

*На правах рукописи*

**ШМАРЕВА (ПОРОШИНА) МАРИЯ НИКОЛАЕВНА**

**НОВЫЕ АЭРОБНЫЕ МЕТИЛОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ  
ИЗ СОЛЕННЫХ БИОТОПОВ**

Специальность: 03.02.03 – Микробиология

Автореферат на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Пушино 2016

Работа выполнена в лаборатории радиоактивных изотопов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) в рамках учебной программы аспирантуры 03.02.03 «Микробиология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Пущинского государственного естественно-научного института (ПушГЕНИ)

**Научный руководитель:**

**Доронина Нина Васильевна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ИБФМ РАН, профессор ПушГЕНИ, г. Пущино

**Официальные оппоненты:**

**Горленко Владимир Михайлович**, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва

**Цыганков Анатолий Анатольевич**, доктор биологических наук, зав. лабораторией биотехнологии и физиологии фототрофных организмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук (ИФПБ РАН), г. Пущино

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН), г. Пермь

Защита состоится «25» февраля 2016 г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 при ИБФМ РАН по адресу 142290, г. Пущино Московской области, Проспект Науки, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФМ РАН. Автореферат размещён на сайте <http://www.ibpm.ru/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Учёный секретарь Диссертационного совета,

доктор биологических наук



Кулаковская Т.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Аэробные метиловобактерии – группа прокариот, использующих в качестве источников углерода и энергии окисленные или замещённые производные метана, но не метан. Эта таксономически и физиологически гетерогенная группа включает представителей более 50 родов, относящихся к классам *Alpha-*, *Beta-* и *Gamma*proteobacteria, *Verrucomicrobiae*, *Firmibacteria*, *Actinobacteria* и *Flavobacteriia* (Kolb, 2009; Троценко и др., 2010; Доронина и др., 2015).

В последнее время сформировалось представление о таксономическом и структурно-функциональном многообразии умеренно галофильных аэробных метиловобактерий, их важной экофизиологической роли в различных биотопах и механизмах осмоадаптации. Аэробные умеренно галофильные метиловобактерии обнаружены в морской воде, содовых озёрах, засоленных почвах и разрушающемся мраморе. В природе метиловобактерии часто ассоциированы с метанотрофами, поскольку используют продукты неполного окисления метана – метанол, формальдегид и формиат. Кроме того, галофильные метиловобактерии образуют с гетеротрофами и растениями устойчивые метилотрофные сообщества, поставляя гетеротрофам экзометаболиты и, в свою очередь, получая факторы роста (витамины).

Целенаправленный поиск и изучение метиловобактерий, адаптированных к условиям экстремальных биотопов, актуальны для оценки биоразнообразия и роли этих бактерий в различных природных и техногенных эконившах, а также в связи с перспективами их использования в качестве модельных объектов при исследовании молекулярных механизмов адаптации и реализации биотехнологического потенциала.

**Цель и задачи исследования.** Цель данной работы – выделение и характеристика метиловобактерий из солёных природных и техногенных биотопов России и Турции.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить чистые культуры метиловобактерий из солёных биотопов Урала и национального парка Памуккале (Турция);
2. Изучить цитофизиологию и хемотаксономические признаки изолятов;
3. Провести энзимологический анализ путей  $C_1$ -метаболизма новых штаммов;
4. Идентифицировать выделенные штаммы методами полифазной таксономии;

5. Определить осмопротекторы и запасные вещества галофильных и галотолерантных метиловобактерий.

**Научная новизна работы.** Получены новые данные о биоразнообразии и метаболическом потенциале аэробных метиловобактерий из солёных биотопов. С использованием методов полифазной таксономии описаны: новый род и вид галотолерантных метиловобактерий *Methylobrevis pamukkalensis* (Poroshina *et al.*, 2015), новый род умеренных галофилов *Methyloligella*, включающий два вида: *Methyloligella halotolerans* и *Methyloligella solikamskensis* (Doronina *et al.*, 2013), три новых галотолерантных вида: *Methylopila oligotropha*, *Ancylobacter defluvii* и *Paracoccus communis* (Порошина *и др.*, 2013). Кроме того, три изолята идентифицированы как представители известных видов: умеренный галофил *Methylophaga thalassica* LS, галотолерантный штамм *Ancylobacter rudongensis* S3270 и негалофильный штамм *Arthrobacter protophormiae* 2395B (Порошина *и др.*, 2013), а один изолят – как подвид вида *Advenella kashmirensis* – *A. kashmirensis* subsp. *methylica* (Порошина *и др.*, 2015). Полученные данные расширяют представление о биоразнообразии аэробных галофильных/толерантных метиловобактерий из техногенных и природных биотопов, а также раскрывают перспективы их применения в качестве объектов биотехнологии.

**Научно-практическое значение работы.** Расширен спектр детально охарактеризованных культур аэробных метиловобактерий, устойчивых к высоким значениям солёности. Новые изоляты накапливают универсальный биопротектор эктоин (до 20% от веса сухих клеток) и биodeградебельный и биосовместимый полимер – полигидроксibuтират (ПГБ) (40–50% от веса сухих клеток), что позволяет считать их потенциальными продуцентами этих соединений на основе непищевого возобновляемого сырья – метанола. Все новые виды представлены в международных коллекциях микроорганизмов и доступны научной общественности для последующих исследований как в теоретическом, так и в прикладном аспектах.

**Апробация работы.** Основные положения диссертации доложены на 15–19-й международных школах-конференциях «Биология – наука 21 века» (Пущино, 2011–2015 гг.), на VIII и IX Молодёжных конференциях с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, ИНМИ РАН, 2012–2013 гг.), на конференциях «Экотоксикология» (Тула, 2010; 2014 гг.), ежегодных конференциях ИБФМ РАН (Пущино, 2011–2014 гг.), международной конференции «XIII Съезд общества микробиологов Украины им. С.Н. Виноградского» (Ялта, 2013).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 14 работ, из них 6 статей в рекомендованных ВАК РФ рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы данных.

**Структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, экспериментальной части, диагнозов новых таксонов, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Текст работы занимает 169 страниц, содержит 21 рисунок и 19 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 324 ссылки.

Автор искренне признателен д.б.н. (ИБФМ РАН), проф. (ПушГЕНИ) Дорониной Н.В. и зав. лабораторией радиоактивных изотопов и метилотрофии, д.б.н., проф. Троценко Ю.А. за постоянное внимание и поддержку на всех этапах работы. Автор благодарен к.б.н. Капаруллиной Е.Н., к.т.н. Ежову В.А. и всем коллегам по лаборатории за помощь при выполнении диссертационной работы, а также проф. Х.Ф. Фернандес-Гарайсабалу и д-ру А. Хибелью (Мадридский Университет Комплутенсе, Испания), любезно предоставивших штаммы *Advenella*.

Работа поддержана грантами: РФФИ № 14-04-31352-мол\_а, РФФИ №14-14-01045, РФФИ №13-04-01520-А, ГЗ №6.749.2014/к, ГК №02.740.11.0296, ГК №1.2-14-512-0025, а также проектом «УМНИК» (2010–2012 гг.).

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследования.** В работе исследованы 10 метанол-потребляющих штаммов, выделенных нами из проб почвы, ила и воды, отобранных на территории Троицкого заказника Челябинской области (53°56'15"с.ш., 61°13'34" в.д.) и г. Соликамска Пермского края (59°38'00" с.ш., 56°46'00" в.д.), а также из проб воды и ризосферы осоки, отобранных на территории национального парка Памуккале (Иераполис, Турция) (37°57'19"с.ш., 29°4'41"в.д.). Культуры выращивали при 29°C на минеральных средах с добавлением 0,5% (об/об) метанола: “К”+3% NaCl и MAMS (Schäfer, 2007), а также их модифицированных вариантах для культивирования в ферментёре АНКУМ-2М (НПО «Биоприбор» РАН).

**В качестве референтных штаммов** в работе использовали коллекционные штаммы *Methylophaga thalassica* ВКМ В-2057<sup>T</sup>, *Ancylobacter rudongensis* AS1.1761<sup>T</sup>, *Ancylobacter oerskovii* DSM 18746<sup>T</sup>, *Paracoccus denitrificans* ВКМ В-1320<sup>T</sup> и *Arthrobacter protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>T</sup>, а также *Advenella kashmirensis* WT001<sup>T</sup>, *A. incenata* CCUG 45225<sup>T</sup> и *A. incenata* 4GA2008. Получение накопительных и выделение чистых культур проводили на среде “К” с 3% NaCl (в/об) и 1% (об/об) метанола, как описано ранее (Доронина и др., 2005).

**Культуральные, цито-морфологические и физиологические свойства** определяли по стандартным методикам (Doronina *et al.*, 2012; 2013). Морфологию и подвижность клеток изучали с помощью оптической фазово-контрастной микроскопии; ультраструктуру – методом электронной микроскопии (Ivanova *et al.*, 2007).

**Хемотаксономические признаки** определяли у культур, выращенных на среде “К”, MAMS или, в случае использования типового штамма типового вида рода *Advenella*, не растущего на метаноле, – на глюкозо-пептонном агаре. Убихиноны экстрагировали по известной методике (Collins, 1977) и очищали методом ТСХ (Collins, 1985) с последующим анализом. Состав фосфолипидов клеток определяли методом ТСХ (Doronina *et al.*, 2012) с применением специфических красителей (Kates, 1972). Состав бактериальных жирных кислот определяли, как описано ранее (Doronina *et al.*, 2012). Осмопротекторы анализировали методами ТСХ (Доронина *и др.*, 1998) и нормально-фазовой ВЭЖХ (Ешинимев *и др.*, 2007). Содержание сахарозы в биомассе определяли по методу Handel (1968).

**Активности ферментов** определяли ранее описанными методами (Trotsenko *et al.*, 1986; Doronina *et al.*, 2003; Доронина *и др.*, 2008).

Протеомный **МАЛДИ анализ** проводили согласно описанной методике (Hornegger *et al.*, 2004) с использованием времяпролетного Autoflex speed масс-спектрометра с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF-MS) (“Bruker Daltonik GmbH”, Германия). **Аминокислотный состав** определяли на анализаторе Eppendorf Biotronic LC 2000 (Германия) в соответствии со стандартной процедурой.

**Выделение и анализ ДНК.** ДНК выделяли и очищали по методу Мармура (Marmur, 1961) с последующим анализом. Гены, кодирующие 16S рРНК (Lane, 1991), большую субъединицу метанолдегидрогеназы – *mxaF* (McDonald *and* Murrell, 1997), амплифицировали с использованием опубликованных праймерных систем. Очистка и определение нуклеотидных последовательностей ампликонов проведены, как описано ранее (Doronina *et al.*, 2012). Перевод нуклеотидных последовательностей в аминокислотные осуществляли с использованием программы GeneRunner, версия 5.0 [Hastings Software, Inc.].

**RAPD-ПЦР анализ** (метод случайно амплифицируемой полиморфной ДНК) проводили, используя праймер OPQ6 (Balachandar *et al.*, 2008).

**Филогенетический анализ.** Предварительный скрининг сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК исследуемых штаммов по базе данных GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>] проводили с помощью

пакета программ BLAST [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>], а также веб-инструмента EzTaxon на сервере EzBioCloud [<http://www.ezbiocloud.net/>]. Для более точного определения филогенетического положения изолятов нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК и аминокислотные последовательности белка MxaF выравнивали с соответствующими последовательностями референтных штаммов ближайших прокариот с помощью программы CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1997). Филограммы строили при помощи программ MEGA, версия 5 (Tamura *et al.*, 2011) методом “neighbor-joining” (Saitou and Nei, 1987). Эволюционное расстояние рассчитывали как число замен на 100 нуклеотидов. Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных филограмм, используя соответствующие функции программы MEGA. При классификации бактериальных изолятов как новых таксонов на уровне рода и вида учитывали пороговые значения сходства последовательностей генов 16S рРНК, равные 95 и 98,65%, соответственно, по сравнению с их валидно опубликованными филогенетическими соседями (Tindall *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2014). Для разделения на уровне вида учитывали пороговое значение ДНК-ДНК сходства – 70% (Wayne *et al.*, 1987; Tindall *et al.*, 2010).

**Культивирование продуцентов полигидроксиалканоатов** в ферментёрах, экстракцию ПГБ/В хлороформом из биомассы, вискозиметрическое определение молекулярной массы (Мм) ПГБ/В, содержание гидроксивалерата в сополимере методом обращённо-фазовой ВЭЖХ, дифференциальный термический анализ физико-химических свойств биополимеров проводили, как описано ранее (Ежов *и др.*, 2013).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

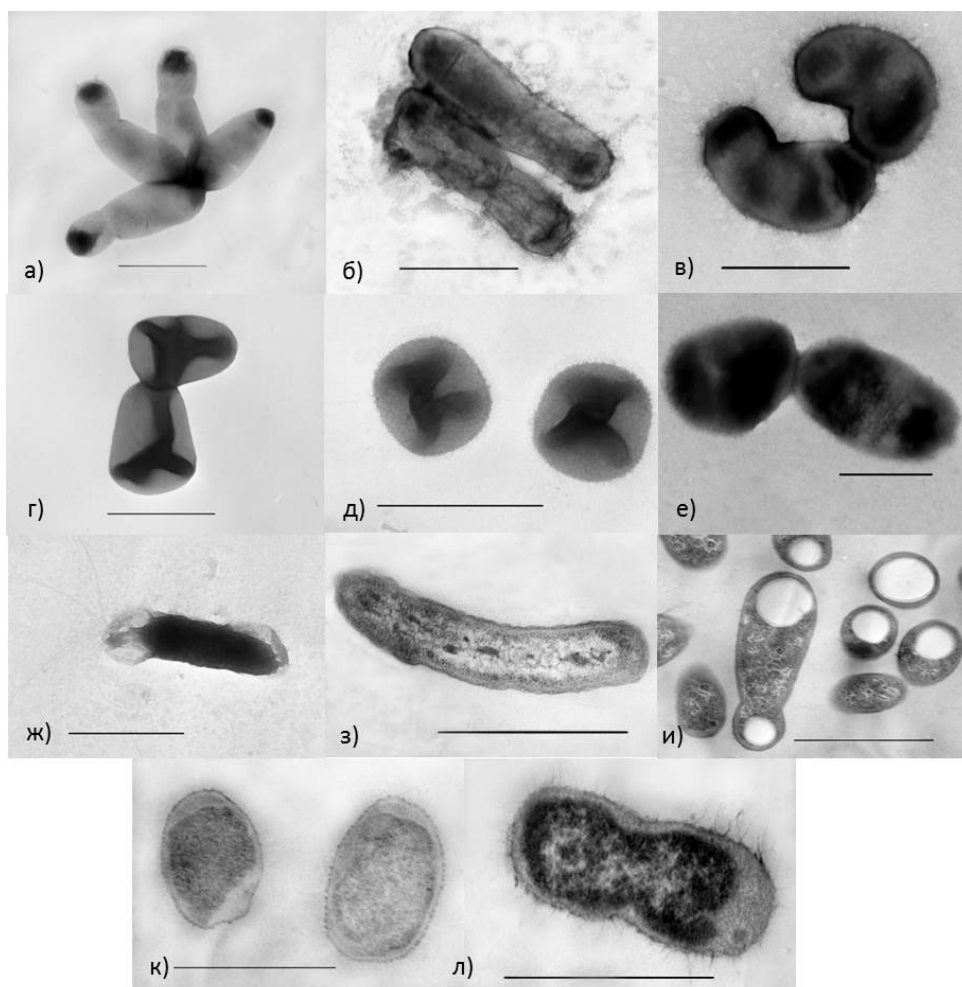
### ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТИЛОБАКТЕРИЙ ИЗ БИОТОПОВ УРАЛА

**Морфология изолятов.** Исследованные в работе изоляты представлены грамтрицательными (штаммы LS, S3<sup>T</sup>, C2<sup>T</sup>, SK12<sup>T</sup>, SK15<sup>T</sup>, S3270, 2395A<sup>T</sup>) и грамположительными (штамм 2395B) клетками, размножающимися бинарным делением (рис. 1). Штамм C2<sup>T</sup> накапливает внутриклеточно гранулы ПГБ (рис. 1, а, и), штаммы SK12<sup>T</sup> и S3<sup>T</sup> имеют полисахаридные капсулы (рис. 1, б, л). Клетки штаммов 2395A<sup>T</sup> и LS (рис. 1, е, ж) – монотрихи.

**Культуральные, физиолого-биохимические свойства и хемотаксономические признаки.** Все штаммы в качестве источника углерода используют метанол; штаммы LS, S3<sup>T</sup>, C2<sup>T</sup>, SK12<sup>T</sup>, 2395A<sup>T</sup>, 2395B, но не S3270 и SK15<sup>T</sup>, используют метиламин. Штаммы S3<sup>T</sup>, 2395A<sup>T</sup>, 2395B, SK15<sup>T</sup> и S3270 – факультативные метилобактерии, штамм LS – ограниченно-факультативный метилотроф, штаммы C2<sup>T</sup> и SK12<sup>T</sup> – облигатные метилотрофы.

Штаммы SK15<sup>T</sup> и S3270 способны к автотрофному росту в атмосфере H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Штаммы C2<sup>T</sup>, SK12<sup>T</sup>, LS, S3<sup>T</sup>, 2395A<sup>T</sup> и 2395B синтезируют индолы (0,5–4 мкг/мл). Оптимум роста всех изолятов наблюдается при концентрации 0,5% метанола в среде. В составе фосфолипидов клеток преобладают фосфатидилэтаноламин (ФЭА) и фосфатидилхолин, присутствуют также фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерин (кардиолипин) (ДФГ). В составе жирных кислот клеток изучаемых штаммов (табл. 1) преобладает цис-11-октадеценовая кислота (36,7–78,0%). Помимо указанной доминирующей кислоты, для штамма S3 характерно наличие гексадекановой кислоты (14,0%), штаммов C2<sup>T</sup>, SK12<sup>T</sup>, S3270, SK15<sup>T</sup>, 2395A<sup>T</sup> и 2395B – циклопропан-нонадекановой кислоты (11,6; 28,7; 5,4; 12,3; 10,0 и 12,4%, соответственно).

Все штаммы, кроме LS, C2<sup>T</sup> и SK12<sup>T</sup>, имеют оптимум роста при ~1% NaCl: негалофильные штаммы: 2395B (выдерживают до 3%), S3270 (до 6%), галотолерантные изоляты 2395A<sup>T</sup>, S3<sup>T</sup>, SK15<sup>T</sup> (до 10 % NaCl). Умеренные галофилы LS, C2<sup>T</sup> и SK12<sup>T</sup> выдерживают до 16–17% NaCl (оптимум 3–5% NaCl) (табл. 1).



**Рис. 1.** Морфология и ультраструктура клеток изучаемых штаммов: а, и – C2<sup>T</sup>, б – SK12<sup>T</sup>, в – S3270, г – 2395B, д, л – S3<sup>T</sup>, е – 2395A<sup>T</sup>, ж, з – LS, к – SK15<sup>T</sup>. Негативный контраст: а – ж; ультратонкие срезы: з – л. Длина масштабной метки 1 мкм



**Таблица 1.** Характеристика аэробных метиловых бактерий, выделенных из биотопов Урала.

Характеристика	LS	2395B	S3270	SK15 <sup>T</sup>	S3 <sup>T</sup>	2395A <sup>T</sup>	SK12 <sup>T</sup>	C2 <sup>T</sup>	
Тип метилотрофии	Ограниченно-факультативный	Факультативный					Облигатный		
Ростовой субстрат:									
метанол		+	+	+	+	+	+	+	+
метиламин		+	+	-	-	+	+	+	+
диметиламин		-	+	-	-	+	+	-	+
глюкоза		-	-	+	+	+	-	-	-
фруктоза		+	+	+	+	+	+	-	-
Восстановление NO <sub>3</sub> в NO <sub>2</sub>		-	+	+	+	-	-	-	-
Гидролиз желатины		-	+	-	-	+	-	-	-
Гидролиз крахмала		+	+	+	+	+	+	+	+
Уреаза		-	-	+	-	-	+	-	-
Автотрофный рост		-	-	+	+	-	-	-	-
Путь C <sub>1</sub> -ассимиляции		<b>PMФ, КДФГ</b>	<b>PMФ, ФБФА</b>	<b>РБФ</b>			<b>Сериновый, ицл<sup>-</sup></b>		
Доминирующие жирные кислоты	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:1w7c</sub> , C <sub>19:0 cys</sub>	C <sub>18:1w7c</sub> , C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:1w7c</sub> , C <sub>19:0 cys</sub>	C <sub>18:1w7c</sub> , C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:1w7c</sub>	C <sub>19:0 cys</sub>		
Диапазон NaCl, % (оптимум)	1–17 (3)	0,5–3 (1)	0–6 (1)	1–10 (1)	0,5–0 (1)	0,5–5 (1)	0,5–17 (3–5)		
Содержание Г+Ц в ДНК, мол.%	44,0	н.о.	66,2	65,0	64,5	67,0	60,5	60,9	
Класс	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>						

Примечание: н.о. – не определяли, **PMФ** – рибулозомонофосфатный путь, **РБФ** – рибулозобисфосфатный путь, **ицл<sup>-</sup>** – изоцитратлиаза-отрицательный вариант серинового пути, **КДФГ** – 2-кето-3-дезоксиглюконоатный вариант **PMФ**-пути, **ФБФА** – фруктозо-бисфосфатальдозазный вариант **PMФ**-пути.

Методами ТСХ и ВЭЖХ у галотолерантных и умеренно-галофильных изолятов (S3<sup>T</sup>, LS, C2<sup>T</sup> и SK12<sup>T</sup>) выявлено накопление эктоина (13–18% от веса сухих клеток) при увеличении внешней концентрации соли (8–10% NaCl) (табл. 2).

В клетках штамма C2<sup>T</sup> в качестве минорных осмопротекторов при 5% NaCl в среде обнаружены незначительные количества глутамата, глутамина и сахарозы (2,5, 6,5 и 5% от веса сухой биомассы, соответственно).

**Таблица 2.** Внутриклеточный пул эктоина у метиловых бактерий, выращенных при разной солёности.

Концентрация NaCl, %	Содержание эктоина [мкг/мг сухого веса клеток]				
	Штамм				
	C2 <sup>T</sup>	SK12 <sup>T</sup>	S3 <sup>T</sup>	LS	PK2
1,5	0	0	0	0	0
5	140		55	11	62
8–10	180	135	н.о.	95	н.о.

Примечание: н.о. – не определяли.

**Энзимологический анализ.** В экстрактах клеток исследуемых штаммов выявлены активности дегидрогеназ метанола (исключение – штамм 2395В), формальдегида и формиата. Штаммы C2<sup>T</sup>, SK12<sup>T</sup>, 2395А<sup>T</sup> реализуют ицл-вариант серинового пути. Штамм LS реализует 2-кето-3-дезоксид-6-фосфоглюконатный (КДФГ) вариант, а штамм 2395В – фруктозо-бисфосфатальдозазный (ФБФА) вариант РМФ пути. Штаммы S3<sup>T</sup>, SK15<sup>T</sup> и S3270 реализуют РБФ путь.

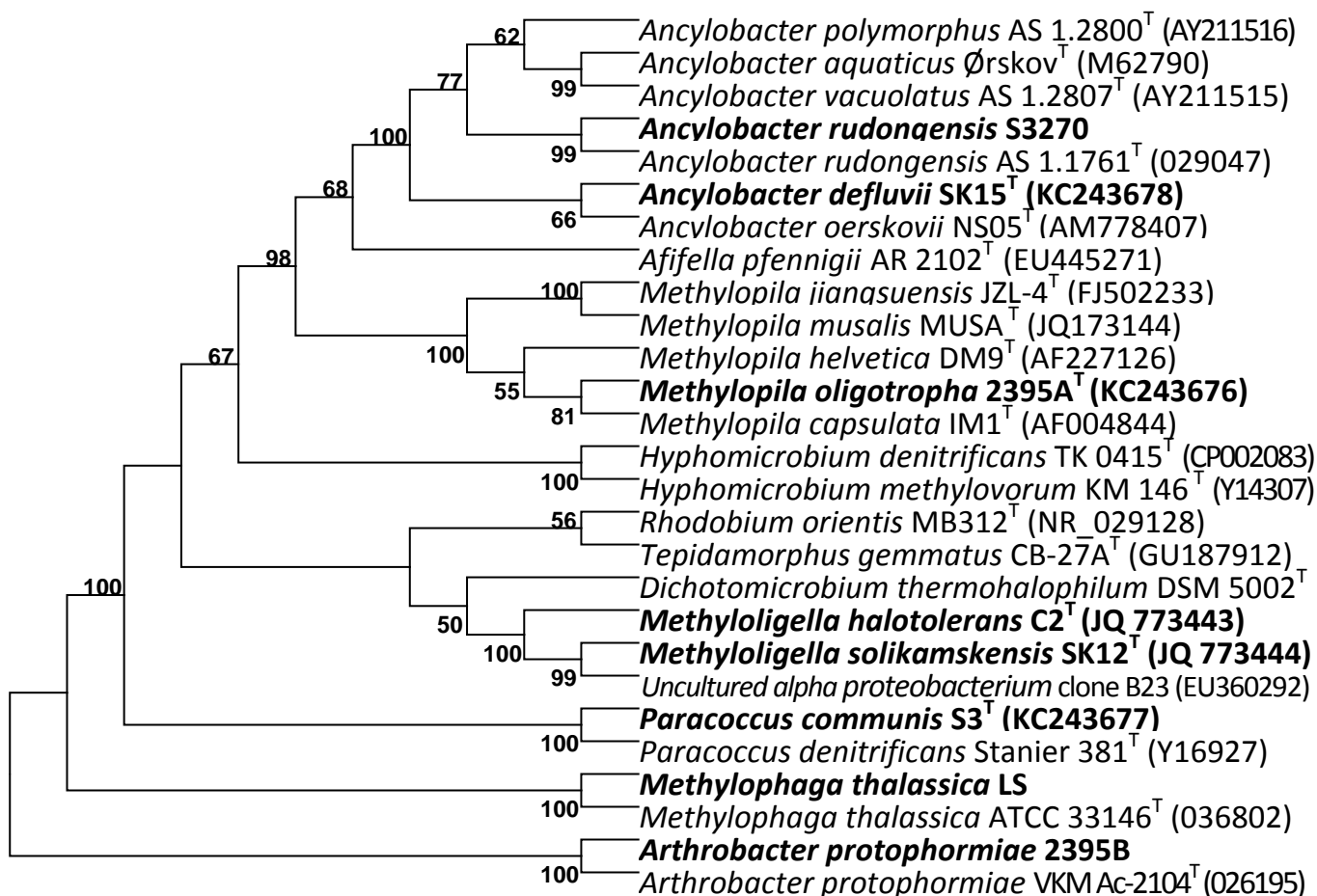
**Филогенетический анализ штаммов.** Штаммы LS, 2395В и S3270 отнесены к видам: *Methylophaga thalassica* ВКМ В-2057<sup>T</sup>, *Arthrobacter protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>T</sup> и *Ancylobacter rudongensis* DSM 17131<sup>T</sup>, на основании фенотипических признаков, сходства последовательностей генов 16S рРНК (99,9, 100 и 99,8%, соответственно), а также сходства по ДНК-ДНК гибридизации (100, 100 и 78% соответственно) (рис. 2).

Штамм SK15, имевший 97,8–98,3% сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК среди представителей рода *Ancylobacter* и лишь 29–32% ДНК-ДНК сходства с наиболее близкими филогенетическими соседями – *A. rudongensis* и *A. oerskovii*, отнесён к новому виду *Ancylobacter defluvii* (Порошина и др., 2013).

Штамм S3, имевший с *Paracoccus denitrificans* ВКМ В-1320<sup>T</sup> 97,8% сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и 42% ДНК-ДНК сходства, отнесён к новому виду *Paracoccus communis* (Порошина и др., 2013).

Штамм 2395A<sup>T</sup> имел 98,2–98,5% сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с представителями рода *Methylophila*, но лишь 56% ДНК-ДНК сходства с наиболее близкими соседями, что позволило отнести его к новому виду – *Methylophila oligotropha* (Порошина и др., 2013).

Согласно филогенетическому анализу генов 16S рРНК в программе MEGA и расчётам на серверах BLAST и EzBioCloud, штаммы C2<sup>T</sup> и SK12<sup>T</sup> принадлежат к классу *Alphaproteobacteria*, порядку *Rhizobiales*, но уровень сходства последовательностей генов 16S рРНК с ближайшими валидными родственниками составляет <94%. Исключением является нуклеотидная последовательность клона В23-01 (EU360292), выделенного из вод Тихого океана (~99%). Уровень ДНК-ДНК сходства между штаммами C2<sup>T</sup> и SK12<sup>T</sup> ≤53%, что свидетельствует об их видовом отличии в пределах одного рода. Это согласуется с результатами RAPD-анализа и фенотипическими признаками.



**Рис 2.** Филограмма изолятов, основанная на сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК

Кроме того, умеренно галофильные изоляты C2<sup>T</sup> и SK12<sup>T</sup> имеют чёткие отличия от известных представителей *Alphaproteobacteria*, в том числе метиловых бактерий с сериновым путём из родов *Methylobacterium* (Bousfield and Green,

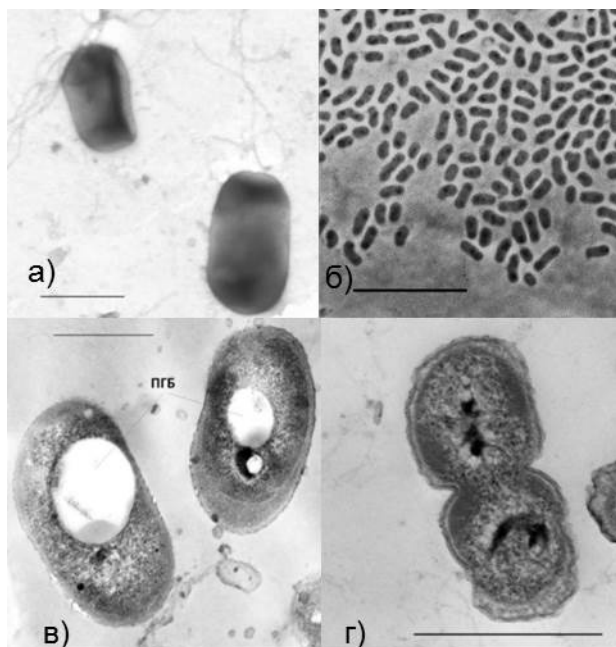
1985), *Aminobacter* (Urakami *et al.*, 1992), *Albibacter* (Doronina *et al.*, 2001), *Hyphomicrobium* (Gliesche *et al.*, 2005), *Methylorhabdus* (Doronina *et al.*, 1995) и *Methylopila* (Doronina *et al.*, 1998), в морфологии и физиолого-биохимических свойствах. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белка МхаF демонстрирует высокий уровень сходства штаммов С2<sup>T</sup> и SK12<sup>T</sup> не только между собой (90%), но и с представителями рода *Hyphomicrobium* (75–79%).

Согласно полученным данным, оба изолята отнесены к разным видам нового рода *Methyloligella* (Doronina *et al.*, 2013): *Methyloligella halotolerans* и *Methyloligella solikamskensis* (см. раздел «Диагнозы новых таксонов»). Новые умеренно галофильные виды рода *Methyloligella* представляют биотехнологический интерес, поскольку синтезируют осмопротектор эктоин и ПГБ.

### ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТИЛОБАКТЕРИЙ ИЗ ПАМУККАЛЕ

Из проб, отобранных на территории национального парка Памуккале (Турция), выделены в чистую культуру на среде с метанолом два изолята метилотрофных бактерий: штамм РК1 – из ризосферы осоки и штамм РК2<sup>T</sup> – из образца воды.

**Морфология.** Клетки изолятов – короткие грамотрицательные палочки, подвижные у штамма РК2<sup>T</sup> (0,7–1×1,5–2 мкм), и неподвижные – у штамма РК1 (0,3–0,35×0,4–0,45 мкм) (рис. 3).



**Рис. 3.** Морфология и ультраструктура штаммов РК2<sup>T</sup> (а–в) и РК1 (г). Негативный контраст (а); фазовый контраст (б); ультратонкие срезы (в, г). Длина масштабной метки: а – 1 мкм; б – 10 мкм; в, г – 0,5 мкм

Клетки изолята РК2<sup>T</sup> формируют розетки и накапливают гранулы ПГБ.

**Культуральные, физиолого-биохимические свойства и хемотаксономические признаки.** Оба штамма – строгие аэробы. Факторы роста: для штам-

ма РК1 – фолиевая кислота, для штамма РК2<sup>T</sup> – биотин. Штаммы РК1 и РК2<sup>T</sup> являются типично факультативным и ограниченно-факультативным метилотрофами, соответственно (табл. 3).

**Таблица 3.** Характеристика аэробных метиловобактерий, выделенных из турецкого биотопа.

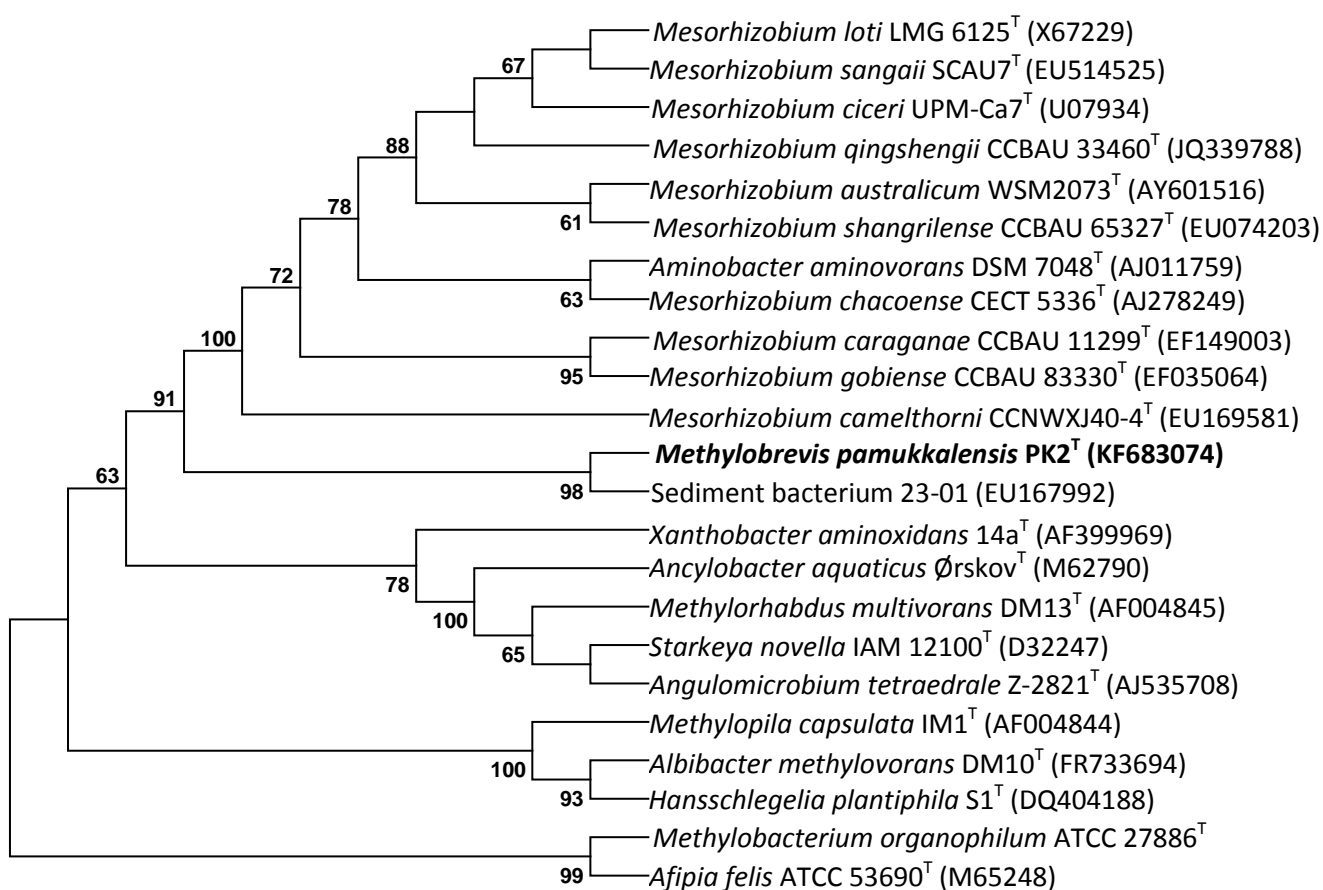
<b>Признак</b>	<b>Штамм РК1</b>	<b>Штамм РК2<sup>T</sup></b>
Тип метилотрофии	Факультативный	Ограниченно-факультативный
Ростовые субстраты:		
метанол, метиламин	+	+
диметиламин, мочеви́на	-	-
маннит	-	+
глюкоза, сукцинат, ацетат, фумарат, малат, глутамат, мальтоза, рафиноза, ксилоза, серин, аланин	+	-
Восстановление NO <sub>3</sub> в NO <sub>2</sub>	-	-
Гидролиз желатины	-	-
Гидролиз крахмала	+	+
Каталаза, оксидаза	+	+
Уреаза, β-глюкозидаза	-	+
Путь C <sub>1</sub> -ассимиляции	<b>РБФ</b>	Сериновый, ицл <sup>+</sup>
Доминирующие жирные кислоты		
C <sub>18:1ω7</sub>	31,3	47,0
C <sub>16:1ω7c</sub>	29,2	13,0
Диапазон NaCl (оптимум), %	0–1 (0,5)	0–6 (1)
Основные фосфолипиды	<b>ФЭА и ДФГ</b>	<b>ФЭА и ФМЭА</b>
Содержание Г+Ц в ДНК, мол.%	55,6	67,9
Синтез индолов, мкг/мл	3,8	-
Основной хинон	Q <sub>8</sub>	Q <sub>10</sub>
Класс	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Alphaproteobacteria</i>	

Примечание: **ФЭА** – фосфатидилэтанолламин, **ДФГ** – дифосфатидилглицерин, **ФМЭА** – фосфатидилмонометилэтанолламин.

Оптимальная концентрация NaCl в среде для негалофильного штамма РК1 – 0,5%, рост ингибируют 2% NaCl. Галотолерантный штамм РК2<sup>T</sup> (оптимум 1% NaCl) хорошо растёт при 4% NaCl и выдерживает до 6–8% NaCl. Оба штамма растут оптимально при слабощелочном pH (8,0). В составе фосфолипи-

дов клеток штамма РК1 преобладают ФЭА иДФГ, штамма РК2<sup>T</sup> – ФЭА, ФМЭА, фосфатидилглицерин и минорное количество неидентифицированного фосфолипида (табл. 3).

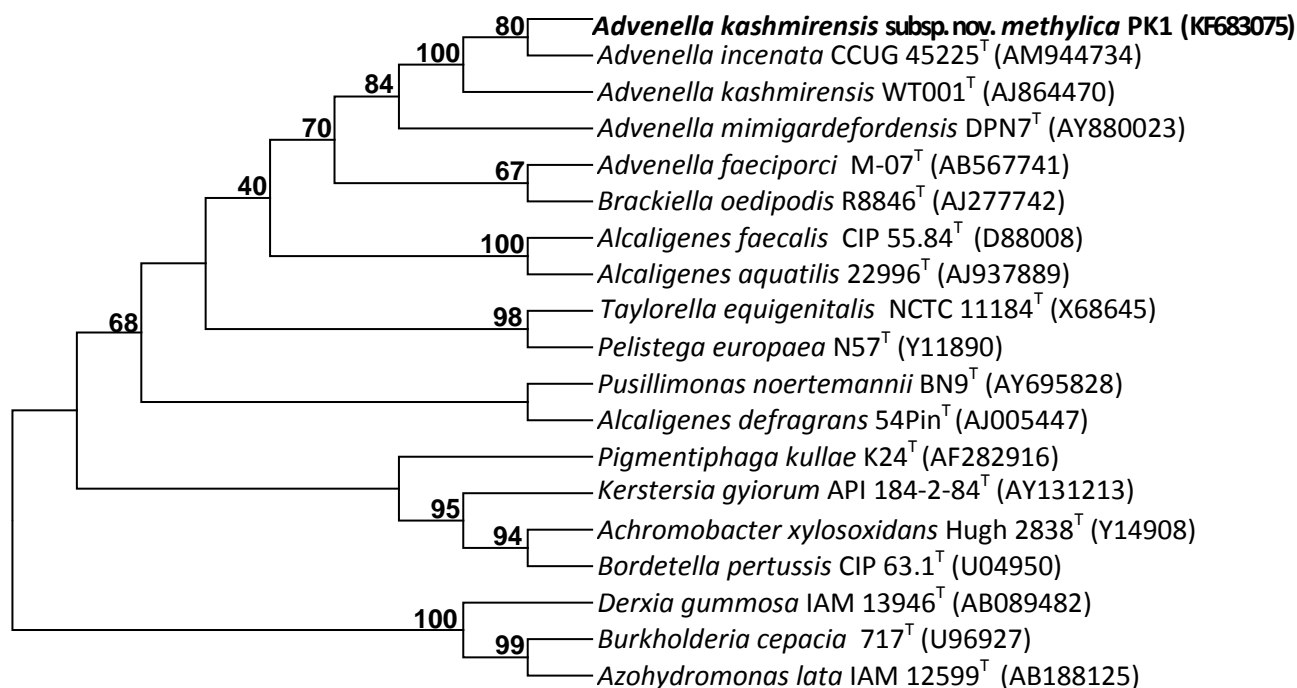
**Филогенетический анализ.** Секвенирование последовательности гена 16S рРНК изолята РК2<sup>T</sup> выявило его принадлежность к порядку *Rhizobiales*, но филогенетический анализ показал низкий процент сходства (82–94%) с его представителями. Изолят РК2<sup>T</sup> имеет 96% сходства с некультивируемой пирендеградирующей бактерией из речных отложений – штаммом 23-01 (Hilyard *et al.*, 2008). Однако среди валидно описанных таксонов штамм РК2<sup>T</sup> отдалённо связан с *Mesorhizobium gobiense* ССВАУ 83330<sup>T</sup> (Han *et al.*, 2008) и имеет с ним 94% сходства последовательностей 16S рРНК. Филогенетические связи между штаммом РК2<sup>T</sup> и представителями порядка *Rhizobiales* приведены на рис. 4.



**Рис. 4.** Филограмма штамма РК2<sup>T</sup> среди представителей порядка *Rhizobiales*, основанная на сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК

Таким образом, на основании цитофизиологических, хемотаксономических, биохимических и генетических характеристик штамм РК2<sup>T</sup> предложен как типовой штамм нового рода и вида *Methylobrevis pamukkalensis* (Poroshina *et al.*, 2015). Секвенирование гена 16S рРНК штамма РК1 выявило ~99% сходства с видами рода *Advenella*, а ДНК-ДНК гибридизация –70%-ный уровень сход-

ства с типовой культурой *A. kashmirensis* WT001<sup>T</sup>, что, с учётом их фенотипических отличий, позволило отнести его к новому подвиду этого вида – *A. kashmirensis* subsp. nov. *methylica*. **Дифференцирующие признаки нового подвид.** Помимо обнаружения ключевой особенности – способности к метилотрофии – были выявлены заметные отличия в профиле жирных кислот: штамм РК1 содержит 6,40% C<sub>19:0cyc</sub>, отсутствующей в клетках штамма *A. kashmirensis* WT001<sup>T</sup>, но не имеет C<sub>12:0</sub>, характерной для *A. kashmirensis* WT001<sup>T</sup> (3,12%). В отличие от типового штамма *A. kashmirensis* WT001<sup>T</sup>, растущего при 6% NaCl, метилотрофный изолят РК1 растёт в диапазоне 0 ≤ 2% NaCl, потребляет метанол, α-кетоглутарат и лактат, гидролизует крахмал; не растёт хемолитоавтотрофно на кристаллической сере, тиосульфате или тетрагидрате, не имеет активности уреазы, не восстанавливает нитраты до нитритов. **RAPD- и МАЛДИ-анализы.** Согласно результатам RAPD-анализа, профиль продуктов случайной амплификации ДНК штамма РК1 явно отличается от таковых штаммов *Advenella* бóльшим количеством полос и их Мм. В то же время, на дендрограмме, построенной по результатам МАЛДИ-анализа белков, штамм РК1 кластеризуется с *A. kashmirensis* WT001<sup>T</sup>. Итак, по совокупности полученных гено- и фенотипических признаков, предложено разделить вид *A. kashmirensis* на два подвиды и отнести штамм РК1 к новому метилотрофному подвиду – *A. kashmirensis* subsp. nov. *methylica* (рис. 5). Описание этого подвиды приведено в разделе «Диагнозы новых таксонов».



**Рис. 5.** Филограмма штамма *Advenella kashmirensis* subsp. nov. *methylica* РК1, основанная на сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК

## СИНТЕЗ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ МЕТИЛОБАКТЕРИЯМИ ИЗ МЕТАНОЛА

Сравнительное изучение биосинтеза **ПГБ** метиловобактериями *Methylobacterium extorquens* G10, реализующими сериновый путь C<sub>1</sub>-метаболизма, показало, что они синтезировали полимеры с разными молекулярными массами (**Мм**) и физико-химическими свойствами (табл. 4), несмотря на сходство уровней активностей ферментов метаболизма метанола и биосинтеза **ПГБ**. Показано, что у *Methylobacterium extorquens* G10 **Мм** биополимера, синтезированного из смеси метанола и пентанола – полигидроксибутиролатерата (**ПГБВ**), значительно возросла (до 700 кДа) по сравнению с **ПГБ**, синтезированным только на чистом метаноле (150–200 кДа). Напротив, использование в качестве источника углерода смеси метанола с пентанолом для метилотрофа *Methylobacterium extorquens* G10 снижало **Мм** биополимера с 3300 кДа (**ПГБ**) до 1600 кДа (**ПГБВ**).

При оптимизации условий культивирования *Methylobacterium extorquens* G10 в аппаратах АНКУМ-2М **Мм** **ПГБ** достигала 10 млн Да. Продукт *Methylobacterium extorquens* G10 также синтезировал высокомолекулярный (1 млн Да) **ПГБ**, что нехарактерно для ранее изученных метилотрофов.

**Таблица 4.** Физико-химические свойства **ПГБ** метилотрофных продуцентов, выращенных на метаноле.

Характеристика	<i>M. halotolerans</i> C2 <sup>T</sup>	<i>M. extorquens</i> G10
Мм полимера, Да	3,3×10 <sup>6</sup>	15,0×10 <sup>4</sup>
Температура плавления, °С		
Пик I	183,0	176,3
Пик II	-	165,9
Температура кристаллизации, °С	74,7	80,2
Энтальпия плавления	234,6	78,7
Энтальпия кристаллизации	167,9	36,2
Степень кристалличности, %	71,0	67,0

Примечание: **Мм** – молекулярная масса.

С учётом свойств **ПГБ**, наработанные образцы биопластиков прошли успешные испытания в НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН (Кемерово) при изготовлении противоспаечных мембран и биодegradабельных туннелей, имплантации проводящих нервных пучков (**ПГБВ** штамма *Methylobacterium extorquens* G10) и стентов (**ПГБ** штаммов *Methylobacterium extorquens* G10 и *Methylobacterium extorquens* G10).



## ДИАГНОЗЫ НОВЫХ ТАКСОНОВ

### Род *Methyloligella* Doronina et al., 2013.

*Methyloligella* (me.thyl.o.li.gel'la. Fr. *methyle*, метильная группа; N.L. pref. *methylo-*, метильный радикал; Gr. adj. *oligos*, немногий, малочисленный, скудный; L. dim. ending *-ella*, маленький; N.L. fem. dim. n. *Methyloligella*, бактерии с ограниченным спектром ростовых субстратов).

Клетки – неспорообразующие грамотрицательные неподвижные, собранные в розетки, размножаются бинарным делением. Строго аэробные, умеренно галофильные, облигатно метилотрофные бактерии. Ассимилируют  $C_1$ -соединения сериновым путём. Не растут на метане. Каталазо- и оксидазоположительные. Не растут на богатых средах: глюкозо-пептонном агаре, среде LB. Накапливают внутриклеточно ПГБ, а при концентрации  $>3\%$  NaCl – осмопротектор эктоин. Доминирующий хинон –  $Q_{10}$ . Жирные кислоты –  $C_{18:1\omega7c}$  и  $C_{19:0cyc}$ . Основные фосфолипиды – фосфатидилэтаноламин, фосфатидилдиметилэтаноламин, фосфатидилглицерин и фосфатидилхолин. Содержание Г+Ц в ДНК составляет 60–61 мол.%. Род принадлежит к классу *Alphaproteobacteria*. Типовой вид – *Methyloligella halotolerans*<sup>T</sup>. Типовой штамм *Methyloligella halotolerans* C2<sup>T</sup> (= ВКМ В-2706<sup>T</sup> = CCUG 61687<sup>T</sup> = DSM 25045<sup>T</sup>).

### *Methyloligella halotolerans* Doronina et al., 2013.

*Methyloligella halotolerans* (ha.lo.to'le.rans. Gr. n. *hals halos*, соль; L. part. adj. *tolerans*, устойчивость; N.L. part. adj. *halotolerans*, солеустойчивый).

В дополнение к родовому описанию изолят обладает следующими свойствами. Клетки – неподвижные кеглеобразные палочки, собранные в розетки (0,5–0,6×1,6–1,7 мкм). Облигатный метилотроф, хорошо растёт на метаноле и метиламине, слабо – на диметиламине. Реализует сериновый (ицл) путь  $C_1$ -метаболизма. Растёт при pH 6,0–10,0 (оптимум pH 7,0–8,0), 16–40°C (оптимум 29°C). Умеренный галофил, растёт при концентрации 0–16% NaCl, оптимум 3–5%. Источниками азота служат аммоний, метиламин и диметиламин. Содержание Г+Ц в ДНК типового штамма составляет 60,9 мол.% (Г<sub>пл</sub>).

Типовой штамм, C2<sup>T</sup> (=ВКМ В-2706<sup>T</sup>=CCUG 61687<sup>T</sup>=DSM 25045<sup>T</sup>), выделен из образца солёной почвы (Троицкий заказник, Челябинская область, Россия). Последовательности генов 16S рРНК и *mxaF* штамма C2<sup>T</sup> депонированы в GenBank под номерами JQ773443 и JQ796869, соответственно.

### *Methyloligella solikamskensis* Doronina et al., 2013.

*Methyloligella solikamskensis* (so.li.kamsk.en'sis. N.L. fem. adj. *solikamskensis*, относящийся к г. Соликамску, месту выделения типового штамма).

Следующие свойства приведены в дополнение к характеристикам, описанным для рода. Клетки – кеглеобразные палочки (0,4–0,6×1,8–2,0 мкм), расположенные по отдельности или в парах, формируют розетки. Облигатный метилотроф, использует метанол и метиламин, но не диметиламин. Реализует **ицл**-вариант серинового пути. Растёт при pH 6,5–10,0 (оптимум при pH 7,5), 16–40°C (оптимум 29°C). Умеренный галофил. Диапазон роста 0–16% NaCl (оптимум 3–5%). В качестве источников азота использует аммоний и метиламин. Г+Ц состав ДНК типового штамма составляет 60,5 мол.% (T<sub>пл</sub>).

Типовой штамм, SK12<sup>T</sup> (=VKM В-2707<sup>T</sup>=CCUG 61697<sup>T</sup>=DSM 25212<sup>T</sup>), выделен из ила антропогенного биотопа г. Соликамска (Пермский край, Россия). Последовательности генов 16S рРНК и *mxaF* штамма SK12<sup>T</sup> депонированы в GenBank под номерами JQ773444 и JQ796868, соответственно.

### ***Methylopila oligotropha* Порошина и др., 2013.**

*Methylopila oligotropha* (*o.li.go.tro'pha*; Gr. adj. *oligos* немного, несколько, Gr. n. *trophos* питающий, M.L. fem. n. *oligotropha* использует ограниченный спектр полиуглеродных субстратов).

Клетки – грамотрицательные, подвижные, короткие аспорогенные палочки (1,0×1,4–2,0 мкм), монотрихи, размножаются бинарным делением. На минеральной агаризованной среде с метанолом формирует белые, а на среде с пептоном – слегка желтоватые непрозрачные колонии с выпуклым профилем и ровным краем. Растёт при температуре 16–40°C, pH 5,0–10,0 и 0,5–5% NaCl. Оптимум температуры 29°C, pH 8,0–8,5. Не требует витаминов и других факторов роста. Гидролизует крахмал, но не желатину. Оксидазо-, каталазо- и уреазоположителен. Строгий аэроб. Не восстанавливает нитраты до нитритов. Ограниченно-факультативный метилотроф. Реализует **ицл**-отрицательный вариант серинового пути C<sub>1</sub>-метаболизма. Использует метанол, метилированные амины и глюконат калия, но не глюкозу. Источниками азота служат соли аммония, нитраты, метиламин. В составе жирных кислот клеток преобладают C<sub>18:1ω7c</sub> – 68% и C<sub>19:0cyc</sub> – 10%. Основные фосфолипиды: фосфатидилэтанолламин, дифосфатидилглицерин. Доминирующий убихинон – Q<sub>10</sub>. Содержание Г+Ц в ДНК составляет 67 мол.% (T<sub>пл</sub>).

Типовой штамм, 2395A<sup>T</sup> (=VKM В-2788<sup>T</sup>=CCUG 63805<sup>T</sup>), выделен из почвы на территории солеразработок г. Соликамска. Последовательность гена 16S рРНК штамма 2395A<sup>T</sup> депонирована в GenBank под номером KC243676.

### ***Paracoccus communis* Порошина и др., 2013.**

*Paracoccus communis* (*com'mu.nis*; L. masc. adj. *communis* обычный, общий, – не имеющий существенных отличий от представителей рода).

Грамотрицательные сферические неподвижные аспорогенные клетки 0,7×0,75 мкм, одиночные и в парах. Образуют полисахаридные капсулы. Размножаются бинарным делением. Колонии непрозрачные, на среде с метанолом кремово-белого цвета, на среде с пептоном – слегка желтоватые. Растёт при температуре 16–40°C и рН 6,0–9,5. Оптимумы 29°C, рН 7,5. Галотолерант, выдерживает до 10% NaCl.

Оксидазо- и каталазоположителен. Осуществляет денитрификацию. Культура потребляет широкий спектр ростовых субстратов (метанол, метиламин, глюкоза, манноза, мальтоза, рамноза, цитрат, аспарат, сорбит, маннит, пируват). Не растёт на арабинозе, фруктозе, малате, серине, аланине. В качестве источников азота использует аммоний и нитраты. Реализует **РБФ** путь C<sub>1</sub>-метаболизма. Гидролизует крахмал и желатину.

Доминирующий убихинон – Q<sub>10</sub>. В составе жирных кислот клеток доминируют C<sub>18:1w7c</sub> – 74,0 и C<sub>16:0</sub> – 14,0%. Содержание Г+Ц в ДНК составляет 64,5 мол.% (T<sub>пл</sub>).

Типовой штамм, S3<sup>T</sup> (=ВКМ В-2787<sup>T</sup>=CCUG 63804<sup>T</sup>), выделен из ила поверхностного стока из шламохранилища г. Соликамска. Последовательность гена 16S рРНК штамма S3<sup>T</sup> депонирована в GenBank под номером KC243677.

#### ***Ancylobacter defluvii* Порошина и др., 2013.**

*Ancylobacter defluvii* (de.flu'vi.i. L. gen. n. *defluvii* – сточная вода, загрязнение - выделен из загрязнённой воды вблизи шламохранилища.

Короткие, почти кокковидные грамотрицательные неподвижные палочки 0,6–0,7×0,8–1,0 мкм, одиночные и в парах. Размножаются бинарным делением. На минеральной среде с метанолом, а также на среде с пептоном образуют полупрозрачные серовато-белые колонии. Строгий аэроб. Галотолерант – растёт до 10% NaCl с оптимумом при 1%. Оптимальные значения: температуры – 29°C, рН – 7,0. Оксидазо – и каталазоположителен. Восстанавливает нитраты до нитритов. Желатину не разжижает, но гидролизует крахмал. Индол из триптофана не образует. Источниками азота служат аммонийные соли. Автотроф. Факкультативный метилотроф. Растёт на метаноле, реализует **РБФ** путь C<sub>1</sub>-метаболизма. Не растёт на метиламине и диметиламине. Доминирующие жирные кислоты: C<sub>18:1w7c</sub> – 77,0% и C<sub>19:0cyc</sub> – 12,3%. Основные фосфолипиды: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, дифосфатидилглицерин. Доминирующий убихинон – Q<sub>10</sub>. Содержание Г+Ц в ДНК составляет 65,1 мол.% (T<sub>пл</sub>).

Типовой штамм, SK15<sup>T</sup> (=ВКМ В-2789<sup>T</sup>=CCUG 63806<sup>T</sup>), выделен из загрязнённой воды вблизи солеотвала г. Соликамска. Последовательность гена 16S рРНК штамма SK15<sup>T</sup> депонирована в GenBank под номером KC243678.

**Род *Methylobrevis* Poroshina et al., 2015.**

*Methylobrevis* (me.thy.lo.bre'vis. Fr.n. *methyle* метильный радикал; L. adj. *brevis* короткий, – короткие клетки; N.L. masc. n. *Methylobrevis* метил-потребляющие короткие клетки). Клетки – грамотрицательные, строго аэробные бактерии, размножаются бинарным делением, спор и протек не формируют. Накапливают внутриклеточно гранулы ПГБ.

Галотолерантные ограниченно-факультативные метилотрофы, реализуют изоцитратлиазо-положительный вариант серинового пути C<sub>1</sub>-метаболизма. Не растут автотрофно. Основные фосфолипиды – фосфатидилэтаноламин и фосфатидилмонометилэтаноламин, а также фосфатидилглицерин. Основные жирные кислоты – C<sub>18:1ω7</sub> и C<sub>16:1ω7c</sub>. Основной убихинон – Q<sub>10</sub>. Содержание Г+Ц в ДНК составляет 67,9 мол.% (T<sub>пл</sub>). Типовой вид – *Methylobrevis pamukkalensis*<sup>T</sup>.

***Methylobrevis pamukkalensis* Poroshina et al., 2015.**

*Methylobrevis pamukkalensis* (pa.muk.kal.en'sis. N.L. masc. adj. *pamukkalensis* относящийся к парку Памуккале).

Штамм представлен подвижными клетками, 0,7–1×1,5–2 мкм, образующими розетки. Способен выдерживать до 6% NaCl (оптимум – 4% NaCl). Колонии на агаризованной среде с метанолом круглые, бледно-коричневые, с выпуклым профилем, непрозрачные, с глянцевой поверхностью и цельным краем, 3 мм в диаметре.

Растёт оптимально при pH 7,5–8,0, 30°C, в присутствии 0,5% метанола. Ассимилирует метанол, маннит, слабый рост обнаружен на метиламине и формиате. Не растёт на формальдегиде, диметиламине, триметиламине, сахарах, аминокислотах, органических кислотах и спиртах, а также на триптон-соевом агаре и LB. Не восстанавливает нитраты до нитритов. Уреаза-, каталазо- оксидазо- и β-глюкозидазоположительный, но аргинин дигидролазо-, лизин- и орнитин декарбоксилазоотрицательный. Не образует индолы из L-триптофана и H<sub>2</sub>S. Гидролизует крахмал, но не желатину. Биотин стимулирует рост. Накапливает органический осмопротектор эктоин в ответ на повышение солёности внешней среды.

Типовой штамм, PK2<sup>T</sup> (=VKM В-2849<sup>T</sup>=JCM 30229<sup>T</sup>), выделен из солёного горячего источника на территории национального парка Памуккале (Иераполис, Турция). Последовательность гена 16S рРНК штамма PK2<sup>T</sup> депонирована в GenBank под номером KF683074.

***Advenella kashmirensis* subsp. nov. *methylica* Порошина и др., 2015.**

*A. kashmirensis methylica* (me.thy'.li.ca. Fr. *methyle*, потребляемая метильная группа).

Клетки – грамотрицательные неподвижные короткие палочки (0,3–0,35×0,4–0,45 мкм). На минеральной агаризованной среде с метанолом образует точечные бежевые, а на богатой среде – желтовато-кремовые, прозрачные, округлые колонии. Не обладает способностью к нитратредукции. Активность уреазы не обнаружена. Факультативный метилотроф. При росте на метаноле реализует рибулозобисфосфатный путь C<sub>1</sub>-метаболизма. В качестве источников энергии использует метанол, формиат, но не кристаллическую серу, тиосульфат или тетраионат. Использует α-кетоглутарат и лактат. Гидролизует крахмал. Растёт при ≤2% NaCl. Источниками азота служат соли аммония, нитраты и аминокислоты. На среде с нитратом как источником азота, 0,5% метанола и 0,01% триптофана образует производные индола. Рост стимулирует фолиевая кислота. Основные фосфолипиды – фосфатидилэтаноламин, фосфатидилмонометилэтаноламин, фосфатидилглицерин и дифосфатидилглицерин. Основной убихинон – Q<sub>8</sub>. Содержание Г+Ц в ДНК – 55,4 мол.% (T<sub>пл</sub>).

Штамм РК1 (=VKM-B 2850=DSM 27514) выделен из ризосферы осоки на территории национального парка Памуккале (Иераполис, Турция). Последовательность гена 16S рНК штамма РК1 депонирована в GenBank под номером KF683075.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из проб активного ила, почвы, воды, растений, отобранных как в техногенных, так и природных солёных биотопах России и Турции нами были получены накопительные и выделены чистые культуры аэробных метиловобактерий. Это подтверждает тезис о широком распространении метиловобактерий в природе, являющихся важным звеном в трофической цепи углерода нашей планеты. Метанол – ключевой субстрат для многих метилотрофов. Огромные количества метанола (>200 млн т/год) образуются биогенно и антропогенно, но его эмиссия значительно снижается в наземных биотопах аэробными метиловобактериями. Из 10 выделенных нами чистых культур три классифицированы и описаны как представители разных видов новых родов *Methyloligella* и *Methylobrevis*, а четыре штамма отнесены к новым видам известных родов метиловобактерий. Полученные данные указывают на слабую изученность биоразнообразия метиловобактерий солёных биотопов и необходимость проведения дальнейшего исследования этих эконисш. Изоляты реализуют разные пути C<sub>1</sub>-метаболизма – серино-

вый, **РМФ**, **РБФ**, что, возможно, обусловлено особенностями их местообитаний. У ранее изученных метиловых бактерий **ицл**<sup>+</sup>-вариант серинового пути был обнаружен лишь среди представителей родов *Aminobacter* и *Hyphomicrobium*; в работе описан новый род **ицл**<sup>+</sup>-сериновых бактерий – *Methylobrevis*.

Впервые показано, что род *Advenella* включает метилотрофных представителей, в частности, подвид *Advenella kashmirensis* subsp. nov. *methylica*. Можно полагать, что различия в способности к метилотрофии являются результатом горизонтального переноса генов. В свою очередь, благодаря метилотрофии, *Advenella kashmirensis* subsp. nov. *methylica* способен к фитосимбиозу, поскольку метанол – естественный метаболит растений, а синтезируемые метиловыми бактериями индолпроизводные (ауксины) являются фитогормонами. Корни осоки, из которых выделен штамм, были погружены в солёную воду с 4% NaCl, однако, обитая внутри растительных тканей, штамм РК1, вероятно, утратил галотолерантность.

Выделенные галотолерантные и умеренно-галофильные культуры синтезируют в качестве основного осмопротектора эктоин, который был обнаружен у других метилотрофов из солёных биотопов (Доронина *и др.*, 2015). Существенное накопление эктоина клетками ряда изолятов (до 20% от веса сухой биомассы) даёт основание считать их перспективными продуцентами этого универсального биопротектора.

Нами впервые обнаружены представители метиловых бактерий (роды *Methyloligella* и *Methylobrevis*), синтезирующие **ПГБ** с высокой **Мм** (1–10 млн Да). Этот биополимер очень прочен, но достаточно эластичен и эффективен для использования в медицине. Нарботанные образцы биопластиков, переданные на испытания, признаны перспективными для использования в хирургии для изготовления противоспаечных мембран, шовных нитей и стентов. Кроме того, недавно было показано, что мономер **ПГБ** – гидроксibuтират – является химическим шапероном, повышающим устойчивость клеток к стрессовым факторам (Soto *et al.*, 2012). Очевидно, образование **ПГБ** метиловыми бактериями родов *Methyloligella* и *Methylobrevis*, наряду с биосинтезом эктоина, играет важную роль в адаптации к постоянно изменяющимся условиям солёных местообитаний.

Названия новых таксонов опубликованы в списках валидации International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology № 156 и 157 (Oren and Garrity, 2014a; 2014b), штаммы представлены в международных коллекциях, а нуклеотидные последовательности их генов 16S рРНК депонированы в международной базе данных.

## ВЫВОДЫ

1. Из техногенных (г. Соликамск, Пермский край, Россия) и природных солёных биотопов (Троицкий заказник, Челябинская область, Россия; Памуккале, Турция) выделены в чистой культуре 10 штаммов аэробных метиловых бактерий. Методами полифазной таксономии 7 штаммов классифицированы как представители двух новых родов, шести новых видов и одного подвида: *Methyloligella halotolerans*, *Methyloligella solikamskensis*, *Methylobrevis pamukkalensis*, *Paracoccus communis*, *Methylophaga oligotropha*, *Ancylobacter defluvii*, *Advenella kashmirensis* subsp. *methylica*. Штаммы LS, 2395B и S3270 отнесены к известным видам: *Methylophaga thalassica*, *Arthrobacter protophormiae* и *Ancylobacter rudongensis*, соответственно.

2. Описанные штаммы реализуют различные пути C<sub>1</sub>-метаболизма: *M. halotolerans* C2<sup>T</sup>, *M. solikamskensis* SK12<sup>T</sup>, *M. pamukkalensis* PK2<sup>T</sup>, *M. oligotropha* 2395A<sup>T</sup> – сериновый путь, *A. defluvii* SK15<sup>T</sup>, *A. rudongensis* S3270, *P. communis* S3<sup>T</sup> и *A. kashmirensis* subsp. *methylica* PK1 – рибулозобисфосфатный, *M. thalassica* LS – рибулозомонофосфатный.

3. Установлено, что умеренно-галофильные и галотолерантные метиловых бактерии *Methyloligella halotolerans* C2<sup>T</sup>, *Methyloligella solikamskensis* SK12<sup>T</sup>, *Methylobrevis pamukkalensis* PK2<sup>T</sup>, *Ancylobacter defluvii* SK15<sup>T</sup>, *Paracoccus communis* S3<sup>T</sup>, *Methylophaga thalassica* LS синтезируют в качестве основного биопротектора циклическую иминокислоту – эктоин, содержание которого возрастает при увеличении солёности среды и достигает 18–20% от веса сухих клеток, что свидетельствует о перспективности выделенных штаммов в качестве продуцентов этого ценного метаболита.

4. Показано, что представители новых родов *Methyloligella* и *Methylobrevis* синтезируют высокомолекулярный ПГБ (1–10 млн Да), перспективный для использования в биомедицине (прочные шовные нити и стенты).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи:*

1. **Poroshina M.N.**, Trotsenko Yu.A., Doronina N.V. *Methylobrevis pamukkalensis* gen. nov., sp. nov., a halotolerant restricted facultative methylotroph isolated from saline water // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology // 2015. V. 65. №4. P. 1321–1327.
2. **Порошина М.Н.**, Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Троценко Ю.А. *Advenella kashmirensis* subsp. *methylica* РК1 – факультативный метилотроф из ризосферы осоки // Микробиология. 2015. Т. 84. №1. С. 90–97.
3. **Порошина М.Н.**, Доронина Н.В., Ежов В.А., Троценко Ю.А. Сравнительная характеристика биосинтеза полигидроксибутирата *Methylobacterium extorquens* G10 и *Methyloligella halotolerans* C2 на метаноле // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. №3. С. 283–288.
4. **Порошина М.Н.**, Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Ковалевская Н.П., Троценко Ю.А. Галофильные и галотолерантные аэробные метиловобактерии из техногенных соликамских биотопов // Микробиология. 2013. Т. 82. №4. С. 473–482.
5. Doronina N.V., **Poroshina M.N.**, Kaparullina E.N., Ezhov V.A., Trotsenko Yu.A. *Methyloligella halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Methyloligella solikamskensis* sp. nov., two non-pigmented halotolerant obligately methylotrophic bacteria isolated from the Ural saline environments // Systematic and Applied Microbiology. 2013. V. 36. №3. P. 148–154.
6. Капаруллина Е.Н., **Порошина М.Н.**, Доронина Н.В., Ковалевская Н.П. Новые штаммы аэробных метилотрофных бактерий из биотопов Соликамска // Вестник уральской медицинской академической науки. 2011. №4/1 (38). С. 79–80.

### *Тезисы:*

1. **Порошина М.Н.** Эктоин – осмопротектор аэробных метиловобактерий из засоленных техногенных и природных мест обитания. Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология –2010». Тезисы докладов/под.ред. к.х.н. В.А. Алферова. Тула: Изд-во ТулГУ. 2010. С. 39.
2. **Порошина М.Н.**, Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В. *Methyloligella* gen. nov. – новый род аэробных умеренно галофильных метиловобактерий – продуцентов эктоина из метанола. Актуальные аспекты современной микробиологии: VIII молодежная школа-конференция с международным участием. ИНМИ РАН. Тезисы. М.: МАКС Пресс, 2012. С. 33–35.



3. **Порошина М.Н.**, Капаруллина Е.Н. *Methyloligella* gen. nov. – новый род аэробных галотолерантных метилотрофных бактерий – продуцентов эктоина и полигидроксибутирата. Тезисы 16-й Пущинской школы-конференции молодых учёных. Пущино, 2012. С. 31.
4. Доронина Н.В., **Порошина М.Н.**, Ежов В.А. *Methyloligella* gen.nov. – новый род аэробных галотолерантных метилотрофных бактерий – продуцентов полигидроксибутирата и эктоина. XIII съезд Общества микробиологов Украины им. С.Н. Виноградского – 2013. Тезисы докладов. Ялта, 2013. С. 35.
5. **Порошина М.Н.** *Advenella methylica* РК1 sp. nov. – новый факультативный метилотроф из ризосферы осоки. Актуальные аспекты современной микробиологии: IX молодежная школа-конференция с международным участием. ИНМИ РАН. Тезисы. М.: МАКС Пресс, 2013. С. 25–27.
6. **Порошина М.Н.**, Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В. Новые виды галотолерантных аэробных метиловых бактерий из техногенных соликамских биотопов. Биология – наука XXI века: Тезисы 17-й международной Пущинской школы-конференции молодых учёных. Пущино, 2013. С. 39.
7. **Порошина М.Н.** Биосинтез биodeградебельного пластика полигидроксибутирата аэробными метиловыми бактериями из метанола // Тезисы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2014»: материалы и доклады / под ред. к.х.н. В.А. Алферова. Тула: Изд-во ТулГУ. 2014. 72с.
8. **Порошина М.Н.**, Мустахимов И.И. Аэробные метиловых бактерии: новые таксоны и их вторичные метаболиты. Биология – наука XXI века: 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных (Пущино, 20–24 апреля 2015 г.). Сборник тезисов. Пущино, 2015. С. 193–194.