

УДК 579.84.11

О.И. Коцофляк

НОВЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ РОДА PSEUDOMONAS ИЗ ПОЧВ АНТАРКТИКИ

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины
Украина, Д 03680, Киев, ул. Заболотного, 154, kotsofliak_olga@serv.imv.kiev.ua

Из проб почвы, мха и донных отложений, отобранных на островах Галиндез, Питерман и Десеппин, было выделено 59 штаммов бактерий рода *Pseudomonas*. Исследование этих культур по 113 фенотипическим признакам и результаты идентификации при помощи компьютерной программы позволили отнести 25 штаммов к V биовару *P. fluorescens*, 22 — к биоварам А и В *P. putida*, 2 — к *P. alcalifila*. Данные секвенсы гипервариабельного участка гена 16S рРНК и фенотипического анализа позволили отнести 8 антарктических изолятов к *P. fragi* и *P. veronii*, а также показали принадлежность двух неидентифицированных штаммов псевдомонад к *P. fluorescens*-комплексу. Полученные данные свидетельствуют о том, что микробиота Антарктики представлена как повсеместно распространенными, так и специфическими, возможно новыми, видами псевдомонад.

Ключевые слова: Антарктика, бактерии рода *Pseudomonas*, секвенс 16S рРНК.

Нові представники роду *Pseudomonas* з ґрунтів Антарктики. Коцофляк О. І.

Із зразків ґрунту, моху і донних відкладень, відібраних на островах Галіндез, Пітерман і Десеппін, було виділено 59 штамів бактерій роду *Pseudomonas*. Дослідження цих культур за 113 фенотиповими ознаками та результати ідентифікації за допомогою комп'ютерної програми дозволили віднести 25 штамів до V біовару *P. fluorescens*, 22 — до біоварів А і В *P. putida*, 2 — до *P. alcalifila*. Дані секвенсу гіперваріабельної ділянки гена 16S рРНК та фенотипового аналізу дозволили віднести 8 антарктичних ізолятів до *P. fragi* і *P. veronii* і показали приналежність 2-х неідентифікованих штамів псевдомонад до *P. fluorescens*-комплексу. Одержані дані свідчать про те, що мікробиота Антарктики представлена як широко розповсюдженими, так і специфічними, можливо, новими видами псевдомонад.

Ключові слова: Антарктика, бактерії роду *Pseudomonas*, секвенс 16S рРНК.

New representatives of *Pseudomonas* genus from Antarctic soils. Kotsoflyak O.I.

59 strains of pseudomonads have been isolated from soil, moss and silt of Galindes, Piterman and Deseption islands. 113 phenotypic characteristics were studied for these strains and using computer analysis 25 strains were identified as representatives of *Pseudomonas fluorescens* biovar V, 22 — as *P. putida* biovars A and B, 2 — as *P. alcalifilae*. Results of 16 S rRNA sequence and phenotypic analysis allowed to identify 8 antarctic isolates as *P. veronii* and *P. fragi* and have shown belonging of 2 non-identified strains to *P. fluorescens* — complex. Obtained data give evidence, that Antarctic bacteria include both the widespread and exotic, probably new species of pseudomonads.

Key words: Antarctic, fluorescent bacteria of *Pseudomonas* genus, 16 S rRNA sequence.

Согласно современным данным, род *Pseudomonas* включает более 84 видов [1]. Широкое использование молекулярно-генетических методов, подробное изучение микроорганизмов — обитателей неисследованных ранее экологических ниш приводят к описанию новых видов псевдомонад. Потенциальным источником необычных, экстремальных форм микроорганизмов является Антарктика. Микробиота этого континента представлена широким спектром α , β и γ -подклассов протеобактерий [2, 3]. Среди представителей антарктических биоценозов описаны и бактерии рода *Pseudomonas*, однако сведения об их видовом разнообразии и биологических свойствах остаются довольно ограниченными.

Целью нашей работы было изучение видового разнообразия бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из антарктических образцов, отобранных на Украинской антарктической станции Академик Вернадский в 2001 г.

Материалы и методы

Для изучения антарктических штаммов псевдомонад были отобраны 10 проб почвы, мха и донных отложений (о. Галиндез, Питерман и Десеппин).

Выделение бактерий рода *Pseudomonas* проводили на мясопептонном агаре при температурах +4° и +26° С.

У выделенных штаммов исследовали: окраску по Граму, способность окислять глюкозу на среде Хью-Ливсона, наличие флюоресцирующего пигмента на среде Кинг В и других пигментов на среде Кинг А, способность к росту при +4°, 10° и 42° С, гидролиз желатина, крахмала, способность к денитрификации, наличие аргининдигидролазы, оксидазы и левансахаразы. Все эти свойства определяли общепринятыми методами. Изучали также усвоение различных соединений как единственного источника углерода (на агаризованной среде Козера с 0,1% соответствующего субстрата) [4].

Идентификацию штаммов псевдомонад проводили с помощью компьютерной программы для идентификации бактерий рода *Pseudomonas* по фенотипическим признакам [5].

Для проведения ПЦР-амплификации и секвенирования гена 16S рРНК культуры выращивали в 10 мл мясопептонного бульона в пробирках на лабораторной качалке, 200 об/мин, при +26° С в течение суток.

Культуральную жидкость центрифугировали при 5000 об/мин пять минут, полученный осадок отмывали дистиллированной водой, центрифугировали и осадок ресуспендировали в 100 мкл H₂O. К образцам добавляли 100 мкг стеклянного порошка и 100 мкг насыщенного фенола, после чего клетки разрушали в аппарате Hybaid RibiLysr. После центрифугирования отбирали верхний водный слой. Осаждали ДНК этанолом, высушивали и растворяли в 500 мкл дистиллированной воды. Реакцию ПЦР проводили с использованием термального циклера Hybaid PCR Express. К 12,5 мкл смеси BIOMIX RED, содержащей в двойной концентрации все необходимые для ПЦР вещества и цветной буфер для электрофореза, добавляли выделенную и очищенную ДНК (0,5 мкл), 0,2 pM праймеров 16 S Forward (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) и 16 S Reverse (TACGGYTACCTTGTTACGACTT). Объем раствора доводили дистиллированной водой до 25 мкл. Денатурацию проб проводили при +95⁰ С в термоциклере в течение 10 мин. Использовали следующую программу синтеза: 45 циклов 30 сек. при +94⁰ С, 1 мин при +36⁰ С и 1 мин при +72⁰С. Цикл завершали фазой элонгации при +72⁰ С – 10 мин. Пробы хранили при +4⁰ С. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1,5% агарозе Genaxis. Сиквенс проводили на сиквенаторе SEQTM 2000XL (Beckman Coulter). Анализ данных сиквенса 16 S рРНК и сравнение с сиквенсами, хранящимися в базе данных GenBank, проводили при помощи компьютерной программы BLAST.

Результаты

При выделении бактерий из образцов мха, почвы и донных отложений при +4⁰ С и +26⁰ С наблюдали одинаково интенсивный рост микрофлоры, состоящей преимущественно из флюоресцирующих штаммов.

Для дальнейших исследований были отобраны 59 штаммов бактерий, представляющих собой грамотрицательные палочки, строгие аэробы, подвижные с помощью полярных жгутиков. В соответствии с этими свойствами они были отнесены к роду *Pseudomonas*, причем к флюоресцирующей группе рода было отнесено 50 штаммов. Все выделенные из антарктических образцов культуры псевдомонад были охарактеризованы по 113 фенотипическим признакам. Для определения их видовой принадлежности мы использовали компьютерную программу для идентификации бактерий рода *Pseudomonas*. Оказалось, что в исследованных образцах преобладали представители широко распространенных видов. К биовару V *P. fluorescens* было отнесено 25 штаммов, 22 – к биоварам А и В *P. putida*, 2 – к *P. alcaliphila*. Штамм № 23 оказался фенотипически идентичным *P. veronii*, выделенному в 1996 г. из минерального источника. Семь антарктических штаммов были идентифицированы как *P. fragi*. Представители этого вида являются специфическими обитателями охлажденных мясных продуктов (Таблица 1).

Таблица 1

Источники выделения и видовая принадлежность штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из антарктических образцов

Источник выделения	Количество штаммов	Вид	Уровень идентичности, %*
о. Галиндез. Донный осадок	3	<i>P. putida</i> В	100
	1	<i>P. putida</i> А	100
	2	<i>P. fragi</i>	83
о. Галиндез. Подушка из мха	2	<i>P. fluorescens</i> биовар V	100
	1	<i>P. putida</i> В	99
	3	<i>P. fragi</i>	99
	2	<i>P. alcaliphila</i>	100
о. Галиндез. Мох	5	<i>P. fluorescens</i> биовар V	100
	2	<i>P. putida</i> А	100
	1	<i>P. libaniensis</i>	73
о. Галиндез. Мох-компост	4	<i>P. fluorescens</i> биовар V	99–100
о. Галиндез. Керн	1	<i>P. fluorescens</i> биовар V	100
о. Галиндез. Гнездо поморника	2	<i>P. fluorescens</i> биовар V	100
о. Питерман. Почва из колонии пингвинов	3	<i>P. fluorescens</i> биовар V	100
	5	<i>P. putida</i> В	99–100
	1	<i>P. libaniensis</i>	75
о. Питерман. Налет на снегу	1	<i>P. putida</i> В	100
	1	<i>P. veronii</i>	79
о. Питерман. Влажный мох, почва	1	<i>P. fluorescens</i> биовар V	100
	1	<i>P. putida</i> А	100
	2	<i>P. putida</i> В	100
	1	<i>P. fragi</i>	100
о. Десепшн. Почва из колонии пингвинов	1	<i>P. fluorescens</i> биовар V	100
	1	<i>P. putida</i> В	100
	1	<i>P. fragi</i>	100
Станция Академик Вернадский. Мох	6	<i>P. fluorescens</i> биовар V	99–100
	5	<i>P. putida</i> А	100

* Уровень фенотипического сходства типового штамма данного вида и антарктического изолята (%).

Для уточнения видовой принадлежности штаммов *P. fragi* и *P. veronii*, впервые обнаруженных в антарктических образцах, был выполнен сиквенс гипервариабельного участка гена 16S рРНК. Полученные последовательности, размером от 342 до 399 нуклеотидов, сравнивались с базой данных Gen Bank. Филогенетически близкими к исследуемым штаммам оказались несколько видов псевдомонад, в том числе *P. fragi* и *P. veronii*. При дальнейшем сравнении фенотипических свойств отобранных в результате сиквенса видов антарктические культуры оказались идентичными только *P. fragi* и *P. veronii* (таблица 2). Таким образом, данные молекулярно-генетических исследований подтвердили результаты фенотипической идентификации, и выделенные из антарктических образцов штаммы псевдомонад были окончательно определены как *P. fragi* и *P. veronii*.

Таблица 2

Идентичность сиквенированных фрагментов гена 16S рРНК антарктических штаммов и сиквенсов референс-штаммов *Pseudomonas*, хранящихся в нуклеотидной базе GenBank

Вид и номер исследуемого штамма	Вид и номер референс-штамма в нуклеотидной базе данных GenBank	Количество нуклеотидов в исследованном участке 16 S рРНК	Идентичность последовательностей (%)	Уровень фенотипического сходства штаммов (%)
P. fragi 1	<i>P. fragi</i>	342	99	83
	<i>P. putida</i>	343		67
	<i>P. corrugata</i>	342		67
P. veronii 23	<i>P. veronii</i>	399	99	79
	<i>P. fluorescens</i>			68
	<i>P. putida</i>			68
28	<i>P. brenneri</i>	345	100	52
	<i>P. proteolytica</i>			59
	<i>P. fluorescens</i>			59
38	<i>P. brenneri</i>	342	99	63
	<i>P. proteolytica</i>			57

Согласно результатам компьютерного анализа, штаммы №№ 28 и 38, выделенные из почв Антарктики, фенотипически значительно отличались от известных видов псевдомонад. Они были максимально похожи на штаммы *P. libaniensis*, которые являются обитателями минеральной воды. Уровень идентичности типового штамма *P. libaniensis* и антарктического штамма №28 составил 73%, для штамма № 38 показатель фенотипического сходства был немного выше – 75%. Однако такие показатели идентичности по фенотипическим признакам являются недостаточно высокими и не обеспечивают надежной идентификации. Поэтому для уточнения видовой принадлежности антарктических культур были проведены молекулярно-генетические исследования. Данные сиквенса гипервариабельного участка гена 16S рРНК штаммов №№ 28 и 38 подтвердили их принадлежность к *P. Fluorescens*-комплексу. Однако филогенетически близкие виды, установленные в результате сиквенса, значительно отличались от исследуемых антарктических изолятов по фенотипическим свойствам. Так, гипервариабельный участок гена 16S рРНК антарктического штамма № 28 показал максимальный уровень идентичности с фрагментом генома типового штамма *P. brenneri* – 100%. Фенотипическое сходство данных культур составило 52%. Такое противоречие свидетельствует о возможном общем происхождении видов, но не об их идентичности. Учитывая полученные результаты, мы можем предположить, что выделенные из почвы штаммы №№ 28 и 38 являются представителями новых видов псевдомонад, возможно присутствующих только в Антарктике. Для окончательного выяснения их таксономического статуса необходима ДНК-ДНК гибридизация.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что микробиота Антарктики представлена как повсеместно распространенными, так и новыми, возможно, специфичными только для данного континента видами псевдомонад.

Список литературы

1. Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonas based on 16S rRNA sequence // Int.J.Syst.Evol.Microbiol. – 2000. – Vol. 50, № 4. – P.1563–1589.
2. Bowman J.P., McCammon S.A., Brown M.V., Nichols D.S., McMeekin T.A. Diversity and Association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – Vol. 63, № 8. – P. 3068–3078.
3. Obata H., Muryoi N., Kawahara H., Yamade K., Nishikawa J. Identification of a novel ice-nucleating bacterium of Antarctic origin and its ice nucleation properties // Cryobiology. – 1999. – Vol. 38. – P. 131–139.
4. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*- Киев: Наукова думка, 1990. – С. 220–230.
5. Коцопляк О.И., Рева О.Н., Киприанова Е.А., Смирнов В.В. Идентификация бактерий рода *Pseudomonas* методами компьютерного анализа // Микробиол. журн. – 2003. – 65 (6). – С.3–12.