



УДК 579.68.8

О. М. Онищенко, к.б.н., н.с., **Е. А. Киприанова**, д.б.н., в.н.с., **Л. В. Ярошенко**, вед. инж.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного Национальной академии наук Украины,
Киев, Украина

ПСИХРОФИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ РОДОВ *ALTEROMONAS* И *PSYCHROBACTER*, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ВОДЫ ЧЁРНОГО МОРЯ

На основании данных фенотипического анализа и частичного сиквенса гена 16S рРНК 7 штаммов галофильных морских бактерий, выделенных из воды Чёрного моря, были отнесены к экстремофильным антарктическим видам *Psychrobacter glacincola* (4 штамма) и *Alteromonas stellipolaris* (3 штамма). Будучи в целом сходными по своим свойствам с антарктическими изолятами, черноморские штаммы отличались от них способностью к росту при более высоких температурах, устойчивостью к более низким концентрациям NaCl и ассимиляцией некоторых источников углеродного питания.

Ключевые слова: *Alteromonas*, *Psychrobacter*, психрофильные микроорганизмы, галофильные бактерии, Чёрное море

На протяжении последних десятилетий микробиота Антарктики была предметом интенсивных микробиологических исследований. Широкий спектр населяющих Антарктиду α -, β - и γ -подклассов протеобактерий является потенциальным источником выделения экстремофильных форм микроорганизмов, интересных для систематиков и экологов, перспективных для биотехнологии. В пробах антарктических почв, льда, морской воды различными авторами были найдены как виды – «универсалы», широко распространённые по всей территории нашей планеты (например, *Pseudomonas fluorescens* или *P. putida* [1]), так и представители новых таксонов – специфических обитателей этого континента [10].

В 2001 – 2005 гг. из воды и водорослей Чёрного моря нами выделены и охарактеризованы галофильные морские микроорганизмы родов *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Oceanimonas*, *Shewanella* и *Psychrobacter* [2, 3, 4, 8, 9]. В ходе этих исследований было установлено, что 7 черноморских изолятов генетически близки экстремо-

фильным антарктическим видам – представителям психробактеров и альтеромонад. Целью настоящей работы был детальный таксономический анализ этих бактерий.

Материал и методы. Исследуемые штаммы бактерий были выделены из проб морской воды, собранных в 2000 – 2005 г. в акватории Карадагского природного заповедника по описанной ранее методике [5].

У выделенных культур общепринятыми методами [6] исследовали: окраску по Граму, подвижность, способность к окислению либо ферментации глюкозы (на среде Хью и Ливсона, модифицированной для морских организмов), рост при различных температурах, наличие диметилпарафенилендиаминоксидазы, аргининдигидролазы, лизин- и орнитиндекарбоксилазы, амилазную, желатиназную и липазную активность, способность к денитрификации и восстановлению нитратов до нитритов, потребность в ионах натрия для роста и толерантность к различным концентрациям NaCl, спектры потребляемых источников углерода.

Для проведения электронно-микроскопических исследований препараты контрастировали 2 % раствором фосфорновольфрамовой кислоты и изучали в электронном микроскопе ЕМВ-100 БР при инструментальном увеличении $\times 15 - 20$ тыс.

Исследование бактериальных геномов выполняли с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР-амплификации) и последующим секвенированием участка гена 16S рРНК согласно методике, изложенной ранее [3].

Результаты и обсуждение. В результате ПЦР-амплификации и последующего секвенирования для четырёх черноморских изолятов были установлены последовательности участков гена 16S р РНК с длиной от 448 до 456 нуклеотидов (табл. 1).

Табл. 1 Данные частичного сиквенса гена 16S рРНК бактерий рода *Psychrobacter*, выделенных из воды Чёрного моря

Table 1 Data of 16S rRNA partial sequence of *Psychrobacter* genus bacteria isolated from the Black Sea water

Название вида и номер штамма в Генбанке	Номера исследуемых штаммов в УКМ*	Сходство с последовательностями 16S рРНК референтного штамма, %	Количество нуклеотидов идентичного фрагмента 16S рРНК
<i>Psychrobacter glacincola</i> U 85876	В-11099	98	452
	В-11100	98	456
	В-11101	98	448
	В-11102	97	450

* Украинская Коллекция Микроорганизмов

Все они оказались наиболее сходными с последовательностями 16S рРНК антарктического вида *Psychrobacter glacincola* (Bowman, 1997), ранее выделенного из льдов восточной Антарктики (ледяной шельф Эмери, 69° ю.ш. – 78° в.д. с глубины 350 м [7].

По своим фенотипическим свойствам исследуемые микроорганизмы соответствуют диагнозу рода *Psychrobacter*: это – аэробные, грамотрицательные неподвижные, неспорообразующие коккобациллы. Подобно всем описанным до настоящего времени представителям рода, исследованные нами бактерии были оксидазоположительными, не имели аргининдигидролазы, орнитин- и лизин-декарбоксилазы, не требовали дополнительных факторов роста, хорошо росли на простых минеральных средах и усваивали бутират, аспарагин, глютамат и пролин в качестве единственного источника углерода и энергии.

Результаты сравнительного анализа последовательностей 16S рРНК остальных трёх изолятов подтвердили их принадлежность к роду *Alteromonas* и показали 99 – 100 % иден-

тичности с геном типового штамма *Alteromonas stellipolaris* (Van Trappen, 2004) (табл.2).

A. stellipolaris описан в 2004 г. для 7 штаммов олиготрофных психротолерантных бактерий, изолированных методами обогащения из антарктических проб морской воды. Отличительной особенностью этих микроорганизмов является способность к образованию ветвящихся почек и протек при низких температурах [11].

Черноморские изоляты названного вида представляют собой грамотрицательные беспигментные оксидазопозитивные палочки с дыхательным типом метаболизма, подвижные с помощью одного жгутика, не имеющие аргинин-, лизин- и орнитиндекарбоксилазы, неспособные к денитрификации (один штамм восстанавливал нитраты до нитритов). Всем трём изолятам была свойственна агарлитическая активность – свойство, не упомянутое в диагнозе антарктического вида. Бактерии усваивали в качестве единственного источника углеродного питания широкий спектр субстратов, включая углеводы, органические кислоты, некоторые полиспирты, аминокислоты.

Табл. 2 Данные частичного сиквенса гена 16S рРНК бактерий рода *Alteromonas*, выделенных из воды Чёрного моря

Table 2 Data of 16S rRNA partial sequence of *Alteromonas* genus bacteria isolated from the Black Sea water

Название вида и номер штамма в Генбанке	Номера исследуемых штаммов в УКМ	Сходство с последовательностями 16S рРНК референтного штамма, %	Количество нуклеотидов идентичного фрагмента 16S рРНК
<i>Alteromonas stellipolaris</i>	В-11103	99	428
	В-11104	99	428
AY831615.1	В-11105	100	428

Как антарктические, так и черноморские представители *A. stellipolaris* и *P. glacincola*, являются галофильными микроорганизмами и требуют для роста присутствия в среде ионов Na⁺. Однако антарктические *P. glacincola*

la выдерживают до 15 % NaCl в среде, для черноморских изолятов этого вида максимально переносимой является в три раза меньшая концентрация. Менее устойчивы к NaCl и черноморские штаммы *A. stellipolaris* (табл. 3).

Табл. 3 Некоторые свойства штаммов *Psychrobacter glacincola* и *Alteromonas stellipolaris*, выделенных из воды Чёрного моря

Table 3 Some characteristics of *Psychrobacter glacincola* and *Alteromonas stellipolaris* strains isolated from the Black Sea water

Характеристики	Штаммы <i>P. glacincola</i> , №№				Штаммы <i>A. stellipolaris</i> , №№		
	В-11102	В-11101	В-11099	В-11100	В-11103	В-11104	В-11105
Потребность в ионах Na ⁺	+	+	+	+	+	+	+
Устойчивость к NaCl, %							
2,5	+	+	+	+	+	+	+
5,0	+	+	+	+	+	+	+
10,0	-	+	-	+	-	-	-
15,0	-	-	-	-	-	-	-
Рост при 5°C	+	+	+	+	+	+	+
10°C	+	+	+	+	+	+	+
25°C	+	+	+	+	+	+	+
37°C	-	-	-	-	+	+	+
42°C	-	-	-	-	-	-	-

По-видимому, эти особенности обусловлены отличиями в уровнях солёности океанской воды, омывающей Антарктиду, и воды Чёрного моря.

Набор потребляемых изучаемыми штаммами источников углерода достаточно широк. При этом, несмотря на значительное сходство спектров углеродного питания с таковыми у соответствующих антарктических видов, между ними наблюдаются и некоторые различия. Они касаются например, способности черноморских *P. glacincola* усваивать углеводы (глюкозу, сахарозу, трегалозу, целлобио-

зу, фруктозу), недоступные для антарктического вида.

Обращает на себя внимание отношение изучаемых культур к температуре. Все они – психротрофы, причем как антарктические, так и черноморские изоляты *A. stellipolaris* растут в одном и том же интервале температур. Заметим, что и те, и другие изолированы из морской воды. Иная ситуация с *P. glacincola*: для антарктических представителей этого вида (выделенных из материкового льда) нижняя граница температуры роста – 19° С, верхняя 22°

а оптимум лежит при 13 – 15°C [7]. Черноморские штаммы, являющиеся обитателями морской воды, растут при более высоких температурах.

Таким образом, из воды Чёрного моря нами впервые изолированы представители родов *Psychrobacter* и *Alteromonas*, идентичные населяющим Антарктиду экстремофильным видам. Возникает вопрос: каково происхождение этих микроорганизмов? Учитывая их некоторые экологически обусловленные отличия от бактерий – обитателей Антарктиды, предположение об их заносе оттуда в процессе мореплавания представляется нам маловероятным. Возможно, исследуемые бактерии являются потомками видов, населявших Мировой океан

несколько десятков миллионов лет тому назад. Впоследствии с образованием Чёрного моря и ледяного покрова Антарктиды эти микроорганизмы эволюционировали под влиянием условий своего существования, с чем связаны их отличия по отношению к температуре, уровням солёности и т. д. При этом черноморские и антарктические штаммы *A. stellipolaris*, сходные по среде обитания, ближе друг другу как генетически, так и фенотипически. Черноморские изоляты *P. glacicola* дальше отстоят от антарктических: имея 97 – 98 % сходства последовательностей 16S рРНК, они могут оказаться представителями близкородственного, но самостоятельного вида.

1. Коцюфляк О. І., Рева О. М., Таширеєв О. Б. Таксономічний склад та антагоністичні властивості антарктичних флюоресціюючих бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіол. журн. – 2004. – **66** (2).
2. Онищенко О. М., Киприанова Е. А. Бактерии рода *Shewanella* из воды и моллюсков Чёрного моря. // Мікробіол. журн. – 2006. – **68**, № 2. – С.12-22.
3. Онищенко О. М., Киприанова О. А., Подригес-Валера Ф. та ін. Таксономічне дослідження бактерій родів *Alteromonas* та *Pseudoalteromonas*, виділених з води та безхребетних Чорного моря // Мікробіол. журн. - 2005. – **67**, № 4. - С. 3 - 14.
4. Онищенко О. М., Козак О. І. *Alteromonas*-подібні бактерії з Карадазького заповідника Чорного моря і їх кластерний аналіз // Науковий вісник УжНУ. Серія: Біологія. - 2001. - № 9. - С. 66 - 68.
5. Смірнов В. В., Онищенко О. М., Киприанова О. А. Морські грамнегативні еубактерії, ізольовані з води, молюсків та водоростей Чорного моря // Мікробіол. журн. – 2001. – **63**, № 4. – С. 3 – 8.
6. Baumann P., Baumann L. The marine gram-negative Eubacteria // The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria / Ed. by Starr M.P., Stolp H., Truper H. et al. – Berlin etc.: Springer-Verlag, 1986. – **2**. – P. 1302 – 1331.
7. Bowman J. P., Nicols D. S., McMeekin T. A. *Psychrobacter glacicola* sp. nov., a halotolerant, psychrophilic bacterium from Antarctic sea ice // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 1997. – **20**. – P. 209 – 215.
8. Ivanova E. P., Onyshchenko O. M., Christen R. et al. *Marinomonas pontica* sp. nov., isolated from the Black Sea // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2005. – **55**. – P. 275-279.
9. Ivanova E. P., Onyshchenko O. M., Christen R. et al. *Oceanimonas smirnovii* sp. nov., a novel organism isolated from the Black Sea // Syst. and Appl. Microbiol. – 2005. – **28**. – P. 131 – 136.
10. Reddy G. S. N., Matsumoto G. I., Schumann P. et al. Psychrophilic *Pseudomonads* from Antarctica: *Pseudomonas Antarctica* sp. nov., *Pseudomonas meridiana* sp. nov. and *Pseudomonas proteolytica* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microb. - 2004. - **54**, № 3. - P. 713-719.
11. Van Trappen S., Tan T.-L., Yang J. *Alteromonas stellipolaris* sp. nov., a novel budding, prosthecate bacterium from Antarctic seas, and emended description of the genus *Alteromonas* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – **54**. – P. 1157-1163.

Поступила 09 февраля 2007 г.

После доработки 30 октября 2007 г.

Психрофильные бактерии родов *Alteromonas* и *Psychrobacter*, выделенные из воды Черного моря. О. М. Онищенко, О. А. Киприанова, Л. В. Ярошенко. На основе данных фенотипического анализа та часткового сиквенсу гену 16S рРНК 7 штамів галофільних морських бактерій, виділених з води Чорного моря, були віднесені до екстремофільних антарктичних видів *Psychrobacter glacincola* (4 штами) та *Alteromonas stellipolaris* (3 штами). В цілому чорноморські штами були подібні до антарктичних ізолятів, та разом з тим відрізнялись від них здатністю до росту при більш високих температурах, стійкістю до нижчих концентрацій NaCl та асиміляцією деяких джерел вуглецевого живлення.

Ключові слова: *Alteromonas*, *Psychrobacter*, психрофільні мікроорганізми, галофільні бактерії, Чорне море

Psychrophilic bacteria of *Alteromonas* and *Psychrobacter* genera isolated from the Black Sea water. O. M. Onyshchenko, E. A. Kiprianova, L. V. Yaroshenko. On the basis of the phenotypic analysis data and partial sequences of 16S rRNA gene seven strains of halophilic marine bacteria isolated from the Black Sea water have been assigned to extremal Antarctic species *Psychrobacter glacincola* (4 strains) and *Alteromonas stellipolaris* (3 strains). Being as a whole similar in their properties to Antarctic isolates, the Black Sea strains had some differences in ability to growth at higher temperatures, resistance to lower concentration of NaCl and assimilation of some carbon sources.

Key words: *Alteromonas*, *Psychrobacter*, psychrophilic microorganisms, halophilic bacteria, Black Sea

ЗАМЕТКА

Амфипода *Microprotopus maculatus* в Чёрном море – чужестранец или старый знакомый? [Амфипода *Microprotopus maculatus* у Чорному морі – чужоземець чи старий знайомий? Is the Amphipoda *Microprotopus maculatus* a guest in the Black Sea or well known species?]. В последнее время проблема видов – вселенцев в Чёрном море привлекла пристальное внимание многих исследователей. В число новых вселенцев недавно включили амфиподу *Microprotopus maculatus* (Shiganova, 2007). Но это не совсем верно. Данный вид давно обитает в Чёрном море, однако при его описании вкралась ошибка. В последнем и наиболее полном «Определителе бокоплавов Чёрного моря» (Грезе, 1985) приведено описание двух видов рода *Microprotopus* – *M. longimanus* Chevreux, 1886 и *M. minutus* Sovinsky, 1893. Первый вид довольно редок в Чёрном море, тогда как второй является обычным обитателем зарослей мелководных заливов. В вышедшем позднее «Определителе амфипод Средиземного моря» (Myers, 1989) указано, что в Средиземном море обнаружены только самки *M. longimanus*, а самцы не известны. К сожалению, в работе И. И. Грезе приведён только внешний вид самца *M. longimanus*, тогда как важные при определении амфипод рисунки отдельных конечностей отсутствуют. Основные признаки самца *M. longimanus*, в первую очередь, строение карпуса и проподуса Gn. II, приведённые в работе И. И. Грезе (стр. 105), полностью соответствуют таковым самца другого вида – *M. maculatus* Norman, 1867, описанного в определителе средиземноморских амфипод (Myers, 1989, стр. 423). Этот вид является обычным в Средиземном море, где встречается в зоне зелёных водорослей-эпифитов на глубине 1 – 2 м. Ключевые признаки (стр. 104) и рисунки частей тела ещё одного вида – *M. minutus* (стр. 106) из определителя И. И. Грезе также соответствуют таковым *M. maculatus* в средиземноморском определителе (стр. 423 – 425). Нами было проанализировано более 500 экз. черноморских амфипод, относящихся к роду *Microprotopus*. Ключевые признаки всех исследованных особей соответствовали таковым *M. maculatus* из средиземноморского определителя. На этом основании мы считаем, что в черноморском определителе при описании систематических признаков самцов «*M. longimanus*» была допущена ошибка, а вид *M. minutus*, скорее всего, является *M. maculatus*, а сообщение о нахождении в Чёрном море нового вселенца – амфиподы *M. maculatus* – преждевременным. Возникшая путаница требует дальнейшего изучения самок и самцов рода *Microprotopus* из черноморского региона. В. А. Гринцов, Ю. А. Загородняя (Институт биологии южных морей НАНУ, Севастополь, Украина).