

**В.В. Клочко, А.Н. Остапчук, Л.Н. Буценко, О.М. Онищенко,
Е.А. Киприанова**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного
НАН Украины, ул. Заболотного, 154, Киев, ГСП, Д 03680, Украина,
тел.: 8 (044) 526 23 79, e-mail: vvk@serv.imv.kiev.ua

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БАКТЕРИЙ РОДА *PSYCHROBACTER*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДЫ ЧЕРНОГО МОРЯ

Жирнокислотные спектры трех штаммов бактерий, выделенных из воды Черного моря и отнесенных, согласно данным фенотипического анализа и частичного сиквенса 16S рРНК к роду Psychrobacter, были типичными для представителей этого рода и содержали в качестве важнейших компонентов ненасыщенные жирные кислоты C18:1 (61,89 – 74,86 %), C17:1 (6,48 – 22,96 %) и C16:1 (4,58 – 7,26 %). В качестве минорных компонентов присутствовали C12:0, C16:0, C18:0, у отдельных штаммов – 12-изо-C15:0 и изо-C17:0 кислоты. Результаты фенотипических и хемотаксономических исследований свидетельствуют об отличиях черноморских изолятов от эволюционно близкого им вида P. glacincola.

К л ю ч е в ы е с л о в а: состав жирных кислот, бактерии рода Psychrobacter, Черное море.

Род *Psychrobacter* [7] с типовым видом *P. immobilis* описан в 1986 г. для граммотрицательных оксидазоположительных неферментирующих беспигментных неподвижных коккобацилл, принадлежащих к семейству *Moraxellaceae* и широко распространенных в морской и наземной среде обитания.

Психробактеры были изолированы из морской воды [8, 9], жабр и кожи рыб, морских беспозвоночных [9], пищевых продуктов и клинических источников [10]. Новые экстремофильные виды рода *Psychrobacter* были найдены в последние годы во льдах, морской воде и почвах Антарктики – в местах поселения пингвинов [4, 5].

При исследовании галофильных бактерий Черного моря нами из образцов воды, отобранных в Карадагском заповеднике, были выделены три штамма граммотрицательных неподвижных психротрофных микроорганизмов, нуждающихся в ионах натрия и отнесенных, на основании изучения их фенотипических свойств и данных частичного сиквенса 16S рРНК, к роду *Psychrobacter*. Филогенетически и фенотипически исследованные изоляты были близки экстремофильному виду *P. glacincola*, выделенному из материкового льда Антарктиды [10]. Однако они отличались от него уровнем галотолерантности, отношением к температуре и некоторыми особенностями спектров углеродного питания. Таким образом, вопрос о том, относятся ли черноморские изоляты к какому-то экотипу *P. glacincola* или принадлежат к самостоятельному виду рода *Psychrobacter*, не был решен окончательно.

© .В. Клочко, А.Н. Остапчук, Л.Н. Буценко, О.М. Онищенко, Е.А. Киприанова, 2008



Одним из важных хемотаксономических критериев, широко используемых при характеристике новых видов бактерий, является их жирнокислотный состав.

Целью настоящей работы было исследование общих жирнокислотных спектров названных бактерий с целью уточнения их таксономического положения.

Материалы и методы

Объектом исследования служили штаммы *Psychrobacter* spp. УКМ (Украинская Коллекция Микроорганизмов) В-11100, УКМ В-11101 и УКМ В-11102. Бактерии хранили на полужидкой питательной среде В для морских бактерий [3] под слоем стерильного вазелинового масла при комнатной температуре. Среда содержала г/л: пептона — 5,0; дрожжевого экстракта — 2,5; глюкозы — 1,0; K_2HPO_4 — 0,3; $MgSO_4$ — 0,05; NaCl — 12,5; агар-агар — 20; pH 7,5-7,8. Для изучения свойств бактерий, в том числе жирнокислотного состава, их высевали на скошенную агаризованную среду В и инкубировали при 26 °С. Методы фенотипических исследований, амплификации ДНК и филогенетического анализа описаны нами ранее [2].

Жирнокислотный состав клеточных липидов изучали методом хромато-масс-спектрометрии. Пробы для анализа готовили согласно методике приготовления метиловых эфиров жирных кислот бактерий [6].

Исследования проводили на хроматографе Agilent 6890N с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5973 inert (капиллярная колонка HP-5MS: 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm (J&W Scientific, USA). Объем пробы — 1,0 мкл; режим — split; газ-носитель — гелий; скорость потока — 1,0 мл/мин; начальная температура колонки — 150 °С; конечная температура колонки — 250 °С; температурный градиент — 4 °С/мин; температура интерфейса — 280 °С; тип ионизации — электронный удар; энергия ионизации — 70 эВ.

Обработку данных хромато-масс-спектрометрического анализа проводили с помощью компьютерной программы ChemStation и интегрированной базы данных масс-спектров NIST 02, а также стандарта метиловых эфиров жирных кислот бактерий (Supelco, № 4708-U, USA).

Результаты и их обсуждение

Данные ПЦР-амплификации и последующего сиквенирования участков гена 16S рРНК с длиной от 448 до 456 нуклеотидов свидетельствовали о принадлежности исследуемых микроорганизмов к роду *Psychrobacter*. Эволюционно наиболее близким к ним оказался штамм *Psychrobacter glacincola* U 85876, обнаруживший 98 % сходства последовательностей с идентичными фрагментами их 16S рРНК.

По своим фенотипическим свойствам бактерии соответствовали диагнозу рода *Psychrobacter* [7] и представляли собой аэробные, грамотрицательные неподвижные, неспорообразующие коккобациллы, каталазо- и оксидазоположительные, лишенные аргининдигидролазы, орнитин- и лизин-декарбоксилазы, не требующие дополнительных факторов роста. Они хорошо росли на простых минеральных средах и усваивали бутират, аспарагин, глютамат и пролин в качестве единственного источника углерода и энергии.

Однако, если результаты молекулярно-генетических исследований свидетельствовали об эволюционной близости черноморских культур экстремофильному *Psychrobacter glacincola*, то в их фенотипических характеристиках наблюдались определенные отличия (табл.1).



**Некоторые фенотипические отличия между черноморскими штаммами
Psychrobacter и антарктическим *Psychrobacter glacicola***

Свойство	Штаммы <i>Psychrobacter</i> из воды Черного моря	<i>P. glacicola</i> [4]
Рост в присутствии 15 % NaCl в среде	–	+
Оптимальная температура роста	+26 °С	+13÷15 °С
Усвоение в качестве единственного источника углерода:		
D-глюкозы	+	–
Сахарозы	+	–
D-фруктозы	+	–
трегалозы	+	–
целлобиозы	+	–
сорбита	+	–
l-малата	+	–

Примечание: “+” признак положителен; “–” признак отрицателен

Черноморские культуры требуют для роста ионы Na⁺ и сходны в этом отношении с *P. glacicola*. Однако, если последний выдерживает до 15 % NaCl в среде, то для большинства исследуемых бактерий максимально переносимой является в три раза меньшая концентрация. Отличия в спектрах углеродного питания двух рассматриваемых групп микроорганизмов касаются способности черноморских психробактеров усваивать углеводы и некоторые другие соединения, недоступные для антарктического вида.

Наконец, подобно другим психробактериям, черноморские изоляты — психротрофы. Однако в отличие от *P. glacicola*, для которого верхняя граница температуры роста +19÷22 °С, теоретически рассчитанный минимум — минус 18 °С, а оптимум лежит при +13÷15 °С, выделенные нами психробактеры растут при более высоких температурах.

Результаты изучения липидного состава рассматриваемых бактерий представлены в табл. 2.

Подобно остальным представителям рода *Psychrobacter* (в том числе и *P. glacicola*), черноморские изоляты отличаются наличием в своих жирнокислотных профилях трех ненасыщенных кислот — C18:1, C17:1 и C16:1, составляющих более 70 % их жирнокислотного пула. Более того, по утверждению авторов, описывавших антарктические виды [5], их жирнокислотные спектры практически идентичны и неотличимы от таковых у остальных представителей рода *Psychrobacter*.

Однако существует другая точка зрения, подтверждаемая и полученными нами данными: видовую специфику психробактерий обуславливают как количественные соотношения названных выше важнейших жирных кислот, так и минорные компоненты их жирнокислотных спектров (рис. 1).



Жирнокислотный состав черноморских психробактерий и некоторых видов рода *Psychrobacter*

Жирные кислоты	<i>Psychrobacter</i> spp.			<i>Psychrobacter submarinus</i> КММ 225 [†] [9]	<i>Psychrobacter marincola</i> КММ 277 [†] [9]
	УКМ В-11100	УКМ В-11101	УКМ В-11102		
C10:0	0	0	0	3,4	3,1
C12:0	5,272	4,08	3,08	7,1	4,4
3-ОН C12:0	0	0	0	2,1	3,1
<i>12iso</i> -C15:0	0	2,98	0	–	–
C16:0	3,08	2,94	2,80	–	–
C16:1	5,08	7,26	4,58	5,5	5,0
<i>iso</i> -C17:0	0	0	1,27	–	–
C17:1	17,15	6,48	22,96	–	–
C18:0	1,56	1,40	3,42	–	–
C18:1	67,84	74,86	61,89	78,9	84,4

Примечание: “–” данные в литературе не приводятся.

Заметим, что мы не нашли упоминания об обнаруженных нами минорных жирных кислотах в описании жирнокислотного спектра *P. glacincola* [4]. Вывод о видовой специфике липидного состава психробактерий подтверждают и представленные в табл. 2 для сравнения жирнокислотные профили двух других морских видов *Psychrobacter*.

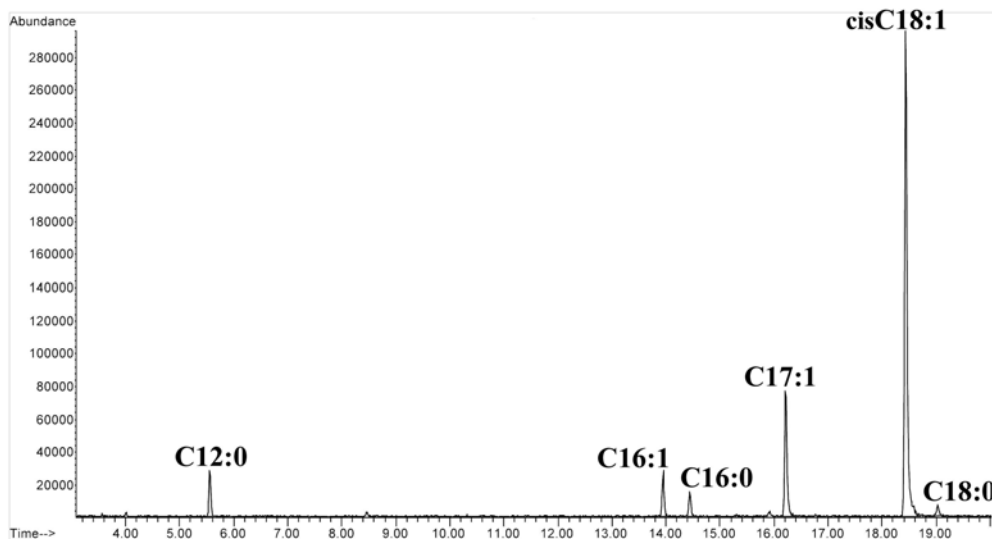


Рис. 1. Жирнокислотный спектр штамма *Psychrobacter* sp.УКМ В-11100

Fig. 1. Fatty acidic spectrum of the strain *Psychrobacter* sp. UKM B-11100

Еще более разительные отличия обнаруживаются при анализе жирнокислотного состава типового штамма *Moraxella phenylpyruvica* (в настоящее время *Psychrobacter phenylpyruvicus* [10]), содержащего в качестве минорных компонентов C14:0 и C15:0 кислоты, также 3-оксидекановую кислоту [1]. Этот вид отличается и экологией — в отличие от остальных видов психробактерий, он выделен из клинических источников.

Таким образом, бактерии, выделенные из воды Черного моря, по своим фенотипическим свойствам, результатам частичного сиквенса 16S рРНК, жирнокислотному составу являются типичными представителями рода *Psychrobacter*. В то же время, некоторые фенотипические свойства и хемотаксономические особенности (липидный состав) свидетельствуют об их существенных отличиях от эволюционно близкого экстремофильного вида *P. glacincola*, что позволяет предположить их принадлежность к новому виду рода *Psychrobacter*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васюренко З.П., Фролов А.Ф., Смирнов В.В., Рубан Н.М. Жирнокислотные профили бактерий, патогенных для человека и животных. — К.: Наукова думка, 1992. — 264 с.
2. Онищенко О.М., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Psychrobacter*, выделенные из воды Черного моря // Микробиология. — 2004. — т.73, № 2. — С. 1-2.
3. Baumann P., Baumann L. The marine Gram-negative Eubacteria // The Prokaryotes. A handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. Ed. By Starr M.P., Stolp H., Truper H. et al., Berlin: Springer-Verlag, 1986. v.2, p.1302-1331.
4. Bowman J. P., Nichols D.S., McMeekin T.A. *Psychrobacter glacincola* sp. nov., a halotolerant, psychrophilic bacterium isolated from Antarctic sea ice // Syst. Appl. Microbiol. — 1997. — v.20. — P. 209-215.
5. Bowman J.P., Cavanagh J., Austin J., Sanderson K. Novel *Psychrobacter* species from Antarctic ornitogenic soils. // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1996. — v.46. — P. 841-848.
6. Brian B.L., Gardner E.W. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas-liquid chromatography // Appl. Microbiol. — 1967. — v. 15, № 6. — P. 1499 — 1500.
7. Juni E., Heym G.A. *Psychrobacter immobilis* gen. nov. sp. nov. genospecies composed of Gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1986. — v. 36. — P. 388-391.
8. Maruyama A., Honda D., Yamamoto H., Kitamura K., Higashihara T. Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacifiensis* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2000. — v. 50. — P. 835-846.
9. Romanenko L., Schumann P., Rohde M., Lysenko A., Mikhailov V., Stackerbrandt E. *Psychrobacter submarinus* sp.nov. and *Psychrobacter marincola* sp. nov., psychrophilic halophiles from marine environments. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2002. — v. 52. — P. 1291-1297.
10. Rossau R., Van Landschoot A., Gillis M., De Ley J. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter* and *Psychrobacter* and related organisms // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1991. — v.41. — P. 310-319.



**В.В. Клочко, А.М. Остапчук, Л.М. Буценко, О.М. Онищенко,
О.А. Кіпріанова**

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, ГСП, Д 03680, Україна,
тел.: 8 (044) 526 23 79, e-mail: vvk@serv.imv.kiev.ua

ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД БАКТЕРІЙ РОДУ *PSYCHROBACTER*, ВИДІЛЕНИХ З ВОДИ ЧОРНОГО МОРЯ

Реферат

Жирнокислотні спектри трьох штамів бактерій, виділених з води Чорного моря та віднесених, згідно даних фенотипового аналізу і часткового сіквенсу 16S рРНК, до роду *Psychrobacter*, були типовими представниками цього роду і містили як найважливіші компоненти ненасичені жирні кислоти C18:1 (61,89 – 74,86 %), C17:1 (6,48 – 22,96 %) і C16:1 (4,58 – 7,26 %). Як мінорні компоненти були присутні C12:0, C16:0, C18:0, у окремих штамів – 12-ізо-C15:0 та ізо-C17:0 кислоти. Результати фенотипових і хемотаксономічних досліджень свідчать про відмінність чорноморських ізолятів від еволюційно близького їм виду *P. glacincola*.

К л ю ч о в і с л о в а: склад жирних кислот, бактерії роду *Psychrobacter*, Чорне море.

**V.V. Klochko, A.N. Ostapchuk, L.N. Butsenko, O.M. Onischenko,
E.A. Kiprianova**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, UNAS, Zabolotno str.,
154, Kiev, D 03680, Ukraine,
tel.: 8 (044) 526 11 79, e-mail: vvk@serv.imv.kiev.ua

FAT-ACIDIC COMPOSITION OF BACTERIA OF THE GENUS *PSYCHROBACTER* ISOLATED FROM THE BLACK SEA WATER

Summary

The fat-acidic spectra of three bacterial strains isolated from the Black sea water and assigned to *Psychrobacter* genus according to the phenotypical analysis and partial 16S rRNA sequence data were common for the representatives of this genus. They contained as the main components the unsaturated fatty acids: C18:1 (61,89 – 74,86 %), C17:1 (6,48 – 22,96 %) and C16:1 (4,58 – 7,26 %). C12:0, C16:0, C18:0, and in the isolated strains – 12-iso-C15:0 and iso-C17:0 fatty acids were present as the minor components. The results of phenotypical and chemotaxonomic study give evidence of the difference between the Black sea isolates and evolutionary related to them *Psychrobacter glacincola*.

К e y w o r d s: fat-acidic composition, bacteria of the genus *Psychrobacter*, the Black Sea.

