

Коллекция микроорганизмов ИЦиГ СО РАН как генетический ресурс для биотехнологии

А.В. Брянская¹✉, Ю.Е. Уварова¹, А.С. Розанов¹, Н.М. Слынько¹, В.Н. Шляхтун¹, К.В. Старостин¹, Е.А. Демидов¹,
Е.В. Лазарева², О.П. Таран³, С.Е. Пельтек¹

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

² Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

В создании новых биотехнологий важное значение имеют генетические знания о микроорганизмах, так как эффективность любых биотехнологий определяется особенностями структурно-функциональной организации молекулярно-генетических систем и их компонент, используемых для наработки целевых продуктов. При этом коллекции микробных культур играют решающую роль в мобилизации биологических ресурсов и позволяют сформировать прочную базу для генетических, молекулярно-биологических и биотехнологических исследований. Целью данной работы было проведение оценки ключевых молекулярно-генетических и фенотипических характеристик штаммов коллекции микроорганизмов, созданной в Федеральном исследовательском центре Институт цитологии и генетики (ФИЦ ИЦиГ) СО РАН, в качестве генетического ресурса для биотехнологии. Для 30 штаммов микроорганизмов коллекции, выделенных сотрудниками ИЦиГ из экстремальных природных экосистем, осуществлено описание ключевых молекулярно-генетических и фенотипических характеристик с использованием современных методов молекулярной биологии и масс-спектрометрии. Проведено выделение ДНК и секвенирование последовательностей генов 16S рРНК. Штаммы коллекции охарактеризованы по морфологическим, физиологическим, молекулярно-генетическим и масс-спектрометрическим характеристикам. Установлены особенности роста штаммов на разных средах, изучена морфология клеток. Штаммы протестированы на способность использовать различные субстраты. Установлены физиологические характеристики штаммов коллекции (отношение к кислороду, тип питания, диапазон температур и pH, отношение к NaCl и др.), различная устойчивость штаммов к антибиотикам. Определены хемотаксономические характеристики по составу жирных кислот штаммов коллекции. Проведено создание характеристичных масс-спектров белковых профилей исследованных штаммов коллекции. Получены и задепонированы в ГенБанке последовательности ДНК штаммов. Выполнена оценка биотехнологических свойств штаммов, определено содержание метаболитов (этанол, молочной и уксусной кислот) в культуральной жидкости. Ценность коллекции микроорганизмов ФИЦ ИЦиГ СО РАН как генетического ресурса для биотехнологии и биоинженерии определяется не только видовым разнообразием входящих в нее штаммов и широким ареалом их выделения, но и глубиной их характеристики с использованием максимально широкого арсенала как классических, так и современных методов, включая методы геномики, протеомики, транскриптомики и биоинформатики.

Ключевые слова: коллекция микроорганизмов; генетический ресурс; биотехнологии; штамм; молекулярно-генетические и фенотипические характеристики; экстремальные экосистемы.

Collection of microorganisms of ICG SB RAS as a genetic resource for biotechnology

A.V. Bryanskaya¹✉, Y.E. Uvarova¹, A.S. Rozanov¹,
N.M. Slynko¹, V.N. Shlyakhtun¹, K.V. Starostin¹,
E.A. Demidov¹, E.V. Lazareva², O.P. Taran³,
S.E. Peltek¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² V.S. Sobolev Institute of Geology and Mineralogy SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Borekov Institute of Catalysis SB RAS, Novosibirsk, Russia

Genetic knowledge of microorganisms plays a critical role in the creation of new biotechnologies, since the effectiveness of any biotechnology is determined by the particular qualities of the structurally functional organization of molecular-genetic systems and their components used for the production of targeted products. Collections of microbial cultures play a decisive role in mobilizing biological resources and make it possible to form a solid base for genetic, molecular biological and biotechnological research. The aim of this work was to assess the key molecular-genetic and phenotypic characteristics of strains of the collection of microorganisms created in the "FRC Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences" as a genetic resource for biotechnology. Thirty strains of microorganisms of the collection were isolated by employees of the FRC ICG SB RAS from extreme natural ecosystems, the key molecular-genetic and phenotypic characteristics were described using modern methods of molecular biology and mass-spectrometry. DNA isolation and the sequencing of 16S rRNA gene sequences were performed. The strains of the collection were characterized by morphological, physiological, molecular-genetic and mass-spectrometric characteristics. The particular qualities of growing of strains on different substrates have been established, the study of cell morphology has been carried out. The physiological characteristics of the strains of the collection have been established: the attitude to oxygen, the type of nutrition, the range of temperature and pH, the attitude to NaCl and others. Different resistance of strains to antibiotics has been established. The creation of personal mass spectra of protein profiles of the studied strains of the collection was carried out. The resulting DNA sequences of the strains are deposited in the GenBank. The chemotaxonomic characteristics

of strains have been determined. The biotechnological properties of the strains were assessed, the amount of metabolites (ethanol, lactic and acetic acids) in the culture liquid was determined. The value of the collection of microorganisms of the FRC ICG SB RAS as a genetic resource for biotechnology and bioengineering is determined not only by the species diversity of its strains, but also by a wide range of their area isolation and by the depth of their characterization using the widest arsenal of both classical and modern methods (including methods of genomics, proteomics, transcriptomics and bioinformatics).

Key words: collection of microorganisms; genetic resource; biotechnology; strain; molecular genetic and phenotypic characteristics; extreme ecosystems.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Брянская А.В., Уварова Ю.Е., Розанов А.С., Слынько Н.М., Шляхтун В.Н., Старостин К.В., Демидов Е.А., Лазарева Е.В., Таран О.П., Пельтек С.Е. Коллекция микроорганизмов ИЦиГ СО РАН как генетический ресурс для биотехнологии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):630-637. DOI 10.18699/VJ17.279

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Bryanskaya A.V., Uvarova Y.E., Rozanov A.S., Slynko N.M., Shlyakhtun V.N., Starostin K.V., Demidov E.A., Lazareva E.V., Taran O.P., Peltek S.E. Collection of microorganisms of ICG SB RAS as a genetic resource for biotechnology. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):630-637. DOI 10.18699/VJ17.279 (in Russian)

В создании новых биотехнологий критическую роль играют генетические знания о микроорганизмах, так как эффективность любых биотехнологий определяется особенностями структурно-функциональной организации молекулярно-генетических систем и их компонент, используемых для наработки целевых продуктов. Именно поэтому важнейшее значение имеет проведение широкомасштабных исследований и разработок в области генетических основ биотехнологических процессов в рамках комплексного подхода, использующего арсенал самых современных методов генетики, микробиологии, молекулярной биологии, генетической инженерии, геномики, протеомики, метаболомики и биоинформатики (Li et al., 2014; Scaife et al., 2015; Sun et al., 2015; Armengaud, 2016).

Огромное количество новых данных о микроорганизмах является ключом к исследованиям и разработкам в сфере биотехнологий (Elleuche et al., 2014; Pandhal, Noirel, 2014; Becker, Wittmann, 2016; Zammit, 2016). И именно в этом смысле коллекции микробных культур играют решающую роль в мобилизации биологических ресурсов. Коллекции служат хранилищем для штаммов, культур, геномов организмов, информации, касающейся наследственности и функций биологических систем, поставщиком безопасных и конфиденциальных услуг для хранения ключевых организмов для научных исследований и промышленности. Коллекции необходимы, чтобы сформировать прочную базу для генетических, молекулярно-биологических и биотехнологических исследований. Существующие ныне коллекции микроорганизмов со временем будут превращены в центры биологических ресурсов, с последующим объединением таких центров в глобальную сеть (www.oecd.org/dataoecd/55/48/2487422.pdf).

Коллекция микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии, исследования их генетики и метаболизма, созданная в Федеральном исследовательском центре Институт цитологии и генетики (ФИЦ ИЦиГ) СО РАН, является базой

для обеспечения биотехнологических разработок разнообразными источниками геномов и генов на основе: более 1 500 штаммов, культур микроорганизмов и образцов ДНК, значимых для науки и биотехнологии; представителей различных филогенетических (грибы, бактерии, археи) и физиологических групп (включая анаэробы и экстремофилы). Большинство штаммов коллекционного фонда выделено из ранее не изученных уникальных экстремальных экосистем: соленых озер, горячих источников, а также из почвы, морских акваторий, пресноводных водоемов, расположенных на территории Сибири и Дальнего Востока.

Повышенный интерес к проблеме экстремофильных микроорганизмов не случаен и обусловлен тем, что детальное изучение экстремофильных микроорганизмов на молекулярном уровне позволяет выявлять новые метаболические пути и особые механизмы адаптации к условиям, значительно отличающимся от обычных. С точки зрения практического использования экстремофилы являются богатейшим источником новых ферментов и метаболитов для промышленности, науки и медицины (Кевбрин, 2007). Ферментативные системы ряда микроорганизмов широко используются в настоящее время, но их потенциал раскрыт еще далеко не полностью.

Целью данной работы было проведение оценки ключевых молекулярно-генетических и фенотипических характеристик ряда штаммов коллекции микроорганизмов, созданной в ФИЦ ИЦиГ СО РАН в качестве генетического ресурса для биотехнологии. При этом выполнялись следующие задачи: 1) выделение ДНК и секвенирование последовательностей генов 16S рРНК; 2) оценка ключевых фенотипических характеристик штаммов; 3) оценка физиологических и хемотаксономических свойств штаммов; 4) оценка биотехнологических свойств штаммов.

Материалы и методы

Для описания ключевых молекулярно-генетических и фенотипических характеристик чистых культур микро-

организмов из коллекции ИЦиГ СО РАН было отобрано 30 штаммов. Исследованные штаммы были выделены из различных природных и природно-техногенных экстремальных экосистем Российской Федерации: из соленых озер Чано-Кулундинской области (Новосибирская область и Алтайский край), термального источника Сея (Баргузинская долина, Байкальская рифтовая зона), термопроявлений Долины гейзеров и кальдеры вулкана Узон Курило-Камчатского вулканического пояса, ореола рассеяния Урского хвостохранилища (Кемеровская область, пос. Урск) и гидроотвала Беловского цинкового завода (Кемеровская область, г. Белово), воды и ризосферы высших растений Новосибирского водохранилища.

Большинство точек отбора образцов для выделения штаммов отличалось экстремальными геохимическими условиями. Так, растворы озер Новосибирской области – нейтральные и слабощелочные ($6.5 < \text{pH} < 8.5$), характеризовались повышенной соленостью (12.3–26.7 г/л) либо относились к рассолам с минерализацией от 100 до 290 г/л (Bryanskaya et al., 2016). Растворы озер содержали также значительные концентрации В, Li, Sr, I (Лазарева и др., 2012). Воды термального источника Сея (Байкальская рифтовая зона) – щелочные (pH 9.8), горячие (49 °С), Na-F-HCO₃-SO₄ состава, характеризовались высоким содержанием аниогенных элементов в растворе (Lazareva et al., 2009; Лазарева и др., 2010). Микробное сообщество источника отличалось способностью концентрировать Ge, что делает объект привлекательным с точки зрения возможной биотехнологической добычи данного элемента. Физико-химические параметры термопроявлений Долины гейзеров и кальдеры вулкана Узон очень разнообразны по физико-химическим параметрам и составу, но их объединяет высокое содержание в растворах высокотоксичных элементов – Hg, As, Sb. Содержания эти столь высоки, что в пределах кальдеры Узон происходит формирование собственных минералов этих элементов в грифонах источников (Добрецов и др., 2015). Растворы Урского хвостохранилища относились к кислым дренажным (pH 1.9) и содержали повышенные концентрации Zn, Pb, Hg. Кроме того, в торфе ореола рассеяния установлено концентрирование Au и накопление Zn, Cu, Hg, Se, Ag, Pb (Saryg-ool et al., 2017). Микроорганизмы, способные выживать в таких экстремальных условиях, вероятно, обладают высокой степенью экстремофильности и являются перспективными для биотехнологических применений.

Среди исследованных штаммов наибольшее количество (14) выделено из воды и донных осадков соленых озер Новосибирской области. Из термальных источников Курило-Камчатского вулканического пояса получено 6 штаммов, из термальных источников Байкальской рифтовой зоны – 1 штамм, из соленых озер Алтайского края – 1 штамм, ореола рассеяния Урского хвостохранилища и Беловского цинкового завода – 7 штаммов, из ризосферы высших растений Новосибирского водохранилища – 1 штамм (Доп. материалы 1)¹. Штаммы выделены на среде Лурия–Бергана (LB) и мясо-пептонном агаре (МПА) при температурах 37 и 60 °С (Практикум..., 2005). Работы выполнены в ЦКП «Коллекция микроорганизмов биотехнологиче-

ского назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии».

Одним из ключевых признаков таксономической принадлежности (филогенетического положения) штаммов служила последовательность гена 16S рРНК. Для этого ДНК бактерий выделяли стандартным методом с использованием фенола (Маниатис и др., 1984). Амплификацию гена 16S рРНК проводили при помощи универсальных бактериальных праймеров 16S-8-f-B (5'-AGRGTGTTGATCCTGGCTCA-3') и 16S-1350-r-B (5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-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 проводилось в ЦКП «Геномика» СО РАН. Поиск сходных последовательностей в нуклеотидных базах данных выполняли 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>). Оценку морфологии клеток штаммов и установление факта спорообразования и размеров спор проводили на микроскопе Axioskop A1 (Karl Zeiss).

Для оценки способности штаммов утилизировать различные субстраты были использованы наборы МИКРОЛА-ТЕСТ (ERBA LACHEMA, Чехия).

Физиологические характеристики штаммов коллекции установлены согласно (Практикум..., 2005). Устойчивость штаммов к антибиотикам была исследована методом дисков (Практикум..., 2005). Концентрации хлорамфеникола и неомидина – 10 мг, пенициллина – 10 ЕД, эритромицина – 15 мг, канамицина – 30 мг.

Для хемотаксономической характеристики штаммов по составу жирных кислот пробоподготовку образцов и получение метиловых эфиров жирных кислот проводили по (Jenkins et al., 1977; Schaffer et al., 2004) щелочным гидролизом биоматериала с последующим подкислением, экстракцией жирных кислот гексаном и их метилированием системой HCl/CH₃OH. Анализ выполняли на хроматографе Agilent Technologies 6890N с кварцевой капиллярной колонкой DB-1 и квадрупольным масс-спектрометром Agilent Technologies 5973N. Метиловые эфиры жирных кислот определяли с использованием базы масс-спектров The NIST MassSpectral Library Version 2.0a, а также сравнением полученных значений RI со значениями из той же базы. Значения RI определяли и рассчитывали, исходя из времен выхода пиков по (Dool, Kratz, 1963) с использованием данных анализа смеси гомологичных линейных алканов.

Для создания характеристичных масс-спектров для каждого штамма отбирали двенадцать проб бактериальной культуры. Пробу, содержащую примерно 10 мг культуры, ресуспендировали в 300 мкл деионизированной воды и инактивировали 900 мкл перегнанного этанола. После центрифугирования (2 мин, 15 600 г) удаляли супернатант и высушивали осадок. Осадок ресуспендировали в 50 мкл 70 % муравьиной кислоты. К суспензии добавляли 50 мкл ацетонитрила, полученную смесь тщательно перемешивали и центрифугировали 2 мин при 15 600 г. Для анализа ис-

¹ Дополнительные материалы 1 и 2 см. в Приложении по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2017-21/appx9.pdf>

пользовали супернатант. Пробу объемом 0.8 мкл наносили на масс-спектрометрическую мишень, после высыхания на нее наслаивали 0.8 мкл матрицы (6 мг/мл α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в 50 % ацетонитриле и 2.5 % муравьиной кислоты). Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Ultraflex III TOF/TOF стандартным методом для биотипирования. Внешнюю калибровку проводили по белковому экстракту *Escherichia coli*. Для каждой из двенадцати проб снимали по три масс-спектра. Полученные серии по 36 спектров использовали для генерации характеристичных масс-спектров в программе Biotyper 3. Характеристичные масс-спектры анализировали с помощью кластерного анализа.

Для оценки биотехнологических свойств штаммов определяли содержание в культуральной жидкости метаболитов – целевых продуктов (этанол, молочная кислота, уксусная кислота). Для количественного измерения метаболитов в культуральной жидкости был использован метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. Исследование образцов осуществляли на газожидкостном хроматографе Agilent Technologies 6890N с квадрупольным масс-спектрометром Agilent Technologies 5973N. 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. Концентрацию этилового спирта, молочной и уксусной кислот находили сравнением площадей пиков экспериментальных образцов с калибровочными растворами.

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности с соблюдением условий стерильности.

Результаты

Филогенетическое положение исследованных штаммов. Из коллекции ИЦиГ СО РАН было отобрано 30 штаммов, выделенных из различных экосистем и регионов РФ, с целью определения и описания их молекулярно-генетических и фенотипических характеристик. Исследованные штаммы относились к двум родам: *Bacillus* и *Anoxybacillus* (см. Доп. материалы 1).

Особенности роста штаммов. Установлено, что большинство штаммов при росте на твердых средах образуют небольшие круглые колонии белого, молочного, грязно-белого или желтого цвета. Диаметр колоний варьировал от точечных (менее 1 мм) до 8 мм. Поверхность и профиль колоний менялись от гладких блестящих выпуклых до плоских шероховатых, с волнистым краем. Рост по штриху у штаммов варьировал от не расплывающегося до сильно расплывающегося, от четковидного до сплошного. Для многих штаммов установлено пигментообразование.

Морфология клеток. Все штаммы были представлены палочковидными клетками различной длины. Спорообразование установлено для большинства штаммов (рис. 1).

Оценка способности штаммов к утилизации различных субстратов. Все исследованные штаммы были протестированы на способность использовать различные субстраты (Доп. материалы 2). Установлено, что 16 штаммов обладали β -галактозидазной активностью.

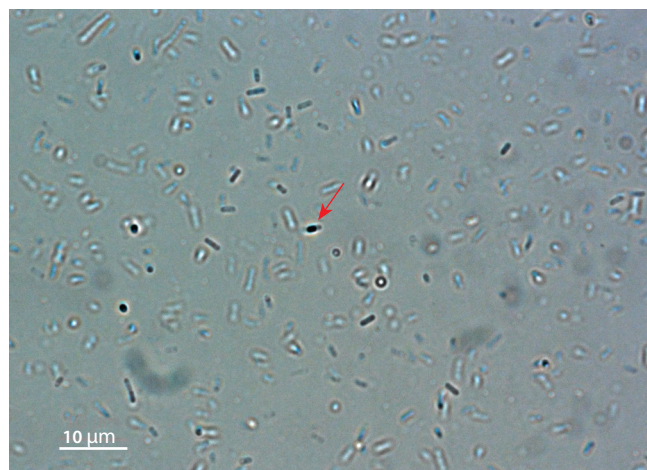


Fig. 1. Morphology of vegetative cells and spores of strain 47(11)il. The arrow points to a cell with a spore.

Все штаммы не использовали малонат, цитрат, орнитин и серосодержащие соединения. Все штаммы, кроме одного (штамм 4U), не использовали лизин. Только три штамма обладали уреазной активностью. Все штаммы не проявляли β -глюкоронидазной активности. Штаммы по-разному использовали маннитол, трегалозу и лактозу, целлобиозу, аргинин, мелибиозу, сорбитол, салицин, раффинозу, инозитол, арабитол, адонитол, дульцит. Шесть штаммов имели β -ксилозидазную активность. Таким образом, исследованные штаммы значительно отличались по своим биохимическим характеристикам.

Физиологические характеристики. Все отобранные штаммы являлись аэробами и/или факультативными анаэробами. По типу питания штаммы относились к гетеротрофам, хемоорганогетеротрофам. Преимущественное большинство штаммов хорошо росло на средах с казеином, крахмалом и твином в качестве единственного источника углерода. Большинство штаммов обладало выраженной казеиназной активностью и хорошей амилолитической активностью. При реакции с йодом помимо обычного обесцвечивания в ряде случаев наблюдалось покраснение среды вокруг колоний, свидетельствующее об образовании декстринов.

Диапазон температур для роста термофильных микроорганизмов составлял 40–70 °С с оптимумом при 60 °С, мезофильных микроорганизмов – 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.

Устойчивость к антибиотикам. В целом штаммы оказались наиболее устойчивы к пенициллину. Меньшие зоны подавления роста отмечены также для хлорамфеникола. Несмотря на то что эритромицин и канамицин были использованы в больших концентрациях, чем неомицин и хлорамфеникол, в ряде случаев диаметры зон отсутствия роста не отличались.

Хемотаксономическая характеристика штаммов. У всех исследованных штаммов практически отсутствовали ненасыщенные жирные кислоты. Все обнаруженные

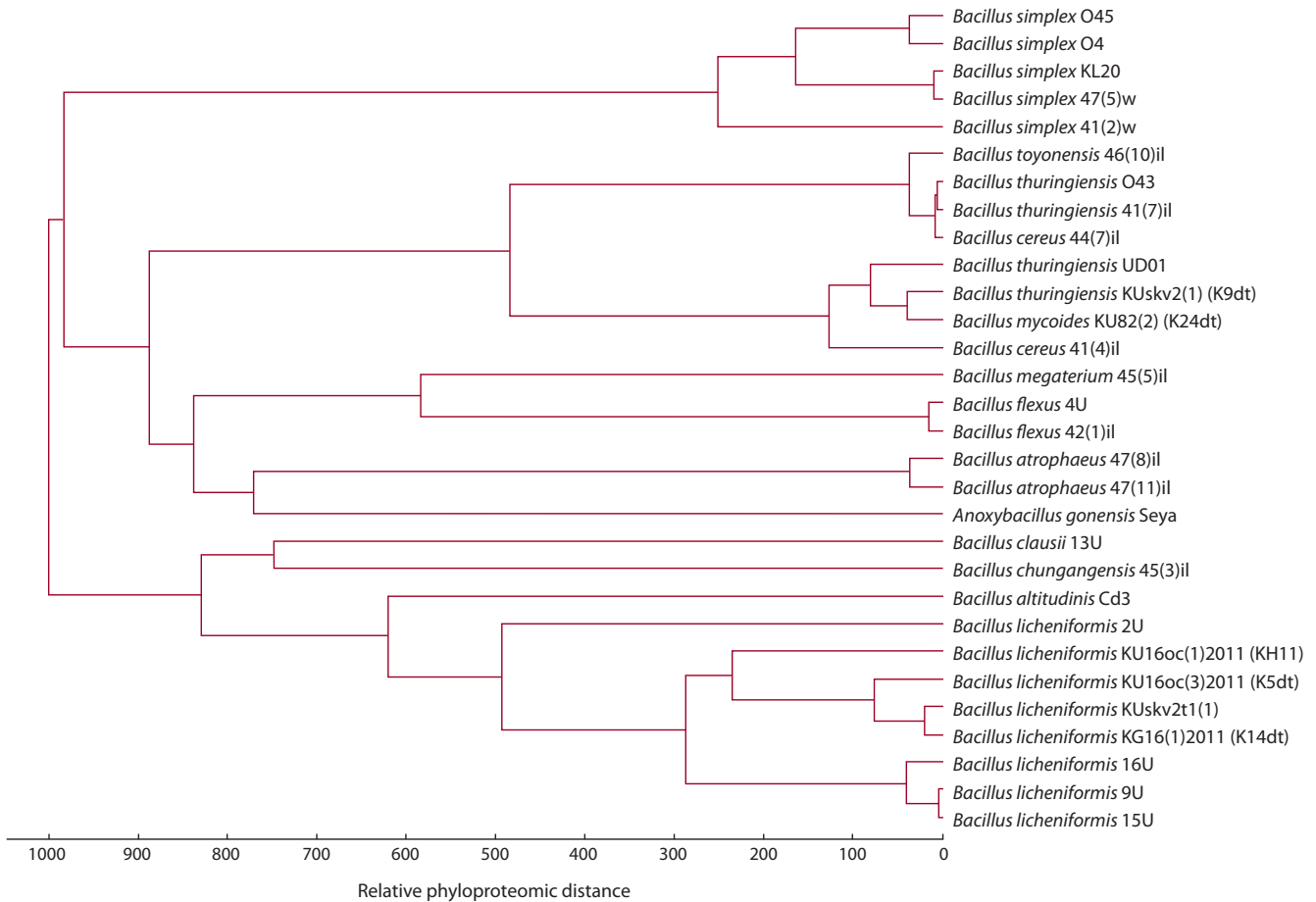


Fig. 2. Phyloproteomic tree constructed with Biotyper 3 for characteristic mass spectra of strains studied.

Ethanol contents in the culture liquid of strains studied

Taxon	Strain identifier	Ethanol content, %
<i>A. gonensis</i>	Seya	0.000875
<i>B. chungangensis</i>	45(3)il	0.013125
<i>B. megaterium</i>	45(5)il	0

кислоты содержали от 14 до 18 атомов углерода. За исключением штаммов Seya, 41(4)il, 13U и 46(10)il, у штаммов преобладали жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода. Штаммы Seya, 41(4)il и 13U характеризовались равным или повышенным содержанием жирных кислот с линейным строением, в остальных доминировали кислоты с разветвленным строением. Штамм 45(3)il практически не содержал линейных жирных кислот. Это является видовой характеристикой, что подтверждает сравнение с результатами, полученными (Cho et al., 2010). Наиболее представленные в коллекции виды – *B. licheniformis*, *B. thuringiensis* и *B. simplex* – обладали сходными значениями соотношений нормальных/разветвленных и четных/нечетных кислот.

Хемотаксономическая характеристика по масс-спектрам белковых профилей проводилась с помощью клас-

терного анализа филопротеомных данных (рис. 2). Результаты кластеризации находились в соответствии с таксономической принадлежностью штаммов. Полученные характеристичные масс-спектры внесены в базу данных (<http://www.bionet.nsc.ru/mb1/database/database.html>) и могут быть использованы для идентификации микроорганизмов.

Оценка способности исследуемых штаммов к наработке целевых продуктов. Для ряда штаммов коллекции было определено содержание метаболитов в культуральной жидкости. Измеряли содержание следующих целевых продуктов: этанола, молочной кислоты, уксусной кислоты. Наличие молочной и уксусной кислот в культуральной жидкости исследованных штаммов не установлено. Содержание этанола составило от 0 до 0.01 %, что свидетельствует об отсутствии способности исследованных штаммов продуцировать искомые целевые продукты (см. таблицу).

Предварительные результаты, полученные для других 40 штаммов коллекции ИЦиГ СО РАН, относившихся к родам *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Bacillus* и *Aeribacillus*, показали, что большинство штаммов способно к наработке молочной кислоты. Более того, для ряда штаммов количество нарабатываемой молочной кислоты в условиях периодического культивирования достигало 1.29 г/л. Эти штаммы нарабатывали также этанол в количестве от 0.01

до 0.05 %. Кроме того, выявлен штамм рода *Anoxybacillus*, вырабатывающий на порядок больше этанола, чем другие культуры, – 0.2 %.

Последовательности ДНК исследованных микроорганизмов коллекции были депонированы в GenBank с присвоением им номеров KY323316–KY323345.

Обсуждение

Для 30 штаммов микроорганизмов коллекции ФИЦ ИЦиГ СО РАН, выделенных из экстремальных мест обитания, сделано описание ключевых молекулярно-генетических и фенотипических характеристик. Свойства, выявленные у штаммов, соответствовали их филогенетическому положению в семействе Bacillaceae (Slepecky, Nemphill, 2006; Logan, Vos, 2015). Бактерии родов *Bacillus* и *Anoxybacillus* широко распространены в природе и могут быть выделены практически из любого местообитания при культивировании на различных средах, при разных температурах, концентрации ионов водорода и др. (Slepecky, Nemphill, 2006). Клетки *Bacillus* могут составлять значительную долю общей численности гетеротрофной микрофлоры различных местообитаний (Logan, Vos, 2015), также они являются одной из доминирующих групп в культивируемых гетеротрофных микробных сообществах, например оз. Байкал (Сулова, 2007).

Род *Bacillus* – одна из наиболее разнообразных и коммерчески полезных групп микроорганизмов. Способность некоторых штаммов выдерживать высокие или низкие температуры и высокие или низкие значения pH сделала их важными источниками получения коммерческих препаратов ферментов. При развитии на простых сахарах, в особенности на глюкозе, они способны синтезировать ряд продуктов – молочную, уксусную и пропионовую кислоты, ацетилметилкарбинол и т. п., что делает их перспективными объектами для биотехнологии (Slepecky, Nemphill, 2006). В настоящее время штаммы *Bacillus* используются для получения продуктов четырех типов: ферментов; антибиотиков; высокоочищенных биопрепаратов, включая усилители запаха и пищевые добавки; инсектицидов (Priest, 1993).

Для массового скрининга больших коллекций микроорганизмов, в том числе близкородственных видов, в качестве точного, надежного, а главное, очень простого и быстрого инструмента зарекомендовала себя МАЛДИ времяпролетная масс-спектрометрия (Ruelle et al., 2004). Однако для эффективной работы этого метода необходима репрезентативная база данных, состоящая из характеристичных масс-спектров. Для тридцати штаммов, представленных в настоящей работе, одновременно с получением последовательностей гена 16S рРНК были получены характеристичные масс-спектры. Результаты филопротеомного анализа, представленные в виде дендрограммы (см. рис. 2), находились в соответствии с результатами молекулярно-генетического анализа (см. Доп. материалы 1). Группы штаммов, относящиеся к видам *B. simplex* и *B. licheniformis*, образовали на дендрограмме отдельные ветви. Третья крупная ветвь сформирована представителями так называемой *Bacillus cereus* group, состоящей из таких видов, как *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* и др. Виды, относящиеся к этой группе, имеют

высокую филогенетическую идентичность, что затрудняет их достоверную идентификацию на внутрigrupповом уровне с помощью стандартных методов, таких как секвенирование гена 16S рРНК, ДНК-ДНК гибридизация и др. (Rasko et al., 2005). Несмотря на то что в ряде работ продемонстрирована более высокая точность идентификации с помощью МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии по сравнению с секвенированием гена 16S рРНК (Rasko et al., 2005), надежная идентификация представителей *Bacillus cereus* group используемым методом требует наличия обширной и репрезентативной базы данных и продвинутого математического метода анализа (Lasch et al., 2009). Таким образом, необходимо дальнейшее пополнение базы данных, созданной в ФИЦ ИЦиГ СО РАН (Starostin et al., 2015), как представителями обнаруженной группы микроорганизмов, так и другими таксонами, что позволит создать эффективный инструмент для быстрой и точной идентификации больших коллекций микроорганизмов, а также дифференциации микроорганизмов на внутрigrupповом и внутривидовом уровне.

В настоящей работе были оценены биотехнологические свойства штаммов коллекции, определено содержание метаболитов (этанола, молочной и уксусной кислот) в культуральной жидкости. Продукция этанола и молочной кислоты некоторыми штаммами показала высокий выход продуктов и потенциальную перспективность использования данных штаммов в биотехнологических процессах, что подтверждает долговую и выдающуюся историю рода *Bacillus* в области биотехнологии (Priest, 1993).

Кроме того, для штаммов коллекции ФИЦ ИЦиГ СО РАН проводится полноценное секвенирование и процедура биотипирования на основании данных MALDI-TOF масс-спектрометрии (Bryanskaya et al., 2014; Starostin et al., 2015; Rozanov et al., 2017), а также скрининг штаммов для выявления возможности их трансформации. Выполняется поиск мобильных элементов и плазмид, пригодных для создания систем введения экзогенной ДНК в геном микроорганизма; изучение системы рестрикции–модификации выбранных микроорганизмов; создание челночных векторов (Rozanov et al., 2014). На основании этих исследований осуществляется оценка перспективности использования штаммов в биотехнологии и разрабатываются научно-практические рекомендации по их применению; создается база данных о свойствах выделенных штаммов.

Таким образом, в рамках нашей работы осуществлена оценка ключевых молекулярно-генетических и фенотипических характеристик ряда штаммов коллекции, созданной в ФИЦ ИЦиГ СО РАН, в соответствии с самыми современными требованиями к генетической коллекции микроорганизмов для разработки биотехнологий. Ядром коллекции являются культуры, выделенные из уникальных экстремальных экосистем. Выделение биотехнологически перспективных микроорганизмов, способных к продукции целевых соединений в условиях высокой солености, щелочности, температуры, проведено классическими микробиологическими методами. В результате получены оригинальные штаммы микроорганизмов. Характеристика штаммов коллекции проводится современными методами молекулярной биологии, геномики, протеомики и масс-спектрометрии.

Ценность коллекции микроорганизмов ФИЦ ИЦиГ СО РАН как генетического ресурса для биотехнологии определяется не только видовым разнообразием входящих в нее штаммов и ареалом их выделения, но и глубиной их характеристики с использованием максимально широкого арсенала как классических, так и современных методов.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the Administration of Novosibirsk oblast, project 17-44-540815, and by the program of the development of bioresource collections, Federal Agency for Scientific Organizations, project 0324-2017-0003. Analyses of the environment of the organisms were conducted at the Shared Access Center for Multielement and Isotopic Studies, Siberian Branch of the RAS.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Armengaud J. Next-generation proteomics faces new challenges in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016;38:174-182. DOI 10.1016/j.copbio.2016.02.025.
- Becker J., Wittmann C. Industrial microorganisms: *Corynebacterium glutamicum*. Industrial Biotechnology: Microorganisms. C. Wittmann, J.C. Liao (Eds.). Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2016;183-220. DOI 10.1002/9783527807796.ch6.
- Bryanskaya A.V., Rozanov A.S., Logacheva M.D., Kotenko A.V., Peltek S.E. Draft genome sequence of *Geobacillus icigianus* strain G1w1T isolated from hot springs in the Valley of Geysers, Kamchatka (Russian Federation). *Genome Announc.* 2014;2(5):e01098-14. DOI 10.1128/genomeA.01098-14.
- Bryanskaya A.V., Malup T.K., Lazareva E.V., Taran O.P., Rozanov A.S., Efimov V.M., Peltek S.E. The role of environmental factors for the composition of microbial communities of saline lakes in the Novosibirsk region (Russia). *BMC Microbiology.* 2016;16(1):S4. DOI 10.1186/s12866-015-0618-y.
- Cho S., Jung M.Y., Park M.H., Kim W. *Bacillus chungangensis* sp. nov., a halophilic species isolated from sea sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010;60:1349-1352. DOI 10.1099/ijs.0.013607-0.
- Dobretsov N.L., Lazareva E.V., Zhmodik S.M., Bryanskaya A.V., Morozova V.V., Tikunova N.V., Peltek S.E., Karpov G.A., Taran O.P., Ogorodnikova O.L., Kirichenko I.S., Rozanov A.S., Babkin I.V., Shuvaeva O.V., Chebykin E.P. Geological, hydrogeochemical, and microbiological characteristics of the oil site of the Uzon caldera (Kamchatka). *Russian Geology and Geophysics.* 2015;56(1-2):39-63. DOI 10.15372/GiG20150103.
- Dool D., Kratz P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1963;11:463-471. DOI 10.1016/S0021-9673(01)80947-X.
- Elleuche S., Schröder C., Sahn K., Antranikian G. Extremozymes – biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014;29:116-123. DOI 10.1016/j.copbio.2014.04.003.
- Jenkins C.L., Kuhn D.A., Daly K.R. Fatty acid composition of *Simonisella* strains. *Arch. Microbiol.* 1977;113:209-213. DOI 10.1007/BF00492027.
- Kevbrin V.V. Termofilnye alkalofilnye mikroorganizmy [Thermophilic alkaliphilic microorganisms]. *Trudy Instituta mikrobiologii im. S.N. Vinogradskogo* [Proceedings of the Vinogradskiy Institute of Microbiology]. Moscow: Nauka Publ., 2007;374-395. (in Russian)
- Lasch P., Beyer W., Nattermann H., Stämmle M., Siegbrecht E., Grunow R., Naumann D. Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75(22):7229-7242. DOI 10.1128/AEM.00857-09.
- Lazareva E.V., Bryanskaya A.V., Taran O.P., Kolmogorov Yu.P., Malup T.K., Peltek S.E., Zhmodik S.M. Investigation of the distribution of elements among the components of a salt lake system by the XFEA-SR method. *Poverkhnost. Rentgenovskie, sinkhrotronnye i neytronnye issledovaniya = Surface: X-ray, Synchrotron and Neutron Studies.* 2012;12:70-80. DOI 10.1134/S1027451012120051. (in Russian)
- Lazareva E.V., Bryanskaya A.V., Zhmodik S.M., Kolmogorov Y.P., Pestunova O.P., Barkhutova D.D., Zolotarev K.V., Shaporenko A.D. Elements redistribution between organic and mineral parts of microbial mats: SRXFA research (Baikal Rift Zone). *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.* 2009;603:137-140. DOI 10.1016/j.nima.2008.12.178.
- Lazareva E.V., Bryanskaya A.V., Zhmodik S.M., Smirnov S.Z., Pestunova O.P., Barkhutova D.D., Polyakova E.V. Mineralization in cyano-bacterial mats of alkaline hydrotherms of the Barguzin basin of the Baikal rift zone. *Doklady RAN = Proceedings of the Russian Academy of Sciences.* 2010;430(5):675-680. DOI 10.1134/S1028334X10020169. (in Russian)
- Li L., Degardin M., Lavergne T., Malyshev D.A., Dhimi K., Ordoukhanian P., Romesberg F.E. Natural-like replication of an unnatural base pair for the expansion of the genetic alphabet and biotechnology applications. *J. Am. Chem. Soc.* 2014;136(3):826-829. DOI 10.1021/ja408814g.
- Logan N.A., Vos P.D. *Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* 2015. DOI 10.1002/9781118960608.gbm00530.
- Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoe klonirovanie* [Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning]. Moscow: Mir Publ., 1984. (in Russian)
- Pandhal J., Noirel J. Synthetic microbial ecosystems for biotechnology. *Biotechnol. Lett.* 2014;36(6):1141-1151. DOI 10.1007/s10529-014-1480-y.
- Praktikum po mikrobiologii. Pod red. A.I. Netrusova [A.I. Netrusov (Ed.) Practical course on microbiology]. Moscow: Akademiya Publ., 2005. (in Russian)
- Priest F.G. Systematics and ecology of *Bacillus*. In: A. Sonenshein, J.A. Hoch, R. Losick (Eds.). *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria. Washington, DC: ASM Press, 1993;3-16. DOI 10.1128/9781555818388.ch1.
- Rasko D.A., Altherr M.R., Han C.S., Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005;29(2):303-329. DOI 10.1016/j.femsre.2004.12.005.
- Rozanov A.S., Ivanisenko T.V., Bryanskaya A.V., Shekhovtsov S.V., Logacheva M.D., Saik O.V., Malup T.K., Demenkov P.S., Goryachkovskaya T.N., Ivanisenko V.A., Peltek S.E. Bioinformatics analysis of the genome of *Geobacillus stearothermophilus* 22 Strain isolated from the Garga hot spring, Baikal Region. *Russ. J. Genetics: Appl. Res.* 2014;4(4):267-272. DOI 10.1134/S207905971404011X.
- Rozanov A.S., Bryanskaya A.V., Kotenko A.V., Peltek S.E. Draft genome sequence of *Thermoactinomyces* sp. Gus2-1 isolated from the hot-spring Gusikha in Barguzin Valley (Baikal Rift Zone, Russia). *Genomics Data.* 2017;11:1-2. DOI 10.1016/j.gdata.2016.11.014.
- Ruelle V., Moulaj B.E., Zorzi W., Ledent P., Pauw E.D. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004;18:18:2013-2019. DOI 10.1002/rcm.1584.
- Saryg-ool B.Yu., Myagkaya I.N., Kirichenko I.S., Gustaytis M.A., Shuvaeva O.V., Zhmodik S.M., Lazareva E.V. Redistribution of elements between wastes and organic-bearing material in the dispersion train of gold-bearing sulfide tailings: Pt. I. Geochemistry and Mine-

- ralogy. *Sci. Total Environ.* 2017;581-582:460-471. DOI 10.1016/j.scitotenv.2016.12.154.
- Scaife M.A., Nguyen G.T.D.T., Rico J., Lambert D., Helliwell K.E., Smith A.G. Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. *Plant J.* 2015;82(3):532-546. DOI 10.1111/tbj.12781.
- Schaffer C., Franck W.L., Scheberl A., Kosma P., McDermott T.R., Messner P. Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004;54:2361-2368. DOI 10.1099/ijs.0.63227-0.
- Slepecky R.A., Hemphill H.E. The genus *Bacillus* – nonmedical. *Prokaryotes.* 2006;4:530-562. DOI 10.1007/0-387-30744-3_16.
- Starostin K.V., Demidov E.A., Bryanskaya A.V., Efimov V.M., Rozanov A.S., Peltek S.E. Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Sci. Rep.* 2015;5:16989. DOI 10.1038/srep16989.
- Sun Z., Harris H.M.B., McCann A., Guo C., Argimón S., Zhang W., Yang X., Jeffery I.B., Cooney J.C., Kagawa T.F., Liu W., Song Y., Salvetti E., Wrobel A., Rasinkangas P., Parkhill J., Rea M.C., O'Sullivan O., Ritari J., Douillard F.P., Ross R.P., Yang R., Briner A.E., Felis G.E., Vos W.M., Barrangou R., Klaenhammer T.R., Caufield P.W., Cui Y., Zhang H., O'Toole P.W. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat. Commun.* 2015;6:8322. DOI 10.1038/ncomms9322.
- Suslova M.Yu. Rasprostranenie i raznoobrazie sporoobrazuyushchikh bakteriy roda *Bacillus* v vodnykh ekosistemakh [Distribution and diversity of spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* in aquatic ecosystems]. Irkutsk: Novoe Delo Publ., 2007;14-36. (in Russian)
- Zammit G. A culture collection of Maltese microorganisms for application in biotechnology, biomedicine and industry. *Xjenza Online = J. Malta Chamber of Sci.* 2016;4:86-89. DOI 10.7423/XJENZA.2016.1.12.