

**В.А. Романовская<sup>1</sup>, В.В. Парфенова<sup>2</sup>, Н.Л. Белькова<sup>2</sup>, Е.В. Суханова<sup>2</sup>,  
Г.В. Гладка<sup>1</sup>, А.А. Таширева<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Заболотного, 154, Киев, Украина;

<sup>2</sup>Лимнологический институт СО РАН, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, Россия

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИЙ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМ

На основе нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК проведен филогенетический анализ аэробных хемоорганотрофных бактерий из двух экстремальных регионов (Мёртвое море и Западная Антарктика). Термо- и галотолерантные спорообразующие бактерии 7m1 и 7m3 из наземных экосистем Мёртвого моря идентифицированы как *Bacillus licheniformis* и *B. subtilis* subsp. *subtilis*, соответственно. Термотолерантный штамм 6m1 можно рассматривать как *Staphylococcus* sp., учитывая удалённое положение от близкородственных штаммов в кластере *Staphylococcus*. В наземных экосистемах о. Галлиндез (Антарктика) выявлены таксономически разнообразные психротолерантные бактерии. Из орнитогенной почвы изолированы *Micrococcus luteus* O-1 и *Microbacterium trichothecenolyticum* O-3. Штаммы 4r5, 5r5 и 40r5, изолированные из травы и лишайников, могут быть отнесены к роду *Fron dihabitans*. Эти штаммы таксономически и экологически обособлены и на дендрограмме формируют совместный кластер с тремя изолятами *Fron dihabitans* sp., выделенными из лишайника австрийских Альп, и психротолерантным, ассоциированным с растениями *F. cladoniophilus* CafT13<sup>1</sup>. Изоляты из чёрных лишайников в различных стационарных пунктах наблюдения на южной стороне вертикальной скалы идентифицированы как: *Rhodococcus fascians* 181n3, *Sporosarcina aquimarina* O-7, *Staphylococcus* sp. O-10. Из оранжевой биопленки обрастания на верхней точке вертикальной скалы изолирован *Arthrobacter* sp. 28r5g1, из мха – *Serratia* sp. br1g. Согласно полученным результатам, штаммы *Fron dihabitans* наиболее часто встречаются среди аэробных хемоорганотрофных бактерий в фитоценозах Антарктики.

Ключевые слова: филогенетический анализ, экстремальные регионы, таксономия, бактерии.

Последние два десятилетия активно изучается микрофлора экстремальных регионов Земли. Нами был проведен микробиологический анализ двух экстремальных регионов, значительно различающихся по климатическим и физико-химическим характеристикам и расположенных на разных континентах: Мёртвое море (Израиль) и Западная Антарктика. Микроорганизмы прибрежных экосистем Мёртвого моря подвергаются действию таких экстремальных факторов, как высокая температура, солнечная радиация и повышенная минерализация; а микрофлора Антарктики – низкая температура и высокий уровень солнечной радиации (в результате озоновых «дыр»). Из этих регионов были изолированы аэробные хемоорганотрофные бактерии [3, 5] и изучена их резистентность к вышеуказанным факторам. Так, в экосистемах Мёртвого моря выявлены термотолерантные, умеренно галофильные, преимущественно спорообразующие бактерии, высоко резистентные к УФ [5]. Из экосистем Западной Антарктики получены психротолерантные, умеренно галофильные, не образующие спор УФ-резистентные бактерии [4]. Некоторые штаммы, изолированные нами из антарктических фитоценозов ранее [3] на основе сиквенс-анализа генов 16S рРНК, были идентифицированы, как *Pseudomonas mandelii* U1 (HG315621), *Sphingobacterium anhuiense* U3 (HG315622), *Stenotrophomonas rhizophila* U10 (HG315624), *Microbacterium foliorum* O-6, *Brevundimonas vesicularis* O-8, *Derma coccus profundi* U9 (HG315623), *Pseudomonas antarctica* O-5 и *Fron dihabitans* sp. U11 (HG315625) [9].

Цель данной работы – провести филогенетический анализ бактерий, изолированных из наземных экосистем Мёртвого моря и Западной Антарктики, и определить их таксономическое положение.

**Материалы и методы.** Объектами исследования служили аэробные хемоорганотрофные бактерии, изолированные ранее [3, 5] из наземных экосистем Мёртвого моря (диапазон роста 25-50°C) [5] и Западной Антарктики (диапазон роста от 1-5°C до 20-30°C) [3]. Список исследованных штаммов приведен в табл. 1.

© В.А. Романовская, В.В. Парфенова, Н.Л. Белькова, Е.В. Суханова, Г.В. Гладка, А.А. Таширева, 2014

Штаммы хранятся в коллекции отдела биологии экстремофильных микроорганизмов ИМВ НАНУ. Для выращивания бактерий использовали глюкозо-картофельный агар (ГКА) и Nutrient Agar (NA) фирмы HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Для подавления роста микромицетов в среды добавляли 50 мг нистатина на 1 л среды. Термотолерантные изоляты Мёртвого моря выращивали при 42°C, психротолерантные антарктические изоляты – при 18-20°C.

*Выделение геномной ДНК* проводили из клеточных суспензий микроорганизмов, зафиксированных 70 % этанолом. Нуклеиновые кислоты выделяли с помощью коммерческого набора ДНК-сорб по прилагаемым к наборам инструкциям производителя с небольшими модификациями (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) [1]. Образец объемом 100 мкл дважды отмывали от этанола трис-солевым буфером (ТСБ: 10 mM трис-HCl, pH 7,5; 0,1 M NaCl; 2 mM ЭДТА), осадок ресуспендировали в 100 мкл ТСБ. К образцу добавляли 300 мкл лизирующего буфера из набора, тщательно перемешивали. Лизис вели 15 мин при 65 °C в твердотельном термостате Термит (ДНК-технологии, Россия). Для удаления клеточного дебриса лизат центрифугировали на настольной центрифуге (10500g, 5 мин). Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку, добавляли 25 мкл сорбента, далее все стадии обработки вели по инструкции фирмы-производителя. Нуклеиновые кислоты элюировали в 50 мкл ТЕ-буфера (ТЕ: 10 mM трис-HCl, pH 7,5; 1 mM ЭДТА) и использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции (ПЦР).

*Аmplификацию препаратов ДНК* изолированных штаммов проводили с коммерческим набором N-Taq (НТИ-Байкал, Иркутск) с консервативными бактериальными праймерами 27L (5'-3': AGAGTTTGATCATGGCTCAG) и 1542R (5'-3': САКАААGGAGGTGATCC) [2]. Использовали следующий режим реакции: в первом цикле денатурация при 95 °C – 5 мин, затем 30 циклов: денатурация 94°C – 30 с, отжиг 52°C – 30 с и элонгация 72°C – 90 с, в последнем цикле время элонгации увеличивали до 7 мин. Амплификацию проводили в термоциклере Бис (БИС-Н, Россия). Дальнейший анализ ампликонов и подготовку к сиквенсу вели по разработанным ранее методикам [2]. Ампликоны анализировали в 1,5 % агарозном геле в 20 mM трис-ацетатном буфере (pH 7,6), визуализировали на трасниллиуминаторе TCP-15.M (Vilber Lourmat, Франция). Полосы, соответствующие целевым продуктам, вырезали и экстрагировали из геля методом замораживания-оттаивания: замораживали ночь при –20°C и элюировали центрифугированием (10500 g, 15 мин). Водную фазу, содержащую ампликоны, переносили в новые пробирки и использовали для сиквенса [2]. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом сиквенаторе ABI310A (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск).

Очистка и сиквенирование ПЦР продуктов рДНК четырёх штаммов (O-1, O-3, O-7, O-10) были выполнены Macrogen Inc. (Южная Корея).

*Филогенетический анализ.* Полученные последовательности генов 16S рРНК бактериальных изолятов сравнивали с таковыми микроорганизмов, депонированных в базе данных GenBank, используя программный пакет BLAST. Родственные микроорганизмы определяли, вычисляя попарное сходство (%), основанное на соотношении количества совпадающих/проанализированных нуклеотидов гена 16S рРНК каждого штамма со сравниваемыми бактериями. Филогенетическое положение определяли построением дендрограмм, показывающих положение изучаемого штамма среди близкородственных и типовых видов (программы ClustalX 2.1, Mega v. 6.00). Дерево строили (программа ClustalX 2.1) по методу сравнения ближайших соседей с бутстреп анализом (bootstrap NJ tree) с использованием 1000 бутстреп испытаний (1000 альтернативных деревьев). Далее филогенетическое дерево открывали программой Mega v. 6.00 и корректировали. Нуклеотидные последовательности изученных штаммов депонированы в международной базе данных GenBank под номерами HG796183, HG796184, HG796185, HG796186, HG796187, HG796188, HG796189, HG796190, HG796191, HG796192, HG796193, HG796194, HG796195.

**Результаты и их обсуждение.** Из психротолерантных накопительных культур, полученных из наземных экосистем Антарктики (орнитогенная почва, трава *Deschampsia antarctica*, зелёный мох, накипные чёрные лишайники, биоплёнка обрастания на вертикальных скалах), а также из термотолерантных культур, выделенных из образцов побережья Мёртвого моря, были изолированы чистые культуры бактерий, которые изучали в данной работе (табл. 1). Чтобы выявить родственные виды исследуемых изолятов, нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК сравнивали с таковыми бактерий, депонированных в нуклеотидной базе данных GenBank. На основании полученных данных были выявлены близкородственные

виды для изучаемых бактерий (табл. 2). Для определения филогенетического статуса бактерий были построены дендрограммы, показывающие положение исследуемого штамма среди близкородственных и типовых видов.

Таблица 1

Список исследованных бактерий, изолированных из экстремальных экосистем

№№ штаммов	Температура при изоляции	Характеристика образцов, откуда штаммы были изолированы
Израиль, Мёртвое море		
6т1	42 °С	Поверхностный слой солёного грунта, отобранный около солёного ручья, который течёт через глинисто-соляную равнину в сторону Мёртвого моря
7т1 7т3	42 °С	Чёрная высоко минерализованная грязь, отобрана там же. Представляет высокодисперсное коллоидное вещество, пластичное на ощупь, используется как лечебная грязь
Антарктика, о. Галиндез (биогеографический полигон)		
О-1 О-3	30 °С	Орнитогенная почва
О-7 О-10 181n3	30 °С	Чёрный лишайник на южной стороне вертикальной скалы (клифа). Образцы отобраны из различных стационарных пунктов наблюдения в 2008 и 2010 гг.
4r5g 5r5g	5 °С	Трава <i>Decshampcia antarctica</i> , растущая на почве между камней
6r1g	1 °С	Зелёный мох, отобранный на моховом поле
28r5g1	5 °С	Биоплёнка обрастания на вершине вертикальной скалы
40r5g	5 °С	Зелёный лишайник на камнях

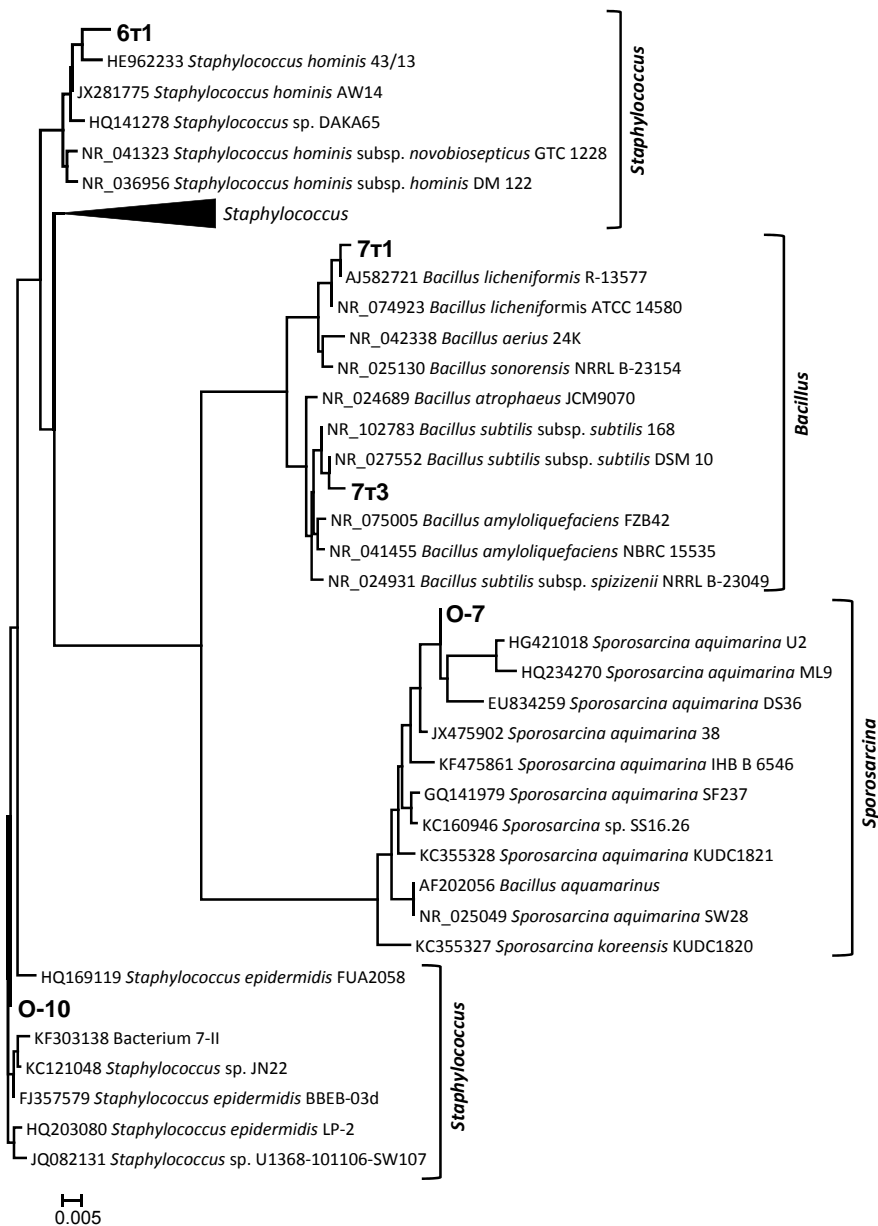
Показано, что спорообразующие термотолерантные штаммы 7т1 и 7т3 (выделены из образцов побережья Мёртвого моря) можно однозначно отнести к видам *Bacillus licheniformis* и *B. subtilis* subsp. *subtilis*, соответственно (рис. 1, табл. 2). Штамм 6т1 (изолирован там же) не образует споры, и, учитывая удалённое положение от близкородственных штаммов в кластере *Staphylococcus* его можно рассматривать как *Staphylococcus* sp. (рис. 1).

В наземных экосистемах о. Галиндез (Аргентинский архипелаг, Антарктика) выявлены таксономически разнообразные психротолерантные бактерии. Высокий процент гомологии с типовым штаммом *Micrococcus luteus* NCTC 2665<sup>T</sup> (NR075062) (табл. 2) и близость к соответствующему кластеру видов (рис. 2) позволяют идентифицировать изолят О-1 из орнитогенной почвы Антарктики как *Micrococcus luteus*. Филогенетический анализ также подтверждает экологические особенности антарктических микроорганизмов: нуклеотидная последовательность штамма О-1 кластеризуется с неидентифицированным видом R-9183 (AJ441006), изолированным из микробного мата озера Аце, Оазис Вестфолль, Антарктика (Antarctica: Vestfold Hills, Ace Lake) (рис. 2). Другой изолят из этого экотопа О-3 отнесен к виду *Microbacterium trichothecenolyticum* на основании сравнительного и филогенетического анализа (табл. 2, рис. 2).

Особый интерес представляет филогения антарктических психротолерантных бактерий, изолированных из фитоценозов Антарктики. На основании сравнительного анализа среди ближайших родственников изолятов 4r5, 5r5 и 40r5 отмечены нескольких штаммов *Fronidhabitans* sp. и неидентифицированные бактерии сем. *Microbacteriaceae*. С известными видами рода *Fronidhabitans* (*F. cladoniiphilus* CafT13<sup>T</sup>, *F. peucedani* RS-15<sup>T</sup> и *F. australicus* E1HC-02<sup>T</sup>) у изолятов 4r5, 5r5 и 40r5 более низкий уровень гомологии (табл. 2). Результаты филогенетического анализа подтвердили не только родовую принадлежность данных штаммов (рис. 2), но и их экологическую обособленность. Так, на дендрограмме они формируют общий кластер с изолятами, которые экологически близки полученным в Антарктике: неидентифицированные до рода бактерии, которые выделены из лишайника *Cladonia arbuscula* из австрийских Альп (FN666419, FN666423, FN666424) и вида *Fronidhabitans cladoniiphilus* CafT13<sup>T</sup> (FN666417), психротолерантного штамма, ассоциированного с растениями. К этому же кластеру примыкают виды *F. australicus* E1HC-02<sup>T</sup> и *F. peucedani* RS-15<sup>T</sup>. Таким образом, штаммы 4r5, 5r5 и 40r5 могут быть идентифицированы как *Fronidhabitans* sp. Следует отметить, что виды *Fronidhabitans* немногочисленны и описаны недавно. К ним относятся *F. australicus* E1HC-02<sup>T</sup> [7, 10], *F. cladoniiphilus* CafT13<sup>T</sup> [6], *F. peucedani* RS-15<sup>T</sup> [8].

## Близкородственные виды исследованных бактерий на основании си퀀с-анализа генов 16S рРНК

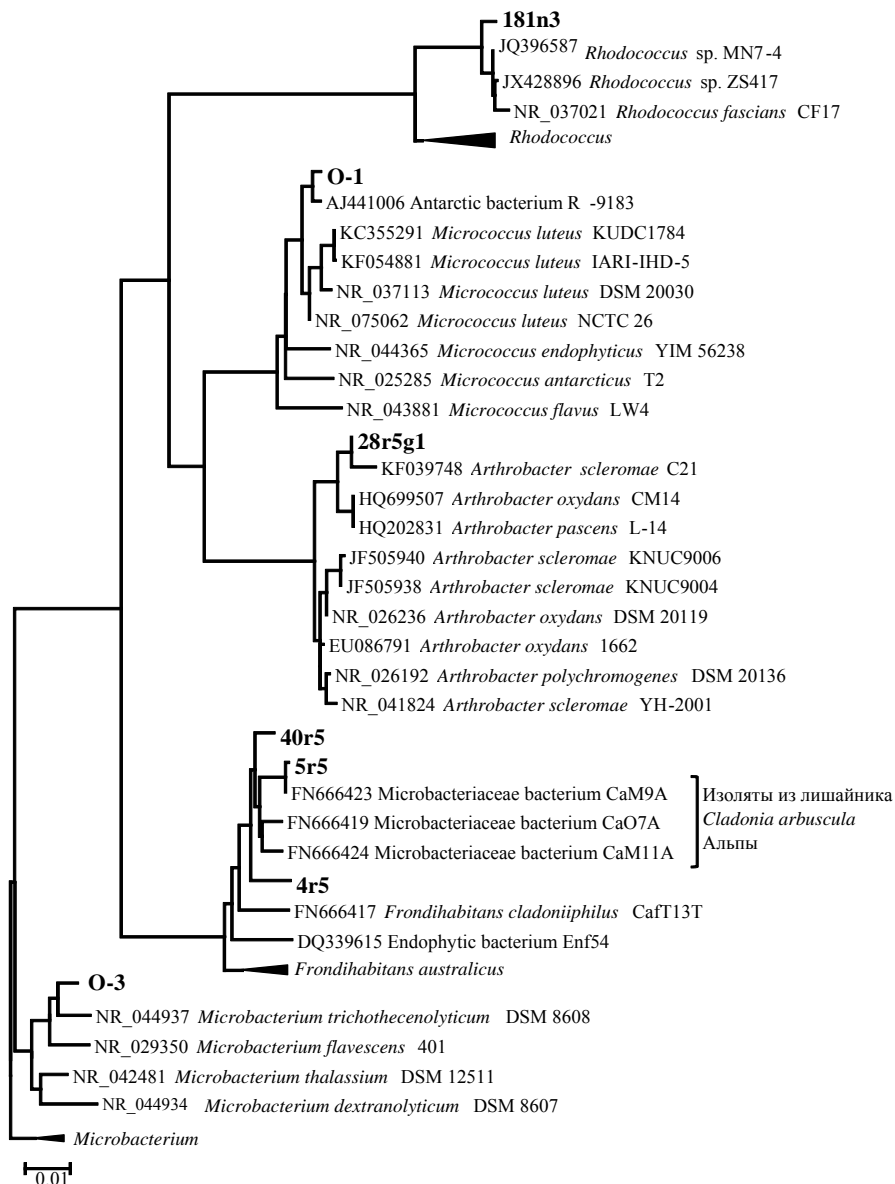
№№ исследованных штаммов	Виды бактерий, наиболее близкие исследуемым штаммам, согласно программе BLASTN 2.2.28+				Таксономическое положение
	Вид, № штамма (GenBank accession No)	Сходство, %	Сравниваемые фрагменты гена 16S рРНК		
6т1	<i>Staphylococcus</i> sp. IARI-JR-43 (KF054996)	98.8	819/829	Bacteria; <b>Firmicutes</b> ; Bacilli; Bacillales; <i>Staphylococcus</i>	
7т1	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 <sup>T</sup> (NR_074923)	99.8	1454/1457	Bacteria; <b>Firmicutes</b> ; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Bacillus</i>	
7т3	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup> (NR_027552)	99.8	1454/1457	Bacteria; <b>Firmicutes</b> ; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Bacillus</i>	
O-1	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665 <sup>T</sup> (NR075062)	99.1	1402/1415	Bacteria; <b>Actinobacteria</b> ; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococccineae; <i>Micrococcus</i>	
O-3	<i>Microbacterium trichothecenoxylicum</i> DSM 8608 <sup>T</sup> (NR044937)	98.7	1372/1390	Bacteria; <b>Actinobacteria</b> ; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococccineae; Microbacteriaceae; <i>Microbacterium</i>	
O-7	<i>Sporosarcina aquimarina</i> SW28 <sup>T</sup> (NR025049)	98.7	1408/1426	Bacteria; <b>Firmicutes</b> ; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; <i>Sporosarcina</i>	
O-10	<i>Staphylococcus</i> sp. U1368-SW107 (JQ082131)	99.8	1428/1430	Bacteria; <b>Firmicutes</b> ; Bacilli; Bacillales; <i>Staphylococcus</i>	
4т5	<i>Fronthabitans</i> sp. GRS42 (JX876867) <i>F. peucedani</i> RS-15 <sup>T</sup> (FM998017) <i>F. cladoniiphilus</i> CaFT13 <sup>T</sup> (FN666417) <i>F. australicus</i> E1HC-02 <sup>T</sup> (NR043897.1) <i>F. peucedani</i> RS-15 <sup>T</sup> (FM998017)	98.5 96.3 97.7 97.1	1408/1429 1376/1402 1356/1388 1359/1399	Bacteria; <b>Actinobacteria</b> ; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococccineae; Microbacteriaceae; <i>Fronthabitans</i>	
5т5	<i>Fronthabitans</i> sp. GRS42 (JX876867) <i>F. cladoniiphilus</i> CaFT13 <sup>T</sup> (FN666417) <i>F. australicus</i> E1HC-02 <sup>T</sup> (NR043897.1) <i>F. peucedani</i> RS-15 <sup>T</sup> (FM998017)	98.8 98.0 97.8 97.8	1412/1429 1372/1388 1369/1399 1371/1402	Bacteria; <b>Actinobacteria</b> ; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococccineae; Microbacteriaceae; <i>Fronthabitans</i>	
6тg	<i>Serratia quinivorans</i> 4364 (NR_037112)	97.7	1419/1452	Bacteria; <b>Proteobacteria</b> ; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; <i>Serratia</i>	
28т5g1	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119 <sup>T</sup> (NR_026236)	99.8	823/824	Bacteria; <b>Actinobacteria</b> ; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococccineae; <i>Arthrobacter</i>	
40т5	<i>Fronthabitans</i> sp. GRS42 (JX876867) <i>F. peucedani</i> RS-15 <sup>T</sup> (FM998017) <i>F. australicus</i> E1HC-02 <sup>T</sup> (NR043897) <i>F. cladoniiphilus</i> CaFT13 <sup>T</sup> (FN666417)	99.2 98.0 98.0 98.0	1435/1447 1385/1413 1384/1412 1364/1391	Bacteria; <b>Actinobacteria</b> ; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococccineae; Microbacteriaceae; <i>Fronthabitans</i>	
18тn3	<i>Rhodococcus fascians</i> CF17 <sup>T</sup> (NR_037021)	99.7	1393/1397	Bacteria; <b>Actinobacteria</b> ; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Nocardiaceae; <i>Rhodococcus</i>	



**Рис. 1.** Филогенетическое древо представителей филума Firmicutes, построенное методом объединения ближайших соседей (программы ClustalX 2.1, Mega v. 6.00) на основании данных о последовательностях фрагментов гена 16S рНК. Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Масштаб соответствует 5 заменам на 1000 п.н.

Штамм 181n3 имеет высокое сходство (99,7 %) с *Rhodococcus fascians*, и на дендрограмме (рис. 2) этот штамм образует общий с *Rhodococcus fascians* CF17<sup>T</sup> кластер, что позволяет причислить 181n3 к этому виду. Интересно, что в этот же кластер попадают виды *Rhodococcus* sp., изолированные из разных экосистем Арктики и Антарктики: *Rhodococcus* sp. MN7-4 (JQ396587, ризосфера) и *Rhodococcus* sp. ZS417 (JX428896, почва), соответственно.

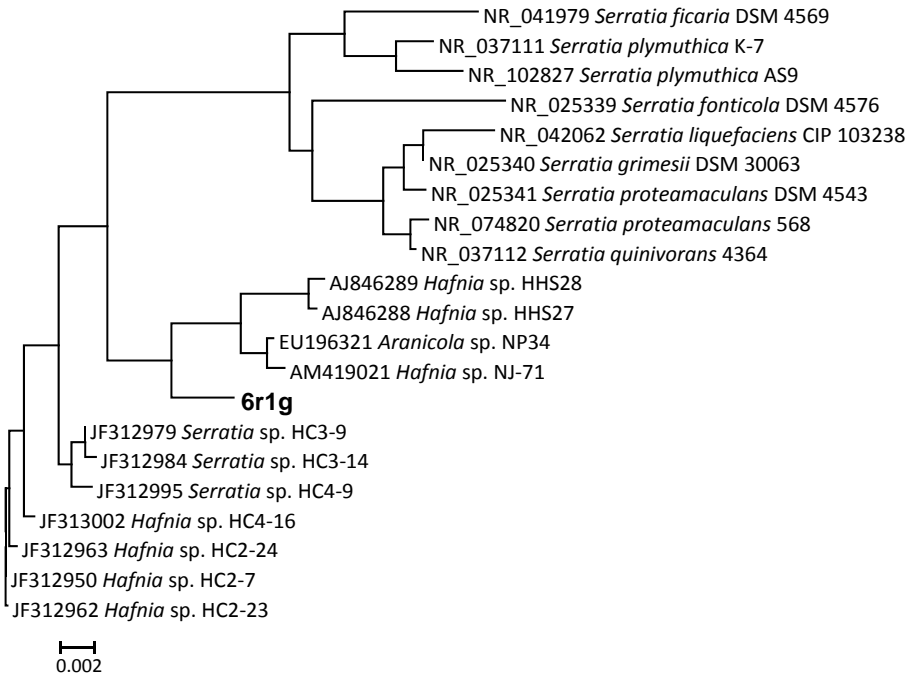
На основании коэффициентов попарного сходства изолят 28r5g1 близок виду *Arthrobacter oxydans* (99,8%). Однако на дендрограмме (рис. 2) видно, что на проанализированном участке рибосомного оперона (1532 п.н.) виды рода *Arthrobacter*: *A. scleromae*, *A. oxydans*, *A. polychromogenes*, *A. pascens* представляют полифилетичный кластер, поэтому определить корректно видовую принадлежность изолята 28r5g1 затруднительно.



**Рис. 2.** Филогенетическое древо представителей филума Actinobacteria, построенное методом объединения ближайших соседей (программы ClustalX 2.1, Mega v. 6.00) на основании данных о последовательностях фрагментов гена 16S рРНК. Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Масштаб соответствует 1 замене на 100 п.н.

У антарктического штамма бг1g очень низкий процент гомологии (97,7%) с ближайшим культивируемым родственником *Serratia quinivorans*. Филогенетический анализ показал, что все типовые штаммы этого рода образуют отдельный кластер на филогенетическом дереве (рис. 3), в то время как штамм бг1g, так же как и штаммы, неидентифицированные до вида, но изолированные из низкотемпературных мест обитания, таких как ледниковая вода (ледники, Гималаи, Индия, AJ846288, AJ846289), холодные минеральные воды и цианобактериальные маты (Арктика, EU196321, JF312979, JF312984, JF312995, JF313002, JF312963, JF312962, JF312950), почвы Антарктики (китайская станция, AM419021) образуют полифилетичные ветви, куда попадают представители родов *Hafnia* (AJ846288, AJ846289, AM419021, JF313002, JF312963, JF312962, JF312950), *Aranicola* (EU196321) и *Serratia* (JF312979, JF312984,

JF312995). Учитывая низкий процент гомологии с ближайшими типовыми штаммами, большую глубину ветвления, полифилетичность полученных групп и общность их экологических условий, таксономическое положение штамма 6r1g остается открытым.



**Рис. 3. Филогенетическое древо представителей полифилетических родов *Serratia* и *Hafnia*, построенное методом объединения ближайших соседей (программы ClustalX 2.1, Mega v. 6.00) на основании данных о последовательностях фрагментов гена 16S рРНК. Последовательность собственного изолята выделена жирным шрифтом.**

Масштаб соответствует 2 заменам на 1000 п.н

С экологической точки зрения особый интерес представляет распределение микробных видов в наземных экосистемах Антарктики, прежде всего потому, что именно микроорганизмы осуществляют первичную трансформацию органических веществ, являясь в результате важным элементом в пищевой цепи флоры и фауны в низкотемпературных регионах. Поэтому мы провели соответствующий анализ. Так, из орнитогенной почвы о. Галиндез нами были изолированы *Micrococcus luteus* O-1 и *Microbacterium trichothecenolyticum* O-3. В фитоценозах о. Галиндез (Аргентинский архипелаг, Антарктика) выявлены таксономически разнообразными психротолерантные бактерии. Так, из травы *Decshampcia antarctica*, растущей на почве между камней, и на лишайнике с этих камней изолированы штаммы 4r5, 5r5 и 40r5 близкородственные *Fronidihabitans cladoniiphilus*. Их видовой статус требует уточнения, на данном этапе исследований их можно рассматривать как *Fronidihabitans* sp. И так, из семи изолятов, выделенных из фитоценозов Антарктики, три штамма оказались представителями рода *Fronidihabitans*. Поэтому мы предполагаем, что штаммы *Fronidihabitans* наиболее распространены среди аэробных хемоорганотрофных бактерий в фитоценозах Антарктики. Из мха, отобранного на биогеографическом полигоне (Антарктика, о. Галиндез), изолирован *Serratia* sp. 6r1g. Большое разнообразие бактериальных видов было обнаружено в чёрных лишайниках в различных стационарных пунктах наблюдения на южной стороне вертикальной скалы (клифа): *Rhodococcus fascians* 181n3, *Sporosarcina aquimarina* O-7, *Staphylococcus* sp. O-10. Из оранжевой биопленки обрастания на верхней точке южной стороны вертикальной скалы нами изолирован *Arthrobacter* sp. 28r5g1.

Т.о., в результате проведенного филогенетического анализа можно полагать, что наземные экосистемы о. Галиндез (Аргентинский архипелаг, Антарктика) характеризуются таксономически разнообразной микрофлорой. Часть выявленных нами в Антарктике бактерий

екологічески і філогенетически близькі ізолятам із низкотемпературних місць обитання, наприклад із різних екосистем Арктики, Антарктики, австрійських Альп. деякі антарктичні штамми близькі видам, обитаючим в регіонах з умереним кліматом, що, видимо, дозволяє передположити про контамінації полярного регіона ізвне, наприклад орнітофауною, антропогенним впливом і т.п.

**В.О. Романовська<sup>1</sup>, В.В. Парфенова<sup>2</sup>, Н.Л. Белькова<sup>2</sup>, Е.В. Суханова<sup>2</sup>,  
Г.В. Гладка<sup>1</sup>, Г.О. Таширева<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, Україна;

<sup>2</sup>Лімнологічний інститут СО РАН, Іркутськ, Росія

## **ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ БАКТЕРІЙ ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ЕКОСИСТЕМ**

### **Резюме**

На основі нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК проведено філогенетичний аналіз аеробних хемоорганотрофних бактерій з двох екстремальних регіонів (Мертве море і Західна Антарктика). Термо- і галотолерантні спороутворюючі бактерії 7т1 та 7т3 з наземних екосистем Мертвого моря ідентифіковано як *Bacillus licheniformis* та *B. subtilis subsp. subtilis*, відповідно. Термотолерантний штам 6т1 можна розглядати як *Staphylococcus* sp., враховуючи віддалене положення від близькоспоріднених штамів в кластері *Staphylococcus*. У наземних екосистемах о. Галіндез (Антарктика) виявлено таксономічно різноманітні психротолерантні бактерії. З орнітогенного ґрунту ізолювано *Micrococcus luteus* O-1 і *Microbacterium trichothecenolyticum* O-3. Штами 4r5, 5r5 і 40r5, ізолювані з трави та лишайників, можуть бути віднесені до роду *Fronidhabitans*. Ці штамми таксономічно і екологічно відокремлені від інших і на дендрограмі формують спільний кластер з трьома ізолятами *Fronidhabitans* sp., виділеними з лишайника австрійських Альп, і психротолерантним, асоційованим з рослинами *F. cladoniiphilus* CafT13<sup>1</sup>. Ізоляти з чорних лишайників різних стаціонарних пунктів спостереження на південній стороні вертикальної скелі ідентифіковані як: *Rhodococcus fascians* 181n3, *Sporosarcina aquimarina* O-7, *Staphylococcus* sp. O-10. З помаранчевої біоплівки обростання на верхній точці вертикальної скелі ізолювано *Arthrobacter* sp. 28r5g1, з моху - *Serratia* sp. 6r1g. Згідно з отриманими результатами, штамми *Fronidhabitans* є найбільш поширеними серед аеробних хемоорганотрофних бактерій у фітоценозах Антарктики.

*Ключові слова:* філогенетичний аналіз, таксономія, бактерії, екстремальні екосистеми.

**V.A. Romanovskaya<sup>1</sup>, V.V. Parfenova<sup>2</sup>, N.L. Belkova<sup>2</sup>, E.V. Sukhanova<sup>2</sup>,  
G.V. Gladka<sup>1</sup>, A.A. Tashyreva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of microbiology and virology NAS Ukraine, Kiev, Ukraine

<sup>2</sup>Limnological Institute SD RAS, Irkutsk

## **PHYLOGENETIC ANALYSIS OF BACTERIA OF EXTREME ECOSYSTEMS**

### **S u m m a r y**

Phylogenetic analysis of aerobic chemoorganotrophic bacteria of the two extreme regions (Dead Sea and West Antarctic) was performed on the basis of the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene. Thermotolerant and halotolerant spore-forming bacteria 7t1 and 7t3 of terrestrial ecosystems Dead Sea identified as *Bacillus licheniformis* and *B. subtilis subsp. subtilis*, respectively. Taking into account remote location of thermotolerant strain 6t1 from closely related strains in the cluster *Staphylococcus*, 6t1 strain can be regarded as *Staphylococcus* sp. In terrestrial ecosystems, Galindez Island (Antarctic) detected taxonomically diverse psychrotolerant bacteria. From ornithogenic soil were isolated *Micrococcus luteus* O-1 and *Microbacterium trichothecenolyticum* O-3. Strains 4r5, 5r5 and 40r5, isolated from grass and lichens, can be referred to the genus *Fronidhabitans*. These strains are taxonomically and ecologically isolated and on the tree diagram form the joint cluster with three isolates *Fronidhabitans* sp., isolated from the lichen Austrian Alps, and psychrotolerant associated with plants *F. cladoniiphilus* CafT13<sup>1</sup>. Isolates from black lichen in the different stationary observation points on the south side of a vertical cliff identified as: *Rhodococcus fascians* 181n3, *Sporosarcina aquimarina* O-7, *Staphylococcus*



sp. O-10. From orange biofilm of fouling on top of the vertical cliff isolated *Arthrobacter* sp. 28r5g1, from the moss - *Serratia* sp. 6r1g. According to the results, *Fronidhabitans* strains most frequently encountered among chemoorganotrophic aerobic bacteria in the Antarctic phytocenoses.

*Keywords.* Phylogenetic analysis, extreme regions, the bacteria, taxonomy.

1. Белькова Н.Л., Дзюба Е.В., Суханова Е.В., Ханаева Т.А. Адаптация методов молекулярно-генетического анализа для изучения микроорганизмов, ассоциированных с рыбами // Биология внутренних вод – 2008. – №2. – С. 91–94.
2. Белькова Н.Л. Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ // Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России: Учебно-методическое пособие. Под ред. Андреевой А.М. – Ярославль: Изд-во ООО «Принтхаус», 2009. – С. 53–63.
3. Романовская В.А., Таширев А.Б., Шилин С.О., Гладка Г.В. Распространение психрофильных микроорганизмов в наземных биотопах Антарктики // Микробиол. журнал. – 2012. – 74, №1. – С. 3–8.
4. Романовская В.А., Таширев А.Б., Шилин С.О., Черная Н.А., Рокитко П.В., Левишко А.С. Устойчивость к УФ радиации антарктических микроорганизмов // Микробиол. журнал. – 2011. – 73, № 3. – С. 3–8.
5. Романовская В.А., Авдеева Л.В., Гладка Г.В., Прутула И., Хархота М., Таширев А.Б. Устойчивость к экстремальным факторам микроорганизмов прибрежных экосистем Мёртвого моря // Микробиол. журнал. – 2013. – 75, № 3. – С. 3–11
6. Cardinale M, Grube M, Berg G. *Fronidhabitans cladoniiphilus* sp. nov., an actinobacterium of the family *Microbacteriaceae* isolated from lichen, and emended description of the genus *Fronidhabitans* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2011. – 61, № 12. – P. 3033–3038.
7. Greene A.C., Euzéby J.P., Tindall B.J., Patel B.K. Proposal of *Fronidhabitans* gen. nov. to replace the illegitimate genus name *Fronidicola* Zhang et al. 2007 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2009. – 59, No 2. – P. 447-448.
8. Lee S.D. *Fronidhabitans peucedani* sp. nov., an actinobacterium isolated from rhizosphere soil, and emended description of the genus *Fronidhabitans* Greene et al. 2009 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2010. – 60, № 8. – P.1740-1744.
9. Vasileva-Tonkova Evgenia, Victoria Romanovskaya, Galina Gladka, Dilnora Gouliamova, Iva Tomova, Margarita Stoilova-Disheva, Oleksandr Tashyrev. Ecophysiological properties of cultivable heterotrophic bacteria and yeasts dominating in phytocenoses of Galindez Island, maritime Antarctica // World Journal of Microbiology and Biotechnology (WJBI), принята для публикации
10. Zhang L., Xu Z., Patel B.K. *Fronidicola australicus* gen. nov., sp. nov., isolated from decaying leaf litter from a pine forest // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – 57, No 6. – P. 1177-1182.

Отримано 25.09.2013