

УДК 579.8.06: 546.161

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ  
РЕЗУЛЬТАТОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ  
С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА МАЛДИ  
ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ  
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
НА ПРИМЕРЕ *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS***

© 2013 г. **К.В. Старостин, Е.А. Демидов, А.С. Розанов,  
А.В. Брянская, С.Е. Пельтек**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: starostin@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 15 августа 2013 г. Принята к публикации 5 сентября 2013 г.

Потребность в быстрых и точных методах идентификации микроорганизмов является насущной проблемой для самых различных сфер человеческой деятельности. Прежде всего это, конечно, касается клинической диагностики, но данные методы востребованы также в экологическом мониторинге, фармацевтической и пищевой промышленности, научных исследованиях и т. д. На сегодняшний день существует множество методов идентификации микроорганизмов (фенотипические, генотипические, хемотаксономические методы, прямое белковое профилирование и др.). В данной работе авторы оценивают влияние различных условий культивирования, таких как температура, время роста и тип питательной среды, на воспроизводимость результатов идентификации микроорганизмов методом МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии на примере трех штаммов *Geobacillus stearothermophilus*.

**Ключевые слова:** МАЛДИ, прямое белковое профилирование, идентификация микроорганизмов, *Geobacillus stearothermophilus*.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время идентификация микроорганизмов методом МАЛДИ (матрично ассоциированная лазерная дисорбция/ионизация) времяпролетной масс-спектрометрии или прямое белковое профилирование является достойным конкурентом большинству существующих методов идентификации микроорганизмов, так как обеспечивает высокую скорость и низкую трудозатратность анализов, не уступая при этом в точности идентификации (Dickinson *et al.*, 2004; Mellmann *et al.*, 2008; Böhme *et al.*, 2013). На данный момент метод хорошо себя зарекомендовал и широко применяется в клинической диагностике. Существующие коммерчески до-

ступные базы белковых профилей основных патогенных микроорганизмов содержат несколько тысяч белковых профилей, что позволяет идентифицировать большинство патогенов человека. Однако в отличие от клинической диагностики, в остальных областях идентификация микроорганизмов методом МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии не нашла столь широкого распространения. Прежде всего, это связано с отсутствием единого протокола для выращивания конкретных микроорганизмов.

Метод идентификации с помощью МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии основан на получении спектра белкового профиля клеток микроорганизмов и сравнении его с эталонным спектром в базе данных. Спектр обычно

содержит значения масс белков в диапазоне от 2 до 20 кДа. В работе Ryzhov, Fenselau (2001) была проведена идентификация белков *E. coli*, присутствующих в полученных спектрах. Более половины белков в этом диапазоне оказались рибосомальными белками, остальная часть белков относилась к ДНК-связывающим белкам и белкам холодового шока. Рибосомальные белки очень консервативны, что обеспечивает их таксономическую специфичность, а их набор не меняется в зависимости от условий и фазы роста. Так как в спектрах присутствуют белки, трансляция которых может зависеть от внешних условий, возникает вопрос: насколько данные белки могут повлиять на воспроизводимость спектров и точность идентификации на видовом и субвидовом уровнях при варьировании условий роста микробиологической культуры. В нескольких работах было показано, что при изменении условий роста, таких как среда и время роста, меняется состав белковых профилей, при этом указывается, что полученная изменчивость не оказывает серьезного влияния на результаты идентификации (Ruelle *et al.*, 2004; Valentine *et al.*, 2005). В приведенных работах так же, как и в большинстве других публикуемых исследований, объектом идентификации служат патогены и другие клинически значимые виды и штаммы микроорганизмов, выращенные в оптимальных условиях. Вместе с тем большой интерес представляет использование данного метода для определения микроорганизмов в природных сообществах, что может быть востребовано при экологических исследованиях и поиске биотехнологически значимых штаммов, среди которых особый интерес представляют экстремофильные микроорганизмы. При исследовании неизвестных организмов, как это происходит в случае природных изолятов, невозможно заранее подобрать оптимальные условия для роста, поэтому для эффективного применения метода необходима уверенность в том, что отклонения от оптимума не окажут значительного влияния на результаты идентификации. В данной работе мы решили изучить вопрос влияния условий культивации на точность идентификации на примере трех штаммов *Geobacillus stearothermophilus*. Выбор данного вида обусловлен его широкой представленностью среди различных термальных экосистем и его перспективностью для

использования в биотехнологических схемах и способностью представителей рода *Geobacillus* ферментировать гексозы и пентозы, синтезируя этанол и молочную кислоту (Cripps *et al.*, 2009). В работе использовались имеющиеся в нашей коллекции штаммы G1w1, 18(x) и 20. Штаммы 18(x) и 20 выделены из проб, полученных из термальных источников Баргузинской долины в районе о. Байкал. Штамм G1w1 выделен из проб, полученных из термальных источников полуострова Камчатка.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Культивирование штаммов

Исследуемые штаммы выращивали на агаризованной среде Luria Bertani Medium (LB), обедненной среде LB (LB/5) и мяско-пептонном агаре (МПА) в течение 6–72 ч при температурах 60–70 °С.

### Масс-спектрометрический анализ

Подготовку образцов и масс-спектрометрический анализ проводили согласно стандартной методике, разработанной фирмой «Bruker Daltonics» для идентификации микроорганизмов посредством программного обеспечения Biotyper (Freiwald, Sauer, 2009).

### Подготовка образцов к масс-спектрометрическому анализу

Образец исследуемой культуры массой 10–15 мг ресуспендировали в 300 мкл деионизированной воды и инактивировали добавлением 900 мкл этанола. Полученную смесь тщательно перемешивали и центрифугировали 2 мин 16000 g. После удаления супернатанта осадок сушили 5 мин на вакуумном концентраторе. Высушенный осадок ресуспендировали в 50 мкл 70 % муравьиной кислоты для разрушения клеточных стенок, после чего добавляли 50 мкл ацетонитрила для экстракции белковой фракции. Полученную смесь тщательно перемешивали и центрифугировали 2 мин 16000 g. Для проведения масс-спектрометрического анализа использовали аликвоту из верхнего слоя супернатанта.

### Получение масс-спектров белковых экстрактов

Аликвоту подготовленного белкового экстракта объемом 0,7 мкл наносили на стальную масс-спектрометрическую мишень и высушивали на воздухе. После высыхания на образец наносили 0,7 мкл раствора матрицы НССА (6 мг/мл раствор  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты в 50 %-м ацетонитриле и 2 %-й трифторуксусной кислоте) и снова высушивали на воздухе.

В работе использовался масс-спектрометр Ultraflex III фирмы «Bruker Daltonics». Спектры снимали в линейном позитивном режиме с частотой лазера 100 Гц в диапазоне масс 2000–20000 Да. Напряжение на ускоряющих электродах – 25 кВ и 23,45 кВ, напряжение на линзе – 6 кВ без задержки экстракции.

Для получения каждого спектра суммировали данные от 500 лазерных импульсов. Внешнюю калибровку проводили с использованием точных значений масс известных белков *Escherichia coli*: RL36 4365,3 Да, RS22 5096,8 Да, RL34 5381,4 Да, RL32 6315,0 Да, RL29 7274,5 Да, RS19 10300,1 Да.

### Идентификация образцов

Спектры белковых профилей импортировали в программу Biotyper и идентифицировали по стандартным настройкам «Biotyper MSP Identification Standart method». Результатом идентификации является присвоение исследуемому спектру таксономического идентификатора род/вид и численного рейтинга точности идентификации, представленного в виде логарифмической шкалы от 0 до 3. Значение 3 соответствует абсолютному совпадению, значения от 2,300 до 3,000 – достоверное определение до вида; от 2,000 до 2,299 – достоверное определение до рода и надежное определение до вида, от 1,700 до 1,999 – надежное определение до рода.

### Создание эталонных суперспектров

Для создания характеристичных (эталонных) суперспектров отбирали по 12 проб для каждой бактериальной культуры. Из каждой пробы получали белковый экстракт, согласно

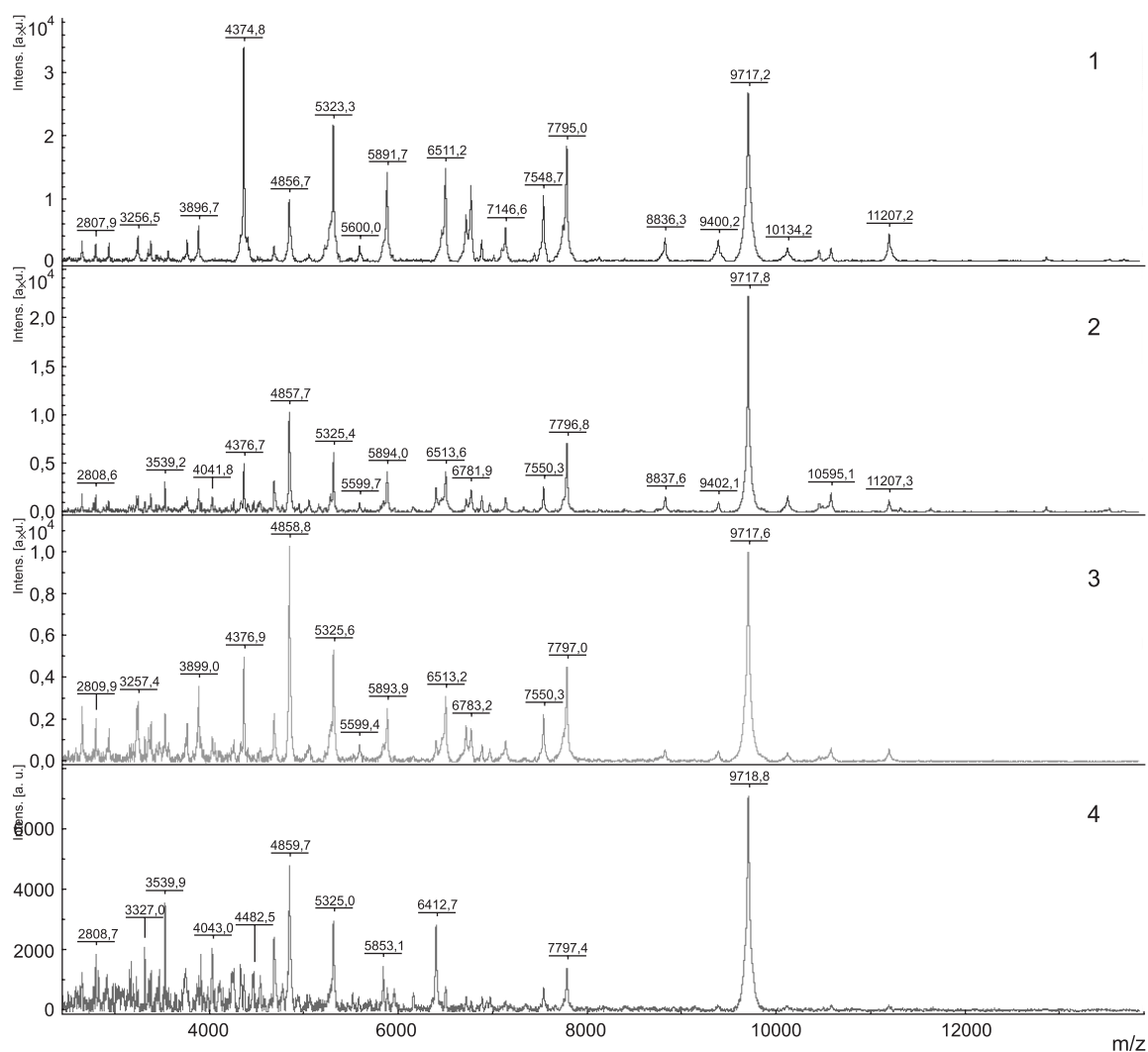
описанной выше методике, и снимали по 3 масс-спектра для каждой пробы. Полученные серии по 36 масс-спектров импортировали в программу «Biotyper» и использовали для создания характеристичных суперспектров с помощью стандартных настроек программы «BioTyper MSP Creation Standart Method». Полученные суперспектры сохраняли в базе данных программы «Biotyper».

### РЕЗУЛЬТАТЫ

*Geobacillus* ssp. – термофильные аэробные или факультативно анаэробные микроорганизмы с диапазоном роста в районе 40–70 °С (Nazina *et al.*, 2001). Используемые в работе штаммы растут в диапазоне температур 60–70 °С с оптимумом при температуре 65 °С. Оптимальной средой для роста является LB, и в течение ночи штаммы обычно образуют плотный газон на поверхности агаризованной среды. Данные условия культивации были приняты за стандартные.

На первом этапе проводилось исследование спектров белковых экстрактов в зависимости от времени культивации. Культуры исследуемых штаммов переходили в экспоненциальную фазу роста после 6–9 ч инкубации, в связи с этим время инкубации 9 ч было выбрано как первая точка анализа, далее спектры снимали через 24, 48 и 72 ч от начала инкубации. На рис. 1 приведены спектры для штамма G1w1. Видно, что с ростом времени инкубации ухудшается качество спектров – интенсивность пиков и их разрешенность. Например, при времени инкубации 9 ч хорошо видны пики с массами 8836, 9400, 10134 и 10595 Да. После 24 ч их относительная интенсивность снижается. После двух суток инкубации данные пики еще можно определить визуально, но из-за отношения сигнал/шум автоматический алгоритм программы flexAnalysis не определяет их. После 72 ч инкубации данные пики пропадали из спектра.

При времени инкубации 72 ч удалось получить спектры только для штамма G1w1. Для штаммов 18(x) и 20 значительное снижение качества спектров наблюдалось уже при времени инкубации 48 ч. На рис. 2 представлены спектры для штамма 20. При длительном времени инкубации из спектра пропадают пики с



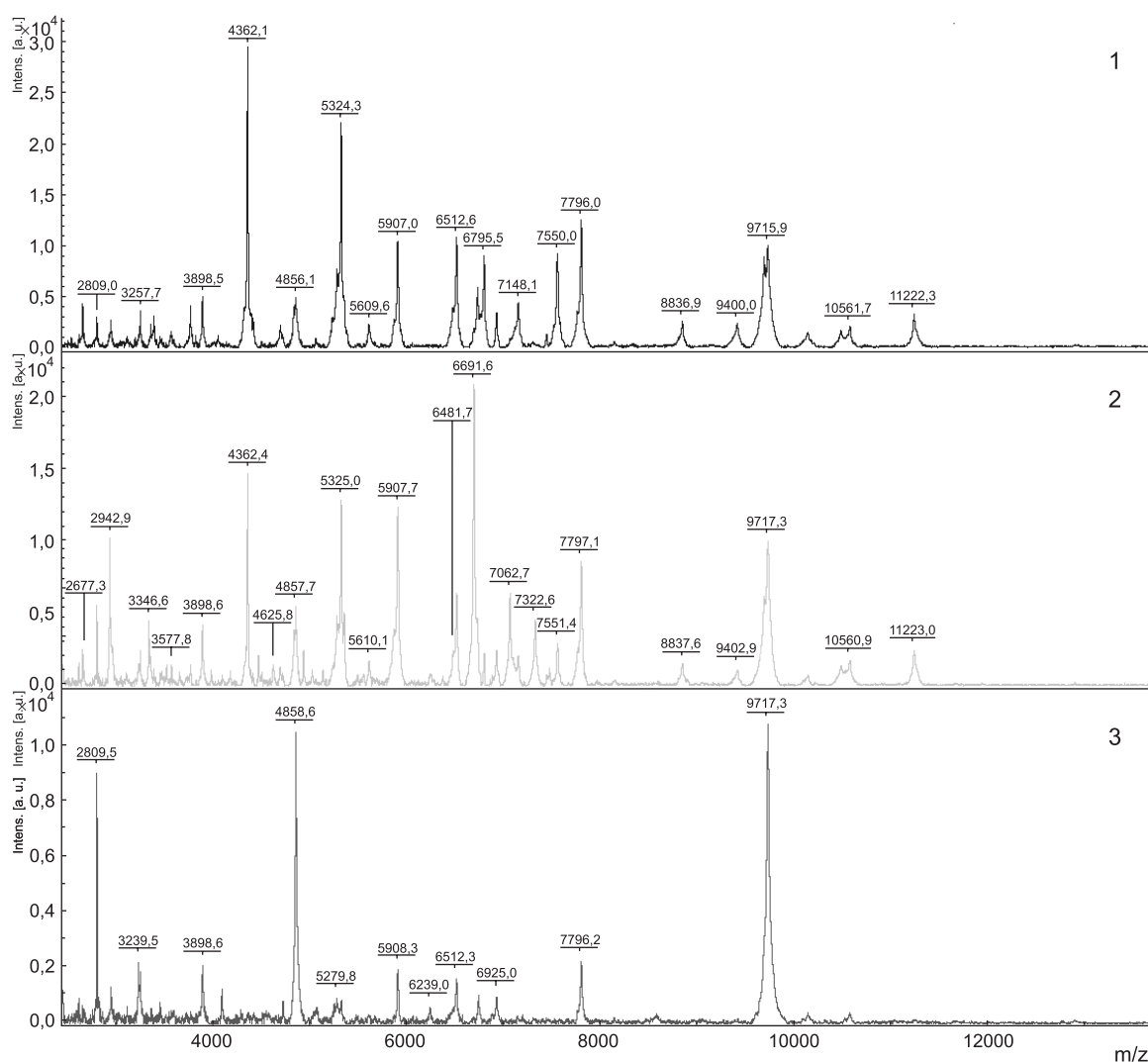
**Рис. 1.** Спектры штамма G1w1 на среде LB при температуре роста 65 °С и времени культивации: 9 ч (1), 24 ч (2), 48 ч (3), 72 ч (4).

массами 4362, 7550, 8837, 9402, 10561, 11223 Да (рис. 2). В спектрах с инкубацией 9 и 24 ч также наблюдаются отличия как в представленности пиков, так и в их относительной интенсивности. Например, пик с массой 6691 Да представлен как ярко выраженный мажорный пик в спектре с инкубацией 24 ч, при этом он отсутствует в спектре с 48-часовой инкубацией, а при 9-часовой инкубации представлен в виде минорного пика, слабо разрешенного относительно соседних пиков.

Ухудшение качества спектров, очевидно, связано с выходом роста культур на стационарную фазу с последующей гибелью клеток и спорообразованием. Это подтверждается данными, полученными при анализе масс-

спектров культур, выращенных на средах с разным содержанием питательных веществ. Для проведения исследования использовались три среды: стандартная среда LB, обедненная среда LB и МПА – наиболее богатая питательными веществами. При времени инкубации 9 ч спектры для LB и МПА практически идентичны и по представленности пиков, и по их относительной интенсивности (рис. 3). Спектры для бедной среды отличаются от спектров для LB и МПА более низкими показателями сигнал/шум и разрешенность пиков, представленностью и относительной интенсивностью пиков.

При времени инкубации 24 ч (рис. 4) для штамма 18(x) на всех трех средах наблюдаются отличия в относительных интенсивностях



**Рис. 2.** Спектры штамма 20 на среде LB при температуре роста 65 °С и времени культивации: 9 ч (1), 24 ч (2), 48 ч (3).

пиков, при этом наиболее близки друг другу по представленности пиков стандартная и обедненная среда LB. Спектр для среды МПА имеет очень низкое качество и заметные отличия в представленности пиков: в его спектре отсутствуют мажорные пики с массами 6691, 7061 и 7321, в то время как при времени инкубации 9 ч данные пики присутствуют только в спектре для обедненной среды LB (рис. 3).

Сопоставимые данные были получены для штаммов 20 и G1w1. При времени инкубации 9 ч, когда фаза роста близка к экспоненциальной, спектры обладают наилучшим качеством и максимальным сходством в представленности пиков и их относительной интенсивности. С выходом на стационарную фазу, когда начинаются

процессы гибели клеток и спорообразования, происходят ухудшение качества спектров и снижение количества пиков.

Для изучения влияния температуры культивирования на масс-спектрометрические характеристики белковых экстрактов исследуемые штаммы выращивали на среде LB в течение ночи при температурах инкубации 60, 65 и 70 °С. Как видно на примере штамма G1w1 (рис. 5), температура не оказывает заметного влияния на представленность пиков и их относительную интенсивность.

Для определения точности идентификации при разных условиях роста для всех трех штаммов были получены характеристичные суперспектры при стандартных условиях куль-

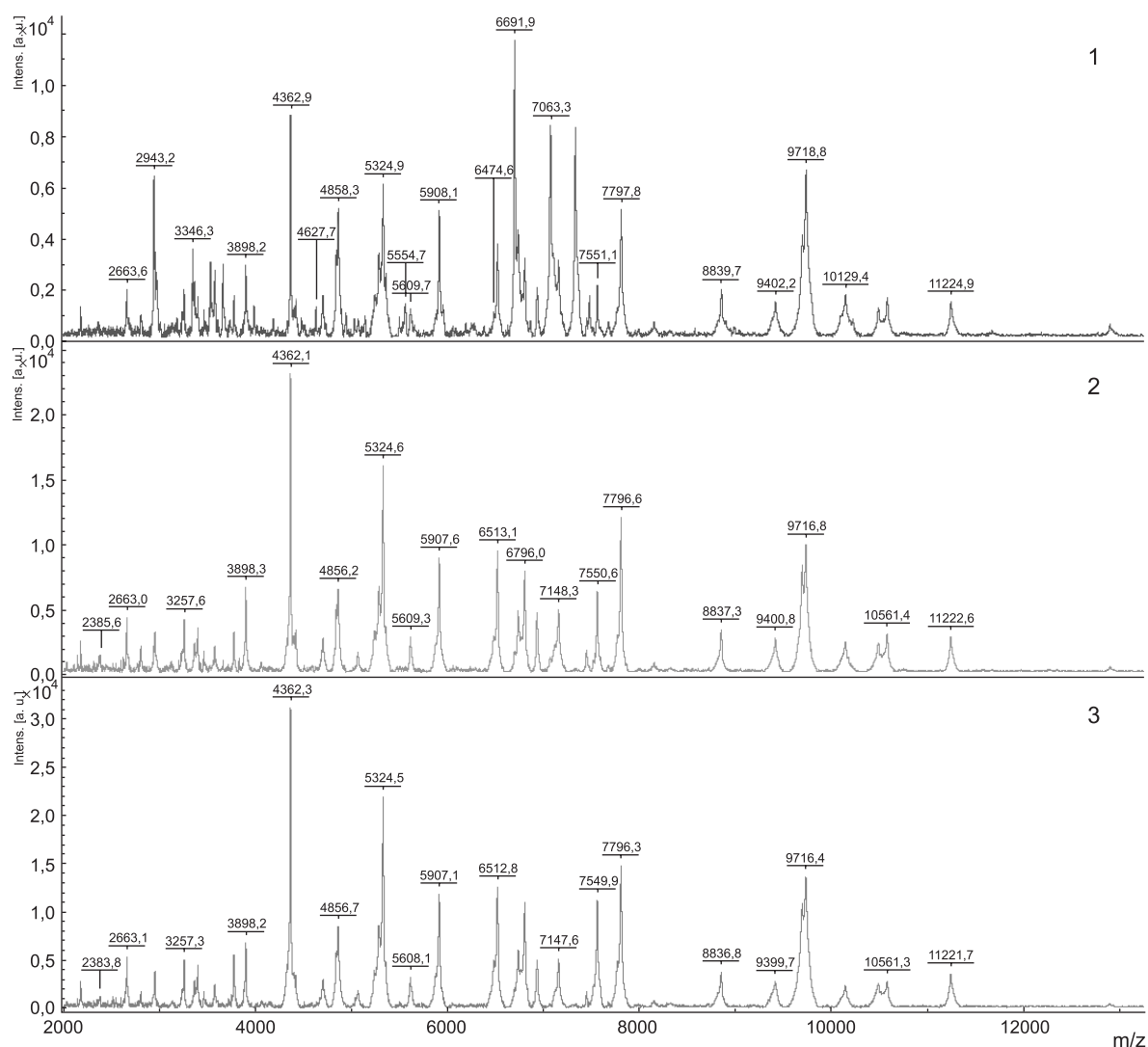


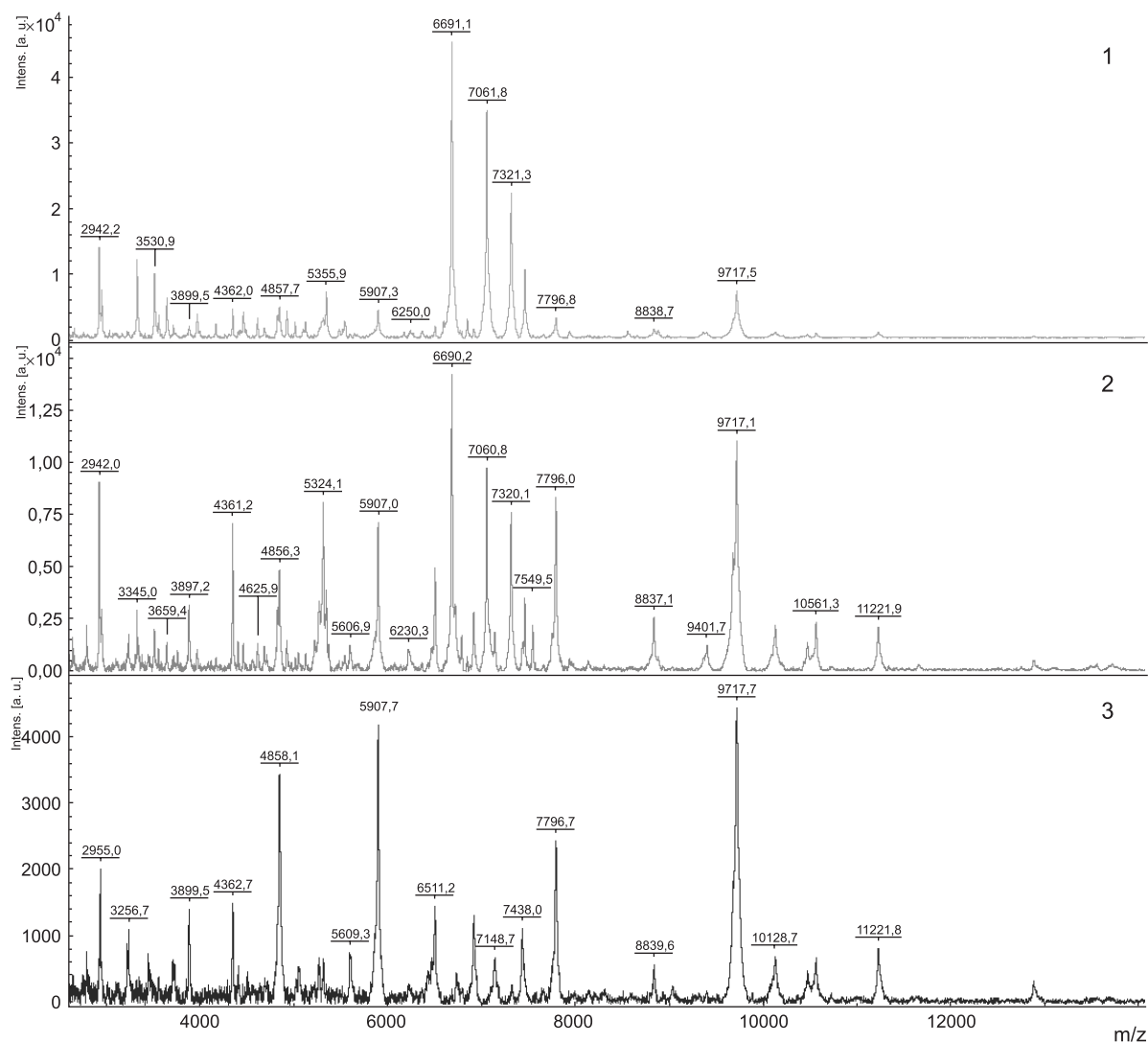
Рис. 3. Спектры штамма 18(x) при температуре культивации 65 °С и времени инкубации 9 ч на средах: 1 – обедненная среда LB/5; 2 – среда LB; 3 – среда МПА.

тивирования (среда LB, инкубация в течение ночи при температуре 65 °С). Полученные суперспектры (G1w1\_65\_LB, 18(x)\_65\_LB, 20\_65\_LB) внесли в базу данных, состоящую из 165 штаммов, относящихся к 24 родам и 41 виду, в том числе 20 представителей рода *Geobacillus*. С использованием имеющейся базы данных была проведена идентификация исследуемых штаммов по спектрам, полученным при вариации различных условий роста. Данные приведены в таблице.

Как видно из полученных данных, большинство образцов были идентифицированы как *Geobacillus stearothermophilus* с рейтингом идентификации выше 2, один штамм был

идентифицирован с рейтингом 1,95, что дает точность идентификации только до рода, и у трех штаммов рейтинг был ниже 1,7, что не позволяет их надежно идентифицировать. Штаммы 18(x) и 20 идентифицировались как *G. stearothermophilus*, но ни в одном случае не были идентифицированы по созданным для них в стандартных условиях суперспектрам – 18(x)\_65\_LB и 20\_65\_LB. Это можно объяснить высокой степенью филопротеомного родства данных штаммов со штаммами, внесенными в нашу базу данных, что не позволяет методу различить их. Штамм G1w1 в большинстве случаев был идентифицирован как G1w1\_65\_LB, что говорит о его заметной филопротеомной



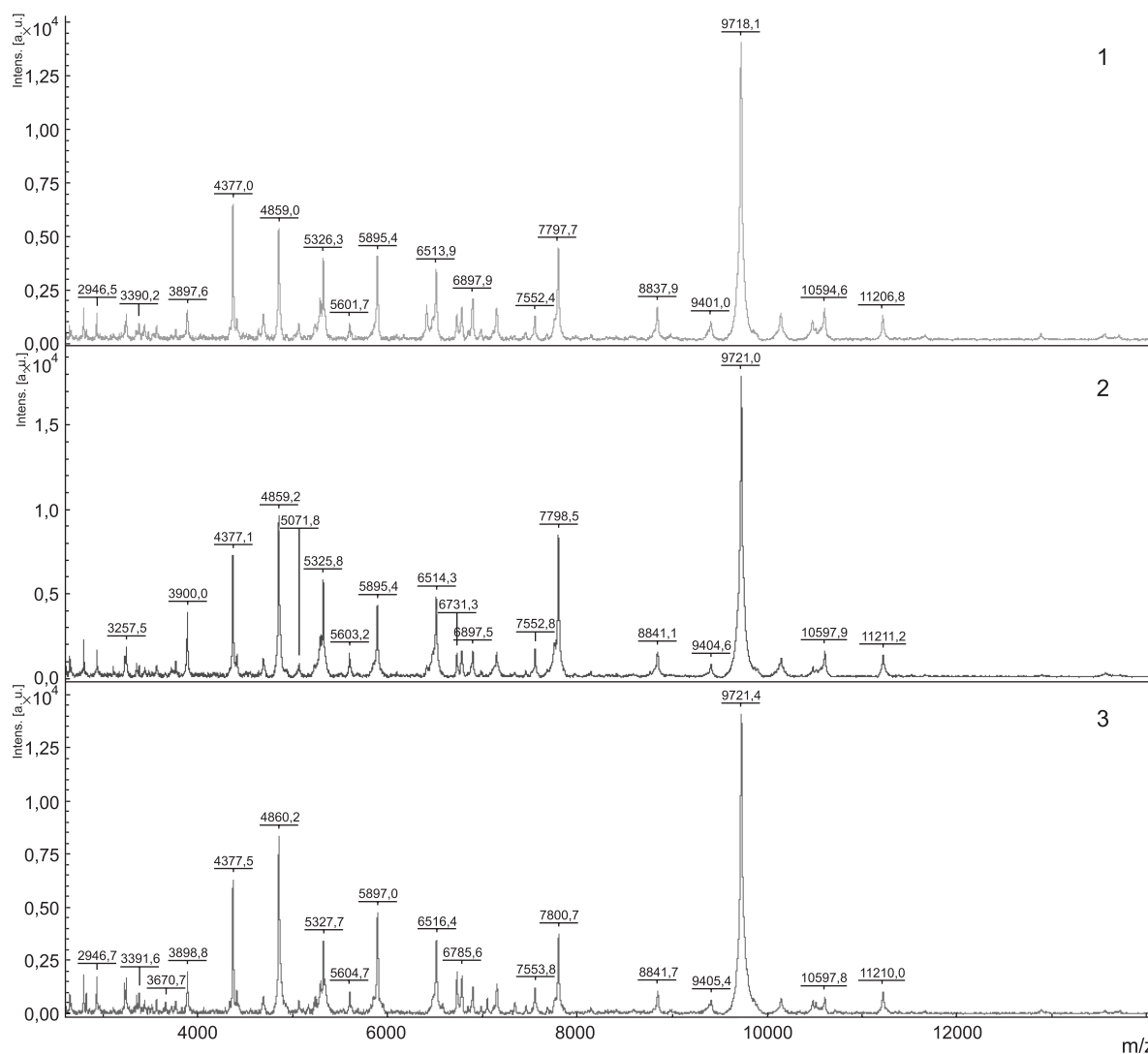


**Рис. 4.** Спектры штамма 18(x) при температуре культивации 65 °С, времени инкубации 24 ч на средах: 1 – обедненная среда LB/5; 2 – среда LB; 3 – среда МПА.

дистанции от остальных штаммов и принципиальной возможности метода идентифицировать микроорганизмы на субвидовом уровне.

При анализе зависимости точности идентификации от условий роста можно сделать вывод, что с течением времени культивации точность идентификации падает, что связано с уменьшением количества биологического материала в процессе спорообразования и гибели клеток при переходе в стационарную фазу и ухудшением в связи с этим качества масс-спектров (рис. 1, 2). При анализе культур, отобранных на экспоненциальной фазе роста (6–24 ч), наблюдается высокая точность идентификации с рейтингом, превышающим 2,3.

Питательность среды не влияет на точность идентификации в рамках экспоненциального роста, а влияет лишь на скорость роста культуры и время выхода в стационарную фазу. Для штаммов, выращенных на среде МПА, заметное снижение рейтинга точности идентификации начинается уже после 24 ч. При времени культивации 48 ч для штамма 18(x) спектры не удалось получить; для штаммов 20 и G1w1 качество полученных спектров было неудовлетворительным, что и проявилось в соответствующих рейтингах идентификации: 1,129 и 1,438. При этом для штамма G1w1 на среде LB были получены спектры в диапазоне времени культивации 6–72 ч (рис. 1) с рейтин-



**Рис. 5.** Спектры штамма G1w1, выращенного на среде LB при температурах культивации: 60 °C (1), 65 °C (2), 70 °C (3).

гами идентификации 2,521–2,063. Температура культивации в анализируемом нами диапазоне 60–70 °C не влияла на качество спектров (рис. 5) и результаты идентификации (табл.). При температурах 55 и 75 °C данные штаммы не росли.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основным фактором, влияющим на точность идентификации штаммов, является время инкубации. Для получения наилучшего результата необходимо отбирать пробы культуры во время экспоненциального роста, в противном случае начинаются гибель биологического материала и

снижение качества масс-спектров, что снижает точность идентификации. При удовлетворении этого условия такие факторы, как питательность среды и температура роста, в рамках физиологических требований данного вида не играют существенной роли. Помимо снижения качества спектров в некоторых случаях наблюдалось изменение состава пиков масс-спектра для разных сред и времен инкубации, что может повлиять на возможность дифференцировать исследуемые культуры на внутривидовом уровне, особенно для «родственных» штаммов, имеющих низкую филопротеомную дистанцию, но не оказывает существенное влияние на идентификацию до вида, так же, как не препятствует идентифика-



Таблица

Результаты идентификации и рейтинг точности идентификации  
для штаммов G1w1, 18(x) и 20, выращенных при различных условиях культивации

Штамм	Среда	Температура, °С	Время, ч	Результат идентификации	Рейтинг
18(x)	LB/5	65	9	Geobacillus stearothermophilus – 23	2,550
18(x)	LB/5	65	24	Geobacillus stearothermophilus – 23	2,378
18(x)	LB/5	65	48	Geobacillus stearothermophilus – 53	2,232
18(x)	LB	65	9	Geobacillus stearothermophilus – 44	2,564
18(x)	LB	65	24	Geobacillus stearothermophilus – 23	2,480
18(x)	LB	65	48	Geobacillus stearothermophilus – 17	2,520
18(x)	МПА	65	9	Geobacillus stearothermophilus – 44	2,529
18(x)	МПА	65	24	Geobacillus stearothermophilus – 17	2,285
18(x)	LB	60	ночь	Geobacillus stearothermophilus – 53	2,432
18(x)	LB	65	ночь	Geobacillus stearothermophilus – 23	2,494
18(x)	LB	70	ночь	Geobacillus stearothermophilus – 44	2,484
20	LB/5	65	9	Geobacillus stearothermophilus – 44	2,443
20	LB/5	65	24	Geobacillus stearothermophilus – 47	2,458
20	LB/5	65	48	Geobacillus stearothermophilus – 22	2,129
20	LB	65	9	Geobacillus stearothermophilus – 44	2,403
20	LB	65	24	Geobacillus stearothermophilus – 23	2,440
20	LB	65	48	Geobacillus stearothermophilus – 48	2,213
20	МПА	65	9	Geobacillus stearothermophilus – 47	2,489
20	МПА	65	24	Geobacillus stearothermophilus – 47	2,378
20	МПА	65	48	Нет достоверной идентификации	1,129
20	LB	60	ночь	Geobacillus stearothermophilus – 47	2,463
20	LB	65	ночь	Geobacillus stearothermophilus – 23	2,447
20	LB	70	ночь	Geobacillus stearothermophilus – 47	2,537
G1w1	LB/5	65	9	G1w1_65_LB	2,451
G1w1	LB/5	65	24	G1w1_65_LB	1,950
G1w1	LB/5	65	48	Нет достоверной идентификации	1,162
G1w1	LB	65	6	G1w1_65_LB	2,521
G1w1	LB	65	9	G1w1_65_LB	2,479
G1w1	LB	65	12	G1w1_65_LB	2,556
G1w1	LB	65	24	G1w1_65_LB	2,545
G1w1	LB	65	48	G1w1_65_LB	2,163
G1w1	LB	65	72	G1w1_65_LB	2,063
G1w1	МПА	65	9	G1w1_65_LB	2,465
G1w1	МПА	65	24	Geobacillus stearothermophilus – Gus2(3)	2,445
G1w1	МПА	65	48	Нет достоверной идентификации	1,438
G1w1	LB	60	ночь	G1w1_65_LB	2,492
G1w1	LB	65	ночь	G1w1_65_LB	2,619
G1w1	LB	70	ночь	G1w1_65_LB	2,510

ции штаммов с высокой филопротеомной дис-танцией. Минимизировать этот фактор также позволяет проведение анализа на начальной стадии роста. Как было показано при времени инкубации 9 ч, спектры для всех используемых сред были практически идентичны.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 14.512.11.0057 Министерства образования и науки Российской Федерации.

### ЛИТЕРАТУРА

- Böhme K., Fernández-No I.C., Pazos M. *et al.* Identification and classification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing versus MALDI-TOF MS fingerprinting // *Electrophoresis*. 2013. V. 34. No. 6. P. 877–887.
- Cripps R.E., Elay K., Leak D.J. *et al.* Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production // *Metab. Eng.* 2009. V. 11. No. 6. P. 398–408.
- Dickinson D.N., La Duc M.T., Satomi M. *et al.* MALDI-TOFMS compared with other polyphasic taxonomy approaches for the identification and classification of *Bacillus pumilus* spores // *J. Microbiol. Meth.* 2004. V. 58. No. 1. P. 1–12.
- Freiwald A., Sauer S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. No. 5. P. 732–742.
- Mellmann A., Cloud J., Maier T. *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria // *J. Clin. Microbiol.* 2008. V. 46. No. 6. P. 1946–54.
- Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B. *et al.* Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans* // *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. V. 51. No. 2. P. 433–446.
- Ruelle V., El Moulaj B., Zorzi W. *et al.* Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. in Mass Spectrometry: RCM*. 2004. V. 18. No. 18. P. 2013–9.
- Ryzhov V., Fenselau C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells // *Analyt. Chem.* 2001. V. 73. No. 4. P. 746–50.
- Valentine N., Wunschel D., Petersen C., Wahl K. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry // *Appl. Environmental Microbiol.* 2005. V. 71. No. 1. P. 58–64.

## REPRODUCIBILITY OF THE RESULTS OF MICROBE IDENTIFICATION BY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY DEPENDING ON GROWTH CONDITIONS BY THE EXAMPLE OF *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS*

K.V. Starostin, E.A. Demidov, A.S. Rozanov, A.V. Bryanskaya, S.E. Peltek

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: starostin@bionet.nsc.ru

### Summary

Rapid and accurate methods of microorganism identification are essential in various human activities. They include primarily clinical diagnostics. In addition, they are in demand in environment monitoring, pharmacology, food industry, research, etc. There are diverse approaches to microbe identification: phenotyping, genotyping, chemotaxonomy, direct protein profiling, etc. In this work, the effects of various growth conditions, such as temperature, growth time, and nutrition medium, on the reproducibility of microbe identification by MALDI-TOF mass spectrometry are considered by the example of three *Geobacillus stearothermophilus* strains.

**Key words:** MALDI, direct protein profiling, microorganism identification, *Geobacillus stearothermophilus*.