

В.А. Романовская, П.В. Рокитко

Институт микробиологии и вирусологии им. ДК. Заболотного НАН Украины,

ул. Академика Заболотного, 154, Киев МСП, Д03680, Украина

АНАЛИЗ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ ДЛЯ ОЦЕНКИ РАНГА ТАКСОНОВ У МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Чтобы определить возможность применения филогенетических критериев для оценки ранга таксонов, рассчитывали внутри- и межвидовое, а также межродовое сходство у метанотрофов на основе сиквенсов генов 16S рРНК. Использовали сиквенсы генов 16S рРНК изученных нами облигатных метанотрофов, которые хранятся в UCM (Ukrainian Collection of Microorganisms), и типовых штаммов других видов метанотрофов из базы данных Генбанка (Genbank). Нами показано, что у различных семейств метанотрофов уровни межвидового и межродового сходства значительно различаются и, следовательно, могут быть использованы для дифференциации таксонов только в пределах одного семейства. Проведенный анализ показал, что необходимо пересмотреть таксономическое положение: (1) двух фенотипически подобных видов *Methylomonas* (*M. aurantiaca* и *M. fodinarum*), сходство генов 16S рРНК которых составляет 99.4 %, сходство их тотальной ДНК – до 80 %, что свидетельствует скорее о штаммовых, но не о видовых отличиях; (2) видов *Methylomicrobium agile* и *M. albit*, которые филогенетически более близки роду *Methylobacter* (97 % сходства), чем *Methylomicrobium* (94 % сходства); (3) родов сем. *Beijerinckiaceae* (*Methylocella* и *Methylocarpsa*), а также родов сем. *Methylocystaceae* (*Methylosinus* и *Methylocystis*), высокий уровень сходства которых (97 % и выше) с другими метанотрофными родами (в пределах одного семейства) фактически соответствует диапазону сходства видов (внутри некоторых родов) в сем. *Methylococcaceae*.

При определении филогенетических критериев, которые могут характеризовать ранги таксонов, выявлено, что уровни межвидового сходства у метанотрофных родов семейств *Methylocystaceae* и *Beijerinckiaceae* (97.8-99.1 % и 97.8 %, соответственно) значительно превышают уровень формирования родов в семействе *Methylococcaceae* (94.0-98.2 %) и, более того, приближаются к значению внутривидового сходства в сем. *Methylococcaceae* (97.5-99.3 %). Значения коэффициентов внутри- и межвидового сходства метанотрофов сем. *Methylocystaceae* и *Beijerinckiaceae* перекрываются, а, следовательно, таксоны различного ранга могут иметь одинаковый уровень дивергенции генов. Т.о., у метанотрофных таксонов семейств *Methylocystaceae* и *Beijerinckiaceae* не выявлено четких значений филогенетических критериев, которые могли бы соответствовать как рангу вида, так и рангу рода. Вместе с тем, критерии, отвечающие рангу определенных таксонов, выявлены у метанотрофов семейства *Methylococcaceae*. Уровень генотипического сходства штаммов одного вида находится в диапазоне 97.5-99.3 %, видов одного рода – 94-98 %, самые высокие уровни сходства между родами этого семейства – 90-96%.

Ключевые слова: метаноокисляющие бактерии, филогенетический анализ, внутри- и межвидовое сходство, ранги таксонов.

В новом издании Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [6], в отличие от предыдущих, приведена схема классификации метаноокисляющих бактерий (метанотрофов). Как следует из этой схемы, использование сиквенс-анализа генов 16S рРНК для филогенетической классификации метанотрофов однозначно продемонстрировало неоднородность их таксономической структуры. Они относятся к филогенетической линии протеобактерий, однако внутри её не составляют единого монофилетического кластера, а относятся к двум классам: *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria* [6]. В целом, с применением сиквенс-анализа генов 16S рРНК для классификации прокариот таксономисты получили инструмент, который позволил, с одной стороны, создать доступную «on line»-базу данных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК микроорганизмов в Генбанке (Genbank) для их сравнительного анализа, и, с другой стороны, объективно и количественно оценивать сходство (или родство) вновь изолированных микроорганизмов с имеющейся фиксированной «on line» информацией

о многочисленных видах. В данной работе мы определяли коэффициенты внутри- и межвидового, а также межродового сходства у метанотрофов, чтобы оценить возможность применения филогенетических критериев для оценки ранга таксонов у этой группы бактерий. В результате появилась бы возможность количественно охарактеризовать ранги таксонов (виды, роды, семейства), что позволило бы исключить необоснованное описание новых таксонов. Использовали собственные результаты и данные, имеющиеся в базе данных нуклеотидных последовательностей Генбанка.

Материалы и методы. *Объекты исследования.* Для филогенетического анализа были использованы полные (1400-1450 нуклеотидов) или частичные (700–800 нуклеотидов) сиквенсы генов 16S рРНК изученных нами метанооксиляющих бактерий [2–4], которые хранятся в UCM (Украинская коллекция микроорганизмов, Киев): *Methylobacter luteus* UCM B-3053^T (AF304195), *M. marinus* UCM B-3159, *Methylocaldum gracile* UCM B-3014^T (AY995200), *M. szegediense* UCM B-3032 (AY999963), *Methylococcus capsulatus* (UCM B-3494), *M. thermophilus* UCM B-3037^T (X73819), *Methylomonas rubra* UCM B-3075^T (AY995198), *Methylsinus trichosporium* UCM B-3060 (AY460188). В скобках здесь и далее приведены номера доступа в базу данных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК в Генбанке для тех штаммов, сиквенсы генов 16S рРНК которых депонированы в этой базе данных.

Для вычисления коэффициентов сходства видов метанотрофов использованы также сиквенсы генов 16S рРНК из Генбанка типовых штаммов других видов облигатных метанотрофов [6]: *Methylobacter marinus* A45 (AF304197), *M. psychrophilus* Z-0021 (AF152597), *M. whittenburyi* NCIMB 11128 (X72773), *Methylocapsa acidiphila* B2 (AJ278726), *Methylocaldum gracile* NCIMB 11912 (U89298), *M. tepidum* LK6 (U89297), *Methylocella palustris* K (Y17144), *M. tundrae* T4 (AJ555244), *Methylococcus capsulatus* штамм Texas (X72770), *Methylocystis echinoides* IMET 10491 (AJ458473), *M. parvus* OBBP (M29026), *Methylomicrobium agile* A30 (X72767), *Methylomicrobium album* BG8 (X72777), *Methylomicrobium alcaliphilum* 5z (AF096091), *M. buryatense* 5B (AF307138), *M. pelagicum* AA23 (X72775), *Methylomonas aurantiaca* JB103 (X72776), *M. fodinarum* LD2 (X72778), *M. methanica* S1 (AF304196), *M. scandinavica* SR5 (AJ131369), *Methylsarcina fibrata* ATCC 700909 (AF177296), *M. quisquiliarum* ATCC 700908 (AF177297), *Methylsinus sporium* NCIMB 11126 (Y18946), *M. trichosporium* OB3b (M29024), *Methylsphaera hansonii* AM6 (U67929).

В отдельных случаях для построения филограммы в массив анализируемой информации были включены сиквенсы генов 16S рРНК (из Генбанка) некоторых других метанотрофов (не типовые штаммы): *Methylococcus capsulatus* штамм Bath (X72771); *Methylsinus trichosporium* KS21 (AJ431385), SC10 (AJ458485), IMET 10561 (AJ458474), 33/1 AJ458481, O19/1 (AJ458491), M23 (AJ458492), KS24b (AJ458496); *M. sporium* 44/2 (AJ458468), 9/1 (AJ458469), SE2 (AJ458478), SK13 (AJ458488), F10/1b (AJ458489), KS16a (AJ458495); *Methylocystis parvus* 81 (AJ458476), 57 (AJ45850); *M. echinoides* 2 (AJ458502). Кроме того, для более детального анализа вышеприведенные сиквенсы генов 16S рРНК метанотрофов сравнивали с таковыми (из Генбанка) бактерий, которые не растут на метане: *Beijerinckia indica* subsp. *indica* ATCC 9039 (M59060); *Sphingomonas* sp. (= «*Beijerinckia indica* subsp. *indica*») ATCC 21423 (AF503277); *Sphingomonas yanoikuyae* (= «*Beijerinckia*») B1 (U37524), *Escherichia coli* AK108 (AY098487).

Сравнительный анализ последовательностей генов 16S рРНК метанотрофов. Коэффициенты попарного сходства штаммов вычисляли, как частное при делении количества совпавших нуклеотидов генов 16S рРНК на сравниваемое количество нуклеотидов, используя результаты, полученные с помощью программы BLASTN (версия 2.2.22). Построение филогенетических деревьев, основанных на сравнении генов 16S рРНК, проводили с использованием различных алгоритмов, реализованных в пакетах программ TreeView (версия 1.5.2) и ClustalX (версия 1.81). Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью «bootstrap»-анализа 500 альтернативных деревьев.

Анализ значений филогенетических критериев для оценки ранга таксонов у метанотрофов проводили путём сравнения коэффициентов их сходства (родства), основанного на сиквенсе генов 16S рРНК: (1) между штаммами одного вида (внутривидовое родство), (2) между видами одного рода (межвидовое родство), (3) а также определяя самые высокие уровни сходства

каждого рода с другими метанотрофными родами в пределах одного семейства (межродовое родство).

Результаты и их обсуждение. Рассматривая в целом структуру метанотрофов, приведенную в руководстве [6], следует отметить, что в результате сиквенса-анализа генов 16S рРНК сформировались три филогенетические линии этих бактерий (табл. 1), хотя ранее метанотрофы считались физиологически и таксономически единой группой [1, 8]. Семейство *Methylococcaceae* объединило роды исключительно метанооксиляющих бактерий (табл. 1). В семейство *Methylocystaceae*, помимо метанотрофов, вошли другие бактерии (роды *Albibacter*, *Methylopila*, *Terasakiella*). Особую группу представляют ацидофильные метанотрофы (роды *Methylocella* и *Methylocapsa*), которые вошли в семейство *Beijerinckiaceae*, наряду с гетеротрофными бактериями, не растущими на метане (роды *Beijerinckia*, *Chelatococcus*).

Таблица 1

Филогенетические линии метанооксиляющих бактерий, согласно руководству [6]

Домен <i>Bacteria</i>		
Филум VXII. Proteobacteria		
Класс I. <i>Alphaproteobacteria</i>		Класс III. <i>Gammaproteobacteria</i>
Порядок VI. <i>Rhizobiales</i>		Порядок VII. <i>Methylococcales</i>
Семейство VI. <i>Methylocystaceae</i>	Семейство VII. <i>Beijerinckiaceae</i>	Семейство I. <i>Methylococcaceae</i>
Роды		
I. <i>Methylocystis</i>	I. <i>Beijerinckia</i>	I. <i>Methylococcus</i>
II. <i>Albibacter</i>	II. <i>Chelatococcus</i>	II. <i>Methylobacter</i>
III. <i>Methylopila</i>	III. <i>Methylocapsa</i>	III. <i>Methylocaldum</i>
IV. <i>Methylosinus</i>	IV. <i>Methylocella</i>	IV. <i>Methylomicrobium</i>
V. <i>Terasakiella</i>		V. <i>Methylomonas</i>
		VI. <i>Methylosarcina</i>
		VII. <i>Methylosphaera</i>

Для определения филогенетического родства выделенных нами метанотрофов [2-4], с известными видами [6] были построены филогенетические деревья на основе сиквенса генов 16S рРНК. В результате были сформированы кластеры, отражающие семейства метанотрофов (рис. 1), на филограмме они образуют отдельные ветви (размещены в овалах). Виды семейства *Methylococcaceae* сформировали отдельные кластеры (рис. 1), которые соответствуют родам *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylocaldum*, *Methylosphaera*. При этом виды *Methylomicrobium* образовали два подкластера, один из которых объединился с родом *Methylobacter* (рис. 1).

Спорными оказались результаты формирования кластеров (рис. 1) семейства *Methylocystaceae* (роды *Methylocystis* и *Methylosinus*). Поскольку каждый из этих родов включает только два вида, для анализа, соответственно, были использованы сиквенсы генов 16S рРНК всего четырёх типовых штаммов. Поэтому при построении следующей филограммы (рис. 2) мы расширили перечень штаммов этих родов, включив как типовые, так и другие штаммы. Действительно, в этом случае роды *Methylocystis* и *Methylosinus* сформировали отчётливые кластеры (рис. 2). Т.о., в пределах семейства *Methylocystaceae* структура филограммы изменилась при увеличении количества штаммов в анализируемой базе данных. Это согласуется с мнением [17], что схема ветвления филогенетического дерева может измениться, если в большом массиве информации, в который включены сиквенсы представителей далёких филогенетических групп (в нашем случае, это виды метанотрофов двух классов *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*), используется ограниченное число штаммов одного из анализируемых таксонов. В этом случае [17] может произойти или потеря информации, или удаление переменных сайтов гена, или упущение тех фрагментов, для которых установлена неоднозначная сиквенса-информация. Каждый из этих моментов может привести к изменению структуры ветвления, что в конечном счёте затрудняет интерпретацию полученных филограмм.

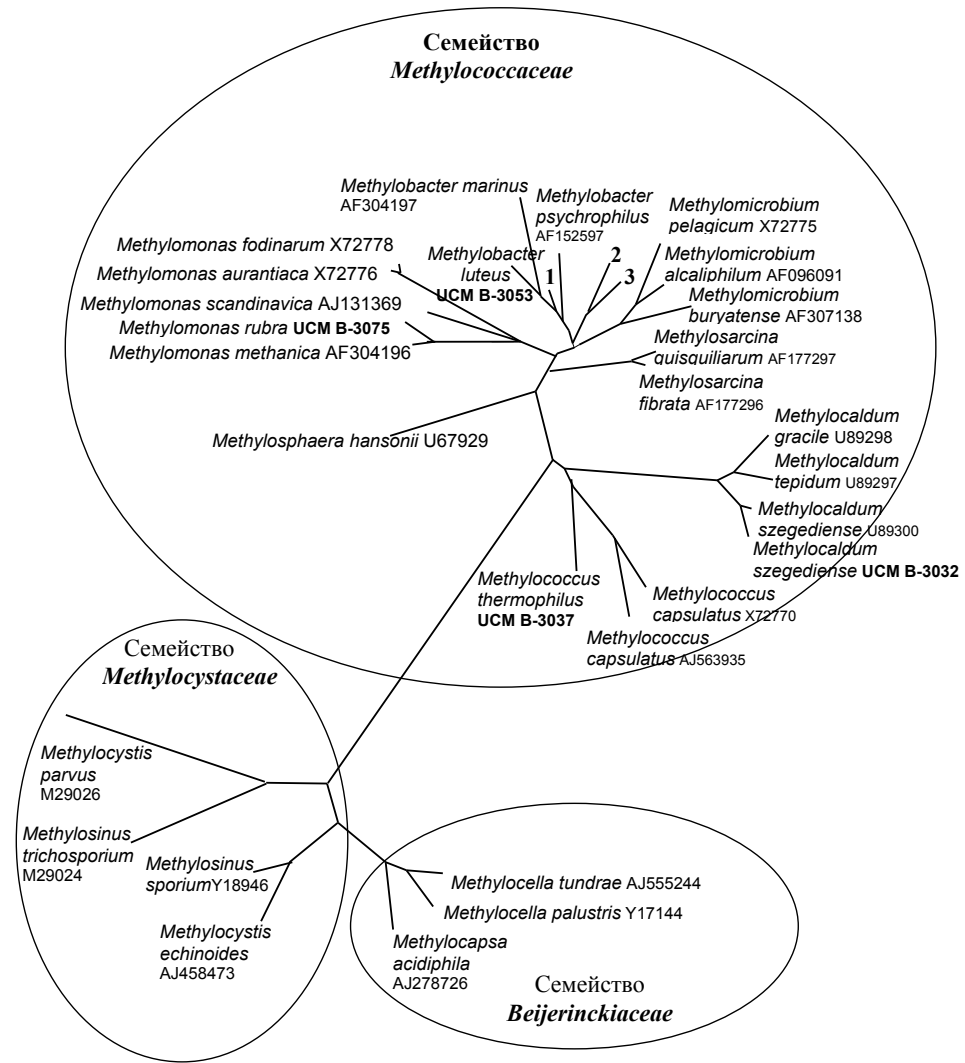


Рис. 1. Бескорневое дерево (филограмма), показывающее формирование кластеров типовых штаммов метанотрофных бактерий, построенное на основании сиквенсов генов 16S рНК.

Примечание. На филограмме приведены наименования видов и номера доступа в Генбанк. Жирным шрифтом обозначены номера штаммов, выделенных и изученных нами. Сиквенсы генов 16S рНК других метанотрофов получены из базы данных Генбанка. Масштаб (0,01) соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов (1 % нуклеотидных замен). На ветвях филограммы цифрами 1, 2, 3 обозначены *Methylobacter whittenburyi* (X72773), *Methylobacterium agile* (X72767) и *Methylobacterium album* (X72777), соответственно.

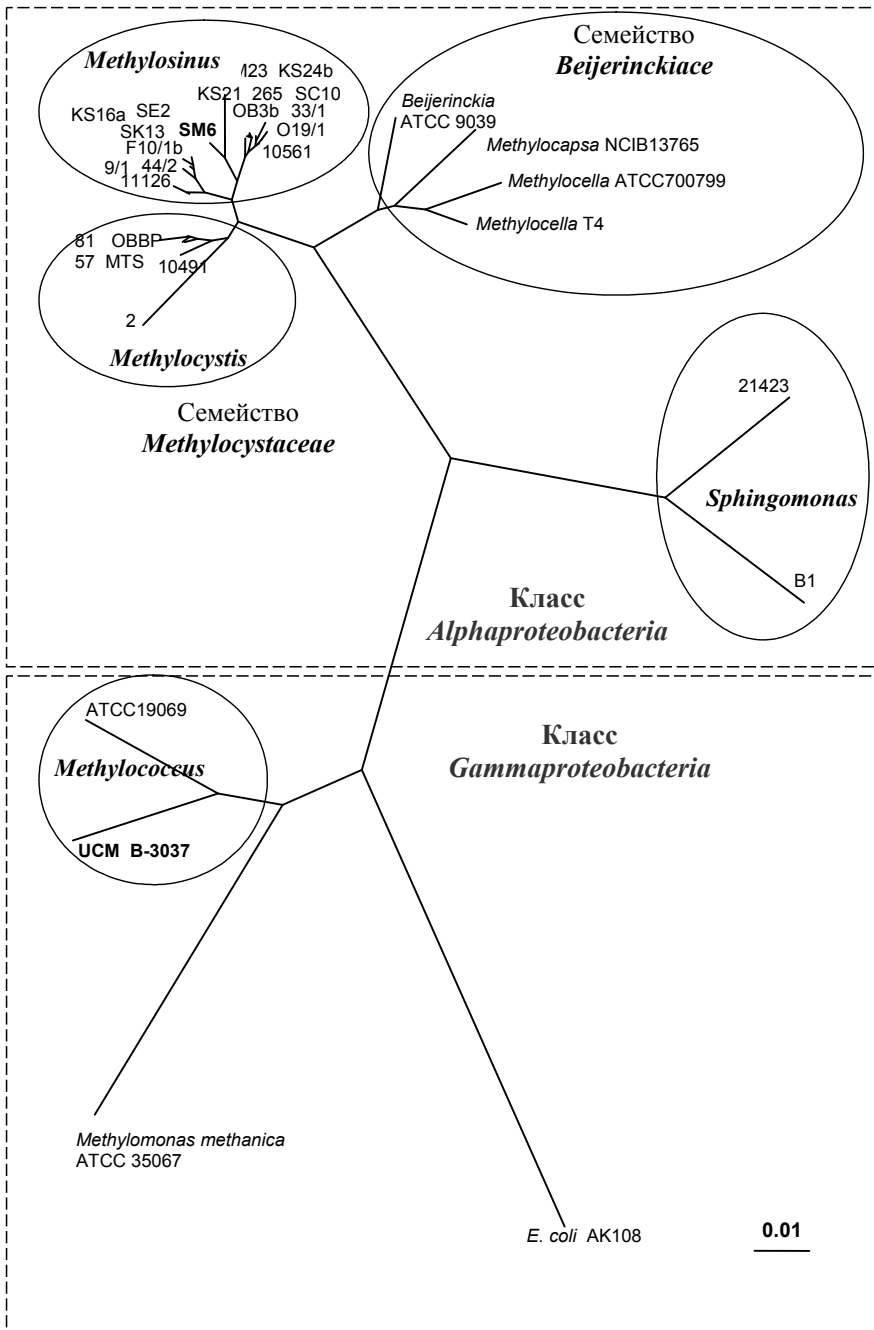


Рис. 2. Бескорневое дерево (филограмма), показывающее формирование кластеров метанотрофных видов семейств *Methylocystaceae* и *Beijerinckiaceae*, основанное на анализе последовательностей генов 16S рРНК как типовых, так и других штаммов. **Примечание.** На филограмме приведены наименования родов и номера штаммов. Остальные обозначения см. рис. 1.

Чтобы определить уровень формирования рангов таксонов у метанотрофов, сравнивали коэффициенты их внутри- и межвидового сходства, а также межродового сходства, которые основаны на сиквенсе генов 16S рРНК.

Как следует из полученных данных (табл. 2), отличия между штаммами внутри одного вида (т.е. внутривидовые отличия) находились в пределах 1,4–1,8% (сем. *Methylococcaceae*), 0,3–1,7% (сем. *Methylocystaceae*) и 0,2–0,6% (сем. *Beijerinckiaceae*).

**Уровень сходства последовательностей генов 16S рРНК у штаммов,
принадлежащих к отдельным видам метанотрофов***

Вид	Количество штаммов	Уровень сходства, %
Семейство <i>Methylococcaceae</i>		
<i>Methylococcus capsulatus</i>	4	97.5-99.3
<i>Methylomonas methanica</i>	2	98.6
<i>Methylomicrobium buryatense</i>	3	98.5
<i>Methylocaldum szegediense</i>	3	97.9-99.3
<i>Methylosphaera hansonii</i>	2	100
Семейство <i>Methylocystaceae</i>		
<i>Methylosinus trichosporium</i>	11	98.1 - 99.8
<i>Methylosinus sporium</i>	8	98.8 - 99.5
<i>Methylocystis parvus</i>	3	99.6 – 99.9
Семейство <i>Beijerinckiaceae</i>		
<i>Methylocella palustris</i>	3	99.2-99.8
<i>Methylocella tundrae</i>	3	99.8-99.9

*Другие виды метанотрофов (*Methylococcus thermophilus*; *Methylobacter luteus*, *M. whittenburyi*, *M. psychrophilus*, *M. marinus*; *Methylomonas aurantiaca*, *M. fodinarum*, *M. rubra*, *M. scandinavica*; *Methylomicrobium album*, *M. agile*, *M. alcaliphilum*; *Methylocaldum gracile*; *Methylosarcina fibrata*, *M. quisquiliarum*; *Methylocapsa acidiphila*; *Methylocella silvestris*) представлены единичными штаммами в базе данных нуклеотидных последовательностей Генбанка.

В целом, уровень сходства последовательностей генов 16S рРНК у штаммов одного вида метанотрофов выше 97.5 % (табл. 2), что соответствует международным рекомендациям [13, 16]. При этом считается, что гибридизация ДНК – ДНК не будет выше 60 %, независимо от того, какой метод гибридизации применяется [15].

При оценке межвидовых отличий метанотрофов (т.е. между нуклеотидными последовательностями генов 16S рРНК у видов внутри одного рода) отмечено, что большой диапазон отличий у видов *Methylomonas* (4.2 %) и *Methylobacter* (3.0 %) (табл. 3). При этом уровень сходства между некоторыми видами очень высокий, например, сходство среди двух видов *Methylomonas* (*M. aurantiaca* и *M. fodinarum*) составляет 99.4 %, что отражено на филограмме (см. рис. 1). Эти два вида подобны по фенотипическим свойствам и имеют достаточно высокий уровень сходства тотальной ДНК (до 80 %) [8]. Такое близкое родство *Methylomonas aurantiaca* и *M. fodinarum* свидетельствует скорее о штаммовых, но не о видовых отличиях. В табл. 3 приведено сходство только типовых штаммов видов. Если при анализе использовать также нетиповые штаммы видов, то диапазон сходства видов внутри рода изменится (например, для *Methylocaldum* он будет составлять 97.0–95.8 %).

Как сообщалось выше, виды *Methylomicrobium agile* и *M. album* сформировали отдельный подкластер на филограмме, который отвечается от рода *Methylobacter* (рис. 1). Остальные виды рода *Methylomicrobium* образуют самостоятельный кластер. При оценке межвидового сходства, основанного на сиквенсе генов 16S рРНК, оказалось, что виды *Methylomicrobium agile* и *M. album* более близки роду *Methylobacter* (97 % сходства), в то время, как с видами рода *Methylomicrobium* у них только 94 % сходства. Более того, эти два рода (*Methylomicrobium* и *Methylobacter*) фенотипически подобны, согласно данным, которые приведены в работах [8, 9]. Ранее виды *M. agile* и *M. album* относились к роду *Methylobacter* [8], однако впоследствии авторы [9] предложили реклассифицировать их, как *Methylomicrobium agile* и *Methylomicrobium album*. Видимо, таксономическое положение этих видов нуждается в уточнении, поэтому при дальнейшей оценке межвидового сходства метанотрофов эти виды не использованы.

**Уровень сходства последовательностей генов 16S рРНК таксонов
различного ранга у метанотрофов.**

Роды	Диапазон сходства видов внутри рода, %	*Самые высокие уровни сходства с другими метанотрофными родами, %
Семейство <i>Methylococcaceae</i>		
<i>Methylococcus</i>	94.9	91.7 - 92.3
<i>Methylomonas</i> **	94.0 – 98.2	93.3 - 95.6
<i>Methylobacter</i>	95.2 - 98.2	95.1 - 95.9
<i>Methylomicrobium</i>	95.6 - 96.6	94.9 - 96.0
<i>Methylocaldum</i>	97.0	90.0
<i>Methylosphaera</i>	1 вид	92.0
Семейство <i>Methylocystaceae</i> ***		
<i>Methylocystis</i>	99.1	97.2 - 97.8
<i>Methylosinus</i>	97.8	97.5 - 97.8
Семейство <i>Beijerinckiaceae</i> ***		
<i>Methylocella</i>	97.8	96.3 - 97.2
<i>Methylocapsa</i>	1 вид	96.1 - 97.2
<i>Beijerinckia</i>	1 вид	96.3

*Оценивали сходство видов каждого рода с видами других метанотрофных родов в пределах одного семейства. **Сходство двух видов *Methylomonas* (*M. aurantiaca* и *M. fodinarum*) составляет 99.4 %. ***В семействе *Methylocystaceae* оценивали сходство только метанотрофных родов; в семействе *Beijerinckiaceae*, кроме метанотрофных родов – также наиболее близкий метанотрофам вид *Beijerinckia indica* subsp. *indica* ATCC 9039.

Вызывает также некоторые сомнения правомочность существования двух родов в семействе *Methylocystaceae*. Высокие коэффициенты сходства видов (97.8–99.1 %) внутри каждого из родов (*Methylosinus* и *Methylocystis*) (табл. 3) превышают значение (97.5 %), которое рекомендовано Международным Комитетом по систематике прокариот при полифазном анализе для группирования штаммов в один вид [13, 16]. Более того, чёткие отличия между этими родами (*Methylosinus* и *Methylocystis*) касаются только морфологии вегетативных клеток и покоящихся форм. Это свидетельствует о целесообразности поиска новых критериев для классификации семейства *Methylocystaceae*. Международный Комитет по систематике прокариот считает, что перспективным для филогенетической классификации может быть, помимо сиквенса гена 16S рРНК, сиквенирование вспомогательных или других генов [16]. В определённой мере такой подход для семейства *Methylocystaceae* был реализован в работе [12]. Авторы, используя почти полный сиквенс генов 16S рРНК и частичный сиквенс генов, кодирующих PmoA (субъединица мембранной метанмонооксигеназы), MmoX (субъединица растворимой метанмонооксигеназы) и MxaF (субъединица метанолдегидрогеназы), показали, что, вопреки ранее опубликованным филогенетическим деревьям, морфологически различные виды оказались монофилетическими, исходя из сиквенса генов *pmoA* или 16S рРНК [12]. Тем не менее, авторы не сочли возможным в настоящее время, объединять эти традиционно используемые наименования родов (*Methylosinus* и *Methylocystis*), по крайней мере, до получения более детальной информации.

Подобное наблюдается и при анализе родов метанотрофов (*Methylocella* и *Methylocapsa*), которые включены в семейство *Beijerinckiaceae*. Ацидофильные метанотрофы *Methylocella* и *Methylocapsa* были описаны относительно недавно [10, 11] и значительно расширили представление о природных ареалах метанотрофов и о физиологическом разнообразии этой уникальной группы микроорганизмов. Вместе с тем, уровень сходства последовательностей гена 16S рРНК *Methylocella* и *Methylocapsa* составляет 97.2 %, т.е. в данном случае уровень межродового сходства фактически приближается к значениям внутривидового сходства для штаммов сем. *Methylococcaceae*.

Исходя из представленных результатов рассчитаны диапазоны сходства таксонов у различного ранга метанотрофных бактерий (табл. 4).

**Уровень генотипического сходства таксонов различного ранга
метанотрофных бактерий**

Сравниваемые ранги таксонов	Диапазон уровней сходства (%) генов 16S рРНК метанотрофов		
	<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylocystaceae</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>
Штаммы одного вида	97.5 - 99.3	98.1 - 99.9	99.2 - 99.8
Виды одного рода	94.0 - 98.2	97.8 - 99.1	97.8

Виявлено, що рівні межвидового сходства у метанотрофних родах родин *Methylocystaceae* і *Beijerinckiaceae* (97.8-99.1 % і 97.8 %, відповідно) значно перевищують рівень формування родів в родині *Methylococcaceae* (94.0-98.2 %) і, більше того, наближаються до значення внутривидового сходства у цього родини (97.5-99.3 %). Значення коефіцієнтів внутрі- і межвидового сходства метанотрофів цих родин перекриваються (табл. 4), а, відповідно, таксоны різного рангу можуть мати однаковий рівень дивергенції генів, що спостерігалося неодноразово в мікробіологічній практиці [5]. Як правило, роди метанотрофів, які були сформовані в результаті сиквенс-аналізу генів 16S рРНК (наприклад, *Methylocaldum*) [7], об'єднують види з високим рівнем філогенетичного родства. В той же час деякі роди метанотрофів (*Methylococcus*, *Methylomonas* і *Methylobacter*) були первісно сформовані на основі фенотипічних властивостей бактерій [1, 8, 14] і сиквенс-аналіз генів 16S рРНК тільки уточнив таксономічний статус деяких з них.

В цілому, у метанотрофних таксонах родин *Methylocystaceae* і *Beijerinckiaceae* не виявлено чітких кількісних критеріїв, які могли б відповідати рангу виду, або рангу роду. Разом з тим, кількісні критерії, що відповідають рангу визначених таксонів, виявлені у метанотрофів родини *Methylococcaceae*. Рівень генотипічного сходства штамів одного виду знаходиться в діапазоні 97.5-99.3 %, видів одного роду – 94-98 %, найвищі рівні сходства між родами цього родини – 90-96 %.

Робота виконана при частковому фінансуванні Державного фонду фундаментальних досліджень (проект ДФФД-РФФД-2009 № Ф28.4/030, договір №Ф28/417).

Романовська В.О., Рокитко П.В.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

**АНАЛІЗ ФІЛОГЕНЕТИЧНИХ КРИТЕРІЇВ
ДЛЯ ОЦІНКИ РАНГУ ТАКСОНІВ У МЕТАНОКИСЛЮЮЧИХ БАКТЕРІЙ**

Резюме

Щоб визначити можливість застосування філогенетичних критеріїв для оцінки рангу таксонів, розраховували внутрішньовидову і міжвидову, а також міжродову подібність у метанотрофів на основі сиквенсів генів 16S рРНК. Використовували сиквенси генів 16S рРНК досліджених нами облигатних метанотрофів, які зберігаються в UCM (Ukrainian Collection of Microorganisms), і типових штамів інших видів метанотрофів із бази даних Генбанку (GenBank). Нами показано, що у різних родин метанотрофів рівні міжвидової та міжродової подібності значно різняться і, отже, можуть бути використані для диференціації таксонів тільки в межах однієї родини. Проведений аналіз показав, що необхідно переглянути таксономічне положення: (1) двох фенотипово схожих видів *Methylomonas* (*M. aurantiaca* і *M. fodinarum*), подібність генів 16S рРНК яких складає 99.4 %, подібність їх тотальної ДНК – до 80 %, що може свідчити про наявність штамових, але не видових відмінностей; (2) видів *Methylomicrobium agile* і *M. album*, які філогенетично ближчі до роду *Methylobacter* (97 % подібності), ніж до *Methylomicrobium* (94 % подібності); (3) родів родини *Beijerinckiaceae* (*Methylocella* і *Methylocapsa*), а також родів родини *Methylocystaceae* (*Methylorosinus* і *Methylocystis*), високий рівень подібності яких (97 % і вище) з іншими метанотрофними родами (в межах однієї родини) фактично відповідає діапазону подібності видів (в межах деяких родів) в родині *Methylococcaceae*. При визначенні філогенетичних критеріїв, які можуть характеризувати ранг

ги таксонів, виявлено, що рівні міжвидової подібності у метанотрофних родів родин *Methylocystaceae* і *Beijerinckiaceae* (97.8–99.1 % і 97.8 %, відповідно) значно перевищують рівень формування родів у родині *Methylococcaceae* (94.0–98.2 %) і, більш того, наближаються до значення подібності штамів одного виду родини *Methylococcaceae* (97.5–99.3 %). Коефіцієнти подібності штамів одного виду і міжвидової подібності метанотрофів родин *Methylocystaceae* і *Beijerinckiaceae* перекриваються, а, отже, таксони різного рангу можуть мати однаковий рівень дивергенції генів. Таким чином, у метанотрофних таксонів родин *Methylocystaceae* і *Beijerinckiaceae* не виявлено чітких значень філогенетичних критеріїв, які могли б відповідати рангу виду, або рангу роду. Разом із тим, критерії, що відповідають рангу певних таксонів, виявлено у метанотрофів родини *Methylococcaceae*. Рівень генотипової подібності штамів одного виду знаходиться в діапазоні 97.5–99.3 %, видів одного роду – 94–98%, найвищі рівні схожості між родами цієї родини – 90–96 %.

Ключові слова: Метаноокислюючі бактерії, філогенетичний аналіз, внутрішньовидова та міжвидова подібність, ранги таксонів.

V.A.Romanovskaya, P.V.Rokitko

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

ANALYSIS OF PHYLOGENETIC CRITERIA FOR ESTIMATION OF THE RANK OF TAXA IN METHANE-OXIDIZING BACTERIA

S u m m a r y

To determine a possibility of application of phylogenetic criteria for estimating the taxa rank, the intra- and interspecies, as well as intergeneric relatedness of methanotrophs on the basis of 16S rRNA gene sequences was estimated. We used sequences of 16S rRNA genes of the studied isolates of obligate methanotrophs which have been deposited in UCM (Ukrainian Collection of Microorganisms), and of type strains of other obligate methanotrophs species (from GenBank database). It is shown, that the levels of interspecies and intergeneric relatedness in different families of methanotrophs are not identical, and therefore they can be used for differentiation of taxa only within one family. The carried out analysis has shown, that it is necessary to reconsider taxonomic position: (1) of two phenotypically similar species of *Methylomonas* (*M. aurantiaca* and *M. fodinarum*), similarity of 16S rRNA genes which is 99.4 %, similarity of their total DNA – up to 80 % that rather testifies to strain differences, than to species differences; (2) of species *Methylomicrobium agile* and *M. album* which are phylogenetically more related to genus *Methylobacter* (97 % of affinity), than *Methylomicrobium* (94 % of affinity); (3) of genera of the family *Beijerinckiaceae* (*Methylocella* and *Methylocapsa*), and also genera of the family *Methylocystaceae* (*Methylosinus* and *Methylocystis*), whereas high level of relatedness (97 % and more) of these bacteria with other methanotrophic genera (within one family) practically corresponds to a range of relatedness of species (within some genera) in the family *Methylococcaceae*.

When determining phylogenetic criteria which can characterize the ranks of taxa, it was revealed, that the levels of interspecies relatedness of methanotrophic genera of the families *Methylocystaceae* and *Beijerinckiaceae* (97.8–99.1 % and 97.8 %, accordingly) considerably exceed the level of genera formation in the family *Methylococcaceae* (94.0–98.2 %) and, moreover, approach the value of intraspecies relatedness of the family *Methylococcaceae* (97.5–99.3 %). Coefficients of intraspecies relatedness of methanotrophs of the families *Methylocystaceae* and *Beijerinckiaceae* are sometimes equal to interspecies relatedness. Hence, taxa of various rank can have the identical level of genes divergence. Thus, methanotrophic taxons of the families *Methylocystaceae* and *Beijerinckiaceae* have not demonstrated precise phylogenetic criteria which could correspond both to the species rank, or the genus rank. At the same time, the criteria, being adequate to the rank of certain taxa, are revealed in methanotrophs of the family *Methylococcaceae*. The level of genotypic relatedness of strains of the same species is in the range of 97.5–99.3 %, species of the same genus – 94–98 %, the highest levels of relatedness between genera of this family are 90–96 %.

The paper is presented in Russian.

K e y w o r d s: methane-oxidizing bacteria, phylogenetic analysis, intra- and interspecies relatedness, ranks of taxa.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *Romanovskaya V.A.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Романовская В.А., Малащенко Ю.Р., Богаченко В.Н. Уточненные диагнозы родов и видов метаноксилирующих бактерий // Микробиология. – 1978. – **47**, № 1. – С. 120–130.
2. Романовская В.А., Рокитко П.В., Шилин С.О., Малащенко Ю.Р. Реклассификация термофильных метаноксилирующих бактерий с использованием сиквенс-анализа генов 16S рРНК // Микробиол. журнал. – 2006. – **68**, № 1. – С. 3–10.
3. Романовская В.А., Рокитко П.В., Шилин С.О., Малащенко Ю.Р. Дополненный диагноз *Methylomonas rubra* sp. nov. // Микробиология. – 2006. – **75**, № 6. – С. 792–797.
4. Романовская В.А., Рокитко П.В., Шилин С.О., Черная Н.А. Уточнение видового статуса некоторых коллекционных штаммов метанотрофов // Микробиол. журнал. – 2009. – **71**, № 1. – С. 3–7.
5. Турова Т. П. Применение данных ДНК-ДНК-гибридизации и анализа генов 16S рРНК для решения таксономических проблем на примере порядка *Haloanaerobiales* // Микробиология. – 2000. – **69**, № 6. – С. 741–752.
6. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Proteobacteria. Parts A + B + C. // Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley. Editor-in-chief G.M. Garrity / 2nd ed., v.2. New York: Springer SBM – 2005. – 2800 p.
7. Bodrossy L., Holmes E.M., Holmes A.J., Kovacs K.L., Murrell J.C. Analysis of 16S rRNA and methane monoxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov. // Arch. Microbiol. – 1997. – **168**, N 6. 0 P. 493–503.
8. Bowman J.P., Sly L.I., Nichols P.D., Hayward A.C. Revised taxonomy of the methanotrophs: Description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group 1 methanotrophs // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1993. – **43**, N 4. – P. 735–753.
9. Bowman J.P., Sly L.I., Stackebrandt E. The phylogenetic position of the family *Methylococcaceae* // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1995. – **45**, N 1. – P. 182–185.
10. Dedysh S.N., Liesack W., Khmelenina V.S., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Semrau J.D., Bares A.M., Panikov N.S., Tiedje J.M. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 200. – **50**, N 3. – P. 955–969.
11. Dedysh S.N., Khmelenina V.N., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Semrau J.D., Liesack W., Tiedje J.M. *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from Sphagnum bog // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2002. – **52**, N 1. – P. 251–261.
12. Heyer J., Galchenko V.F., Dunfield P.F. Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments. // Microbiology. – 2002. – **148**, N 9. – P. 2831–2846.
13. Murray R.G.E., Brenner D.J., Colwell R.R., de Vos P., Goodfellow M., Grimont P.A.D., Pfennig N., Stackebrandt E., Zavarzin G.A. Report of the Ad Hoc Committee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria* // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1990. – **40**, N 2. – P. 213–215.
14. Romanovskaya V.A. Taxonomy of methylotrophic bacteria // Biology of methylotrophs. – Boston: Butterworth-Heinemann, 1991. – P. 3–25.
15. Stackebrandt E., Goebel B.M. Taxonomic Note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1994. – **44**, N 4. – P. 846–849.
16. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kampfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.E.B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2002. – **52**, N 3. – P. 1043–1047.
17. Stackebrandt E. Defining Taxonomic Ranks. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria // Editor-in-Chief M.Dworkin, Eds S.Falkow, E.Rosenberg, K.-H.Schleifer, E.Stackebrandt. – 3rd ed., Vol. 1. – New York, USA: Springer, 2006. – P. 29–58.

Отримано 17.04.2010