial strains from the ICG SB RAS Collection. The strains were characterized by means of morphological, physiological, molecular-genetic, and mass-spectrometric parameters. Specific features of the growth of the strains on different media were determined, and cell morphology was evaluated. The strains were tested for the ability to utilize various substrates. The strains studied were found to significantly differ in their biochemical characteristics. Physiological characteristics of the strains from the collection were identified too, e.g., the relationship with oxygen, type of nutrition, suitable temperature and pH ranges, and NaCl tolerance. In this work, the microorganisms analyzed were combined into separate groups based on the similarities of their phenotypic characteristics. This categorization, after further refinement and expansion of the

spectrum of taxa and their metabolic maps, may serve as the basis for the creation of an "artificial" classification that can be used as a key for simplified and quicker identification and recognition of microorganisms within both the ICG SB RAS Collection and other collections.

Key words: identification of microorganisms; biochemical characteristics of bacteria; chemosystematics; mass spectrometric analysis.

For citation: Uvarova Yu.E., Bryanskaya A.V., Rozanov A.S., Shlyakhtun V.N., Demidov E.A., Starostin K.V., Goryachkovskaya T.N., Shekhovtsov S.V., Slynko N.M., Peltek S.E. An integrated method for taxonomic identification of microorganisms. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):376-382. DOI 10.18699/VJ20.630

Введение

Идентификация прокариот, которые морфологически менее разнообразны, чем эукариоты, основана на использовании широкого спектра фенотипических, а во многих случаях и генотипических признаков. При описании и идентификации бактерий изучают их культуральные свойства, морфологию, организацию клетки, физиолого-биохимические особенности, химический состав клеток, содержание гуанина и цитозина в ДНК, последовательность нуклеотидов в гене, кодирующем синтез 16S рРНК, и другие фено- и генотипические признаки.

Фенотипические методы идентификации широко распространены в основном благодаря их относительно низкой стоимости. Фенотипические реакции обычно включают реакции на различные химические вещества или различные биохимические маркеры. Однако проявление фенотипических признаков микроорганизма (размер и форма клетки, споруляция, клеточный состав, антигенность, биохимическая активность, чувствительность к антимикробным средствам и т. д.) часто зависит от используемых питательных сред и условий культивирования. Поэтому с целью улучшения классических методов биохимической идентификации в последние годы были созданы современные методы биохимической идентификации (Church, 2016; Reyes, 2018).

К культуральным, или макроморфологическим, свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах. Морфологическая характеристика и организация клеток бактерий включают такие признаки, как форма и размеры клеток, их подвижность, наличие жгутиков и тип жгутикования, способность к спорообразованию. Первостепенное значение в систематике бактерий придается окраске клеток по Граму и строению их клеточных стенок.

Изучение физиолого-биохимических свойств включает, прежде всего, установление способа питания исследуемой бактерии (фото/хемо-, авто/гетеротрофия) и типа энергетического метаболизма (способность к брожению, аэробному или анаэробному дыханию или фотосинтезу). Важно определить такие признаки, как отношение бактерии к молекулярному кислороду, температуре, рН среды, солености, освещенности и другим факторам среды. В данную группу признаков входят также перечень субстратов, утилизируемых в качестве источников углерода, азота и серы, потребность в витаминах и других факторах роста, образование характерных продуктов метаболизма, наличие некоторых ферментов. Для этого часто используют специальные тесты.

Многие тесты, применяемые для обнаружения перечисленных признаков (иногда их называют рутинными

тестами), важны для диагностики и широко используются в медицинской микробиологии. Их постановка требует значительных затрат времени, большого количества сложных сред и реактивов, соблюдения стандартных условий проведения, аккуратности выполнения. Для ускорения и облегчения процесса идентификации некоторых микроорганизмов, имеющих главным образом медицинское значение, разработаны различные тест-системы, например MIKROLATEST® ID | Erba Lachema s.r.o., BioLog и др. Так, система MIKROLATEST® ID предназначена для идентификации энтеробактерий, представляет собой пластиковую камеру с ячейками, содержащими окрашенные диагностические среды. О положительном или отрицательном результате теста судят по изменению цвета среды или после введения специальных реактивов (тест на образование индола, реакция Фогес–Проскауэра).

Передовая фенотипическая технология BioLog предоставляет ценную информацию о свойствах штаммов в дополнение к идентификации на уровне вида. Молекулярные методы, такие как секвенирование 16S рРНК и MALDI-TOF, не дают информации о свойствах штамма. Технология утилизации источника углерода в системе BioLog позволяет идентифицировать микроорганизмы окружающей среды и патогенные микроорганизмы путем создания характерного рисунка или «метаболического отпечатка пальца» в результате отдельных тестовых реакций, проводимых в микропланшете. Культуральные суспензии тестируют с помощью панели предварительно выбранных анализов, затем инкубируют, считывают и сравнивают с базами данных.

К современным методам биохимической идентификации относят также матрично-активированную лазерную десорбцию/ионизацию с времяпролётной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS), которая является одной из новейших систем идентификации микроорганизмов. Несмотря на то что это «фенотипическая» система, она в некотором смысле устраняет пробел в достоверности результатов испытаний, полученных с помощью биохимических систем фенотипирования и идентификационных систем генотипирования. Система очень быстра, что делает ее хорошим примером «микробиологического экспресс-метода» (Gaudreau et al., 2018).

Идентификация бактерий по знаниям о составе клеток бактерий известна как хемосистематика. Хемотаксономические методы могут быть важными, в частности у тех групп бактерий, чьи морфологические и физиологические характеристики широко варьируют и недостаточны для их удовлетворительной идентификации. Состав клеточной стенки определяет и серологические свойства бактерий,

это лежит в основе иммунохимических методов их идентификации.

Иногда в качестве хемотаксономического маркера используют липидный и жирнокислотный состав клеток бактерий. Интенсивное изучение жирных кислот стало возможным с развитием метода газохроматографического анализа. Различия в составе липидов используют при идентификации бактерий на уровне рода и даже вида. Этот метод, однако, имеет определенные ограничения, поскольку содержание жирных кислот в клетках может зависеть от условий культивирования и возраста культуры.

Для идентификации бактерий и создания филогенетической системы их классификации наиболее широкое распространение и значение получил метод анализа нуклеотидных последовательностей в рибосомальных РНК.

Коллекция микроорганизмов биотехнологического назначения, созданная в ФИЦ ИЦиГ СО РАН в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для задач биотехнологии и биоинженерии, исследования их генетики и метаболизма, включает более 1500 штаммов, культур микроорганизмов и образцов ДНК. В коллекционный фонд вошли представители всех основных надцарств (грибы, бактерии, археи, водоросли) и физиологических групп (в том числе анаэробы и экстремофилы). Большинство штаммов выделено из ранее не изученных уникальных экстремальных экосистем: соленых озер, горячих источников, а также из почвы, морских акваторий, пресноводных водоемов.

С целью точной видовой идентификации микроорганизмов сегодня все чаще применяют сочетание стандартных микробиологических методов культивирования и визуального наблюдения с методами молекулярной биологии и генетики, помогающими различать виды и штаммы микроорганизмов на уровне молекул ДНК или РНК (Кардымон, Кудрявцева, 2016). Для биотехнологии важной является информация не только о видовой принадлежности штаммов, но и об их субстратной специфичности, полноте реализации метаболических путей и активности метаболических реакций, возможности их регуляции. Поэтому комплексный подход к идентификации природных микроорганизмов упрощает задачу поиска биотехнологически перспективных штаммов.

Целью данной работы было проведение идентификации микроорганизмов из коллекции ИЦиГ СО РАН с помощью комплексного подхода, сочетающего использование широкого спектра фенотипических и генотипических признаков.

Методы

Фенотипическая характеристика. Форму и размер живых и окрашенных клеток определяли с применением световых и электронных микроскопов Axioskop 2 Plus, Axioskop A1, LIBRA 120 фирмы Carl Zeiss ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Препараты готовили стандартными методами (Нетрусов и др., 2005). Окрашивание по Граму проводили набором Gram stain kit (Sintakon, Россия) согласно рекомендациям производителя.

Температурные и pH оптимумы роста, устойчивость к NaCl, каталазную, уреазную, оксидазную активности,

анаэробный рост, амилалитическую и казеиназную и другие активности, а также способность использовать различные субстраты определяли по (Нетрусов и др., 2005; Logan, De Vos, 2009). Большинство тестов проведено на основе реактивов и китов систем LACHEMA и BioLog.

Секвенирование генов 16S рРНК. Таксономическую принадлежность (филогенетическое положение) штаммов определяли по последовательности гена 16S рРНК. Для этого ДНК бактерий выделяли стандартным фенольным методом (Маниатис и др., 1984). Амплификацию гена 16S рРНК проводили при помощи универсальных бактериальных праймеров 16S-8-f-B (5'-AGRGTGTTGAT CCTGGCTCA-3') и 16S-1350-r-B (5'-GACGGCGGGTG TGTACAAG-3'). Реакционная смесь содержала 1.5 mM MgCl₂, 65 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0.05 % Tween-20, 0.2 mM dNTP, 0.3 mM праймеров и 1 е. а. рекомбинантной Taq-полимеразы (SibEnzyme, Новосибирск). Секвенирование ДНК выполнялось в ЦКП «Геномика» СО РАН.

Поиск сходных последовательностей в нуклеотидных базах данных проводили при помощи программ серии Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), выравнивание – при помощи программы ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>).

Хемотаксономические свойства. Для анализа жирнокислотного состава клеток штаммы выращивали при оптимальных значениях температуры до достижения экспоненциальной фазы роста. Полученный биоматериал обрабатывался по (Jenkins, Tanner, 1977), после щелочно-гидролиза жиров кислоты экстрагировали гексаном и метилировали метанольным раствором HCl по (Schäffer et al., 2002). Смесь метиловых эфиров жирных кислот анализировали методом газовой хроматографии на хроматографе Agilent Technologies 6890N с квадрупольным масс-спектрометром Agilent Technologies 5973N, колонка кварцевая DB-1. Газ-носитель – гелий с постоянным потоком 1 мл/мин. Температура инжектора 250 °С. Ввод пробы осуществляли с помощью микрошприца, объем вводимой пробы 1 мкл. Ионизация электронным ударом (70 эВ). Хромато-масс-спектрометрический анализ исследуемых растворов проводили по полному ионному току в режиме сканирования (SCAN) в диапазоне масс от 10 до 800 а. е. м., в режиме мониторинга селективных ионов (SIM) по молекулярному иону анализируемого соединения. Метиловые эфиры жирных кислот идентифицировали сравнением с базой The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0a, build Jul 2002.

Масс-спектрометрический анализ выполняли на масс-спектрометре Ultraflex III MALDI TOF/TOF (BrukerDaltonics). Спектры снимали в линейном позитивном режиме с частотой лазера 100 Гц в диапазоне масс 2000–20000 Да. Напряжение на ускоряющем электроде 25 кВ, напряжение IS2 23.45 кВ, напряжение на линзе 6 кВ, без задержки экстракции. Для каждой пробы получали по три спектра суммированием 500 лазерных импульсов (5 × 100 импульсов с разных позиций ячейки мишени). Внешнюю калибровку проводили с использованием точных значений масс известных белков *Escherichia coli*: RL36 – 4365.3 Да, RS22 – 5096.8, RL34 – 5381.4, RL32 –

6315.0, RL29 – 7274.5, RS19 – 10 300.1 Да. Полученные серии спектров каждого штамма использовались в программе Biotyper 3.0 при создании характеристичных спектров, представляющих собой список пиков масс с усредненными значениями m/z и относительных интенсивностей пиков.

Для идентификации микроорганизмов из коллекции ИЦиГ СО РАН полученные фенотипические и генотипические признаки обрабатывали в программе Statistica 6.0. Дендрограммы были построены по методу невзвешенного попарного арифметического среднего, а двумерные графики – по методу многомерного шкалирования. Многофакторный анализ выполнен в программе Past 3, версия 3.25 (Hammer et al., 2001). В соответствии с требованиями программы, полуколичественные данные по 95 субстратам системы BioLog были переведены в цифровые значения: данные об отсутствии/присутствии закодированы как 0 или 1 соответственно, не определенные значения закодированы как «?».

Результаты

В работе по проведению идентификации микроорганизмов было использовано 93 штамма из коллекции ИЦиГ СО РАН. География мест отбора проб для изоляции микробных культур обширная – от виноградников Крыма до гейзеров Камчатки и Курил. По экологии места обитания варьируют от пресных водоемов до засоленных почв. Температурные условия холодные и термальные; реакция среды (рН) нейтральная, кислая или щелочная. Пробы отобраны как из чистых природных акваторий, так и из антропогенно загрязненных пород.

Штаммы выделяли на различных средах: LB, МПА, МПБ, среде Пфеннига с добавками и др. Культивирование проводили при температурах от 32 до 55 °С. Каждому штамму была дана филогенетическая, фенотипическая и масс-спектрометрическая характеристика.

Морфология и биохимические свойства

Большинство штаммов образовывали округлые колонии белого, кремового или желтого цвета. Края колоний ровные или волнистые, профиль – плоский или выпуклый. Размеры колоний варьировали от точечных (менее 1 мм) до более чем 5 мм. Клетки штаммов палочковидные. У 17 штаммов наблюдалось выделение пигмента в среду. Клеточная стенка грамположительная. Рост по штриху у штаммов варьировал от нерасплывающегося до сильно расплывающегося, от четковидного до сплошного. Для 75 штаммов отмечено спорообразование.

Исследованные температурные диапазоны роста – от 8 до 70 °С, рН – от 2 до 10. Диапазон температур для роста термофильных микроорганизмов был 40–70 °С с оптимумом при 60 °С, для мезофильных – от 25 до 40, 50 и 55 °С с оптимумом преимущественно при 35 °С. Интенсивный рост штаммов наблюдался при концентрации NaCl 1 г/л. Часть штаммов не росла или росла слабо при концентрации в среде NaCl 5 г/л.

Все исследованные штаммы протестированы на способность использовать различные субстраты с помощью систем LACHEMA и BioLog. Было определено, что штаммы являются аэробами и/или факультативными анаэробами,

а по типу питания – гетеротрофами и хемоорганогетеротрофами. Большинство штаммов хорошо росли на средах с казеином, крахмалом и твином в качестве единственного источника углерода. Выраженной казеиназной активностью, характеризовавшейся наличием зон просветления вокруг колоний при обработке их уксусной кислотой, обладали 73 штамма (Нетрусов и др., 2005). Также 81 штамм демонстрировал хорошую амилитическую активность, выявлявшуюся по зонам просветления. При реакции с йодом помимо обычного обесцвечивания в ряде случаев наблюдалось покраснение среды вокруг колоний, свидетельствующее об образовании декстринов.

Установлено, что 40 штаммов обладали β-галактозидазной активностью. Практически все штаммы не деградировали малонат, цитрат, орнитин и серосодержащие соединения (отрицательный тест на H₂S). Все штаммы, кроме одного, не использовали лизин. Уреазной активностью обладали 17 штаммов. Все штаммы не проявляли β-глюкоронидазной активности. Штаммы имели разное отношение к маннитулу, трегалозе и лактозе, целлобиозе, аргинину, мелибиозе, сорбитолу, салицину, раффинозе, инозитолу, арабитолу, адонитолу, дульциту. Двадцать штаммов имели β-ксилозидазную активность.

Большинство исследованных штаммов не использовали следующие соединения: D-туранозу, N-ацетилнейраминную кислоту, п-гидроксибензилуксусную кислоту, метилпируват, D-фукозу, L-фукозу, L-рамнозу, D-аспарагиновую кислоту, D-серин, глицил-L-пролина глюкуронамид, муциновую, хинную, D-сахарную, α-гидроксимасляную кислоты, β-гидрокси-D, L-масляную кислоту, α-кетомасляную кислоту и бутират натрия.

Выявлено, что большая часть штаммов относится к роду *Bacillus*, остальные – к родам *Anoxybacillus*, *Lysinibacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas*.

Для 83 штаммов коллекции созданы характеристичные масс-спектры белковых профилей. Филопротеомные данные находились в соответствии с таксономической принадлежностью штаммов, определенной с помощью секвенирования генов 16S рРНК. Результаты масс-спектрометрического анализа дополнили базу характеристичных масс-спектров и могут быть использованы в дальнейшей идентификации микроорганизмов в тех случаях, когда затруднено получение качественного препарата ДНК для секвенирования.

При анализе жирнокислотного состава клеточной стенки были обнаружены следующие жирные кислоты: насыщенные неразветвленные – миристиновая (C14:0); кислоты с разветвленной цепочкой – изомиристиновая (isoC14:0), изопентадекановая (isoC15:0), антеизопентадекановая (aC15:0), изопальмитиновая (isoC16:0), антеизопальмитиновая (aC16:0); мононенасыщенные – пальмитолеиновая (C16:1). Состав и соотношение жирных кислот в составе клеточной стенки бактерий являются важной характеристикой при идентификации микроорганизмов.

Обсуждение

По последовательности 16S рибосомальной РНК было построено филогенетическое дерево, которое отражает кластеризацию штаммов бактерий по видовой принад-

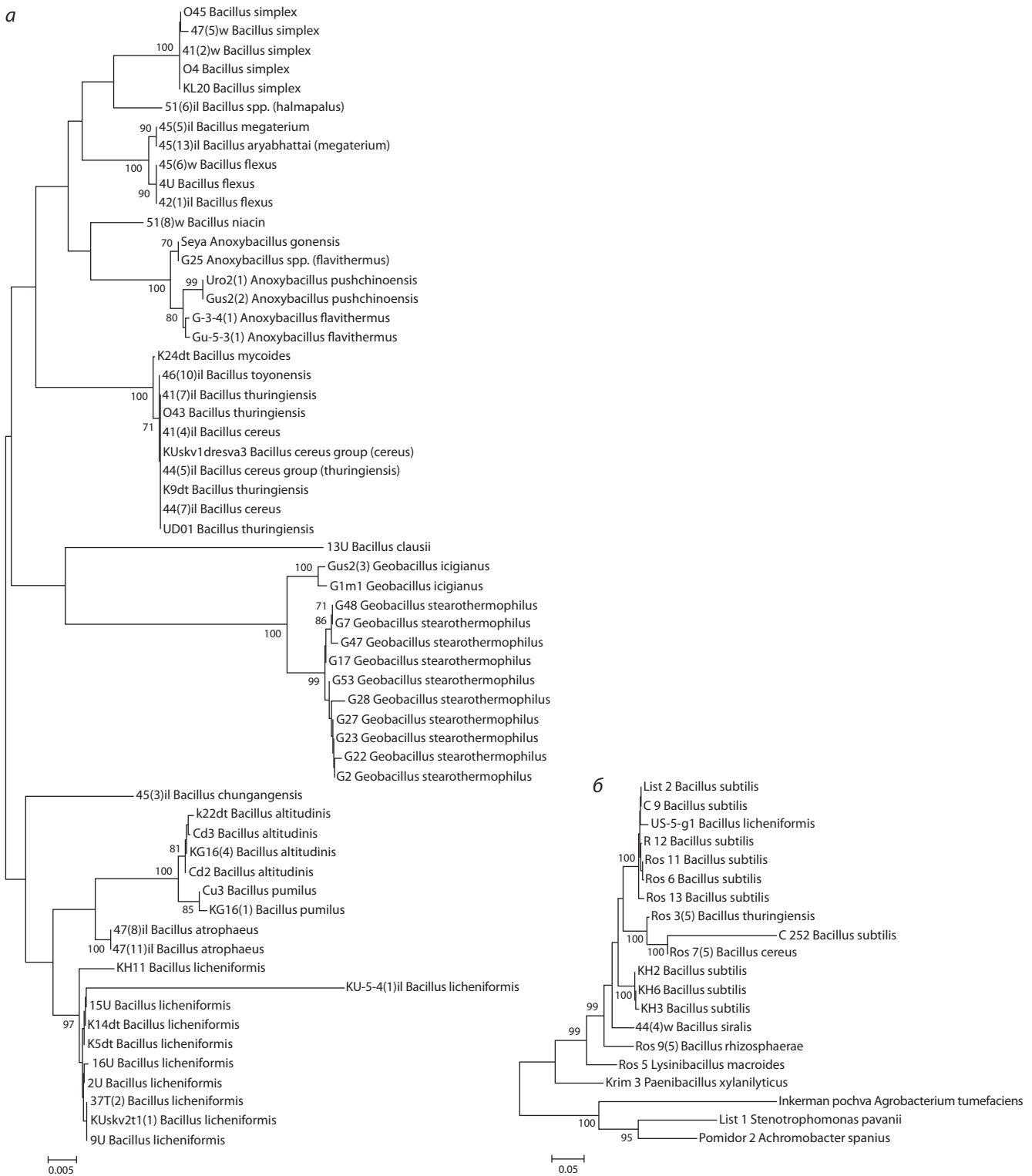


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное методом минимальной эволюции на основании последовательностей 16S рРНК штаммов, для которых получены биохимические данные тестами LaChema (а) и BioLog (б). Цифры возле ветвей – бутстрепная поддержка.

лжности (рис. 1). Статистический анализ 21 штамма по 96 формализованным биохимическим параметрам, полученным при помощи тестов BioLog Omnilog, не выявил четкой кластеризации (рис. 2). Это хорошо видно на примере штаммов *Bacillus subtilis*. Из 21 проанализиро-

ванного образца к виду *B. subtilis* относятся 10 штаммов. Шесть из них (№ 10, 13, 14, 19, 20, 21) входят в относительно рыхлый кластер, который образуют представители группы *B. subtilis* и группы *B. cereus*. В этот же кластер попадает *Lysinibacillus macrolides* (штамм № 6). Другие

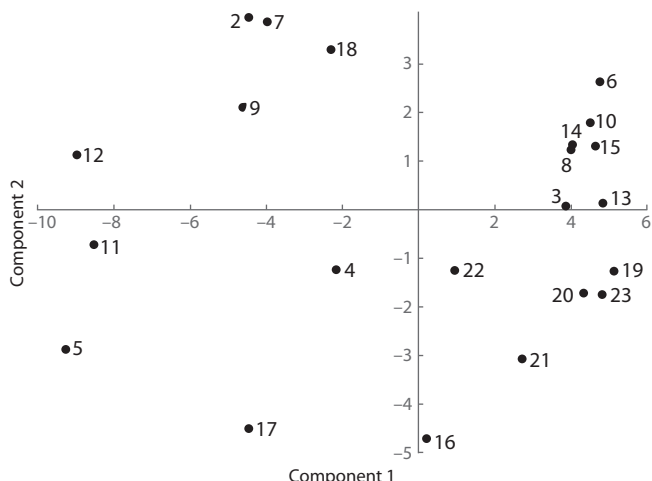


Рис. 2. Результаты статистического анализа данных о таксономическом составе микроорганизмов и их особенностях метаболизма по первой паре главных компонент.

Анализ по 96 параметрам.

штаммы *B. subtilis* (№ 2, 7, 11, 17) не кластеризуются со своим видом (см. рис. 2).

В систематике прокариот для определения вида используют такие параметры, как последовательность рибосомальной РНК, строение клеточной мембраны и некоторые особенности метаболизма, например метаногенез или бактериородопсинзависимый фотосинтез (DasSarma et al., 2019). Полученные данные свидетельствуют о том, что исследованные особенности метаболизма не являются видоопределяющими, но могут играть главную роль при определении ценности того или иного штамма для целей биотехнологии, так как учитывают возможность разложения разных субстратов.

Результаты кластеризации 61 штамма по 29 параметрам метаболизма, полученным в результате анализа тестов Microplate LaChema, приведены на рис. 3. Были выбраны такие параметры, как способность бактерий утилизиро-

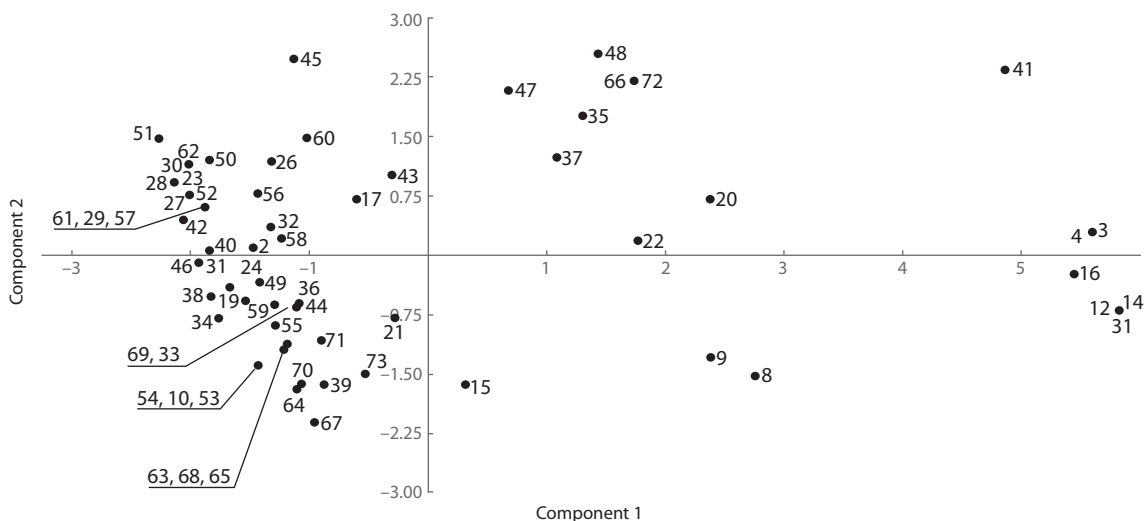


Рис. 3. Результаты статистического анализа данных о таксономическом составе микроорганизмов и их особенностях метаболизма по первой паре главных компонент.

Анализ по 29 параметрам.

вать некоторые сахара (например, маннитол, трегалозу, лактозу, целлобиозу, сахарозу, раффинозу, глюкозу), наличие уреазной активности, продукции сероводорода и др. В анализ вошли штаммы 3 видов *Anoxybacillus*, 17 видов *Bacillus* и 2 видов *Geobacillus*. Основная масса изученных штаммов образует достаточно плотный кластер, независимо от вида микроорганизма, что говорит о сходстве используемых для роста субстратов. Способность к росту при наличии различных сахаров и органических кислот, которыми в основном представлены субстраты, характерна для представителей разных таксономических групп царства бактерий вне зависимости от их происхождения. Второй кластер (меньшего размера) образован некоторыми штаммами бактерий, относящихся к видам *B. simplex*, *Anoxybacillus* spp. (*flavithermus*), *G. stearothermophilus*, *B. mycoides*, *A. pushchinoensis* и *B. licheniformis*. К этим видам относилось несколько анализируемых штаммов, однако по метаболическим признакам остальные штаммы перечисленных видов попадают в большой кластер. Объединение штаммов в малом кластере по метаболическим признакам свидетельствует о сходстве потребляемых субстратов или, возможно, о потере способности утилизировать часть исследованных субстратов. Кластеризация в данном случае отражает не общность эволюционного происхождения, а субстратную специфичность, сформировавшуюся в результате конвергентных процессов, возможно, при адаптации к субстратам. Попавшие в малый кластер штаммы различались также по местам выделения.

По морфологическим признакам тоже наблюдается формирование кластеров. Например, в небольшой кластер объединены штаммы микроорганизмов, образующих достаточно крупные колонии (рис. 4).

Очевидно, что при дальнейшей доработке и расширении спектра таксонов и их метаболических карт возможно создать основу «искусственной» классификации, которая может быть использована в качестве ключа для упрощенной и более быстрой идентификации и распознавания микроорганизмов.

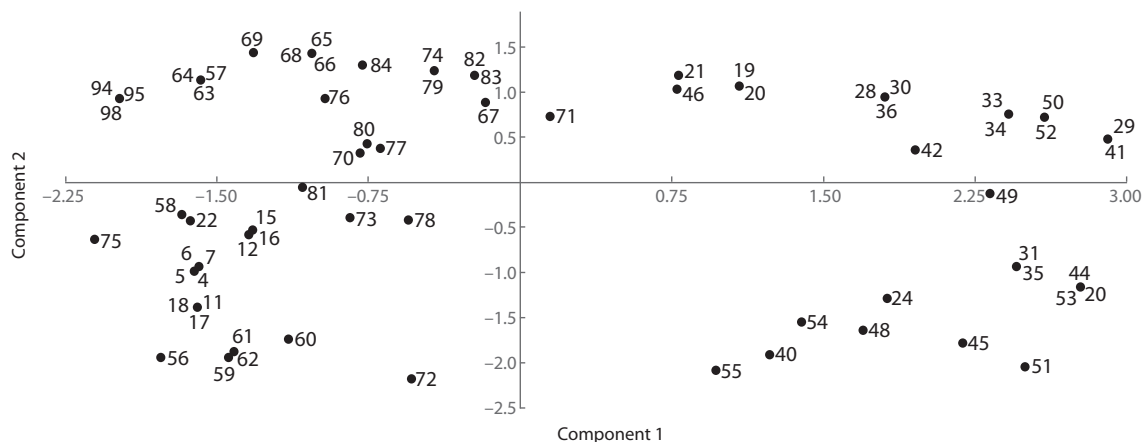


Рис. 4. Результаты статистического анализа данных о морфологических признаках по первой паре главных компонент.

Заключение

Описаны ключевые молекулярно-генетические и фенотипические признаки для 93 штаммов микроорганизмов коллекции ИЦиГ СО РАН. Штаммы охарактеризованы по морфологическим, физиологическим, молекулярно-генетическим и масс-спектрометрическим параметрам. Выявлены особенности роста штаммов на разных средах, изучена морфология клеток. Штаммы протестированы на способность использовать различные субстраты. Исследованные штаммы значительно различались по своим биохимическим свойствам. Определена физиология штаммов коллекции: отношение к кислороду, тип питания, диапазон температур и рН, отношение к NaCl и др.

Применение комплексного подхода к идентификации микроорганизмов необходимо при решении задач прицельного поиска биотехнологически перспективных штаммов. В настоящей работе проведено объединение организмов в отдельные группы/кластеры на основании сходства их фенотипических характеристик, что может при дальнейшей доработке и расширении спектра таксонов и их метаболических карт послужить базой для создания «искусственной» классификации, которая может быть использована в качестве ключа для упрощенной и более быстрой идентификации и распознавания микроорганизмов в рамках как Коллекции ИЦиГ СО РАН, так и других коллекций.

Список литературы / References

- Кардымон О.Л., Кудрявцева А.В. Молекулярно-генетические методы для исследования микробиома кишечника. *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2016; 26(4):4-13. DOI 10.22416/1382-4376-2016-26-4-4-13.
[Kardymon O.L., Kudryavtseva A.V. Molecular genetic methods for intestinal microbiome investigation. *Rossiiskiy Zhurnal Gastroenterologii, Gepatologii, Koloproktologii = Russian Journal of Gas-*

- troenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2016;26(4):4-13. DOI 10.22416/1382-4376-2016-26-4-4-13. (in Russian)]
Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
[Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor lab., 1982. (Russ. ed. Maniatis T., Frich E., Sembruk D. *Metody Geneticheskoy Inzhenerii. Molekulyarnoe Klonirovanie*. Moscow: Mir Publ., 1984. (in Russian)]
Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005.
[Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. *Workshop on Microbiology*. Moscow: Academy Publ., 2005. (in Russian)]
Church D.L. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. In: Leber A. (Ed.). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Fourth Edn. AMS Press, Washington, 2016;3.17.1.1-3.17.48.3. DOI 10.1128/9781555818814.ch3.17.
DasSarma P., Capes M.D., DasSarma S. Comparative genomics of *Halobacterium* strains from diverse locations. In: Das S., Dash H.R. (Eds.). *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Acad. Press, 2019; 285-322. DOI 10.1016/B978-0-12-814849-5.00017-4.
Gaudreau A.M., Labrie J., Goetz C., Dufour S., Jacques M. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of bacteria growing as biofilms. *J. Microbiol. Methods*. 2018;145:79-81. DOI 10.1016/j.mimet.2018.01.003.
Hammer O., Harper D.A., Ryan P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaentol. Electronica*. 2001;4(1):9.
Jenkins R.E., Tanner M.J.A. The structure of the major protein of the human erythrocyte membrane. Characterization of the intact protein and major fragments. *Biochem. J*. 1977;161(1):139-147. DOI 10.1042/bj1610139.
Logan N.A., De Vos P. Genus I. *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3. The *Firmicutes*. Springer, 2009;21-128.
Reyes A.T. Morpho-biochemical aided identification of bacterial isolates from Philippine native pig. *Adv. Pharmacol. Clin. Trials*. 2018; 3(5):000148. DOI 10.23880/apct-16000148.
Schäffer C., Wugeditsch T., Kählig H., Scheberl A., Zayni S., Messner P. The surface layer (S-layer) glycoprotein of *Geobacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a: analysis of its glycosylation. *J. Biol. Chem*. 2002;277(8):6230-6239. DOI 10.1074/jbc.M108873200.

ORCID ID

S.V. Shekhovtsov orcid.org/0000-0001-5604-5601
S.E. Peltek orcid.org/0000-0002-3524-0456

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания КГЦ ИЦиГ СО РАН (075-15-2019-1662).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.12.2019. После доработки 26.03.2020. Принята к публикации 01.04.2020.