

И. В. АСЕЕВА, А. П. ДОБРИЦА, Т. Г. ДОБРОВОЛЬСКАЯ, Б. Ф. ВАНЮШИН

**НУКЛЕОТИДНЫЙ СОСТАВ ДНК КОККОВИДНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЛИТОФИЛЬНЫХ
ЛИШАЙНИКОВ**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 6 X 1971)

В последние годы в систематике микроорганизмов наряду с традиционными морфологическим и физиолого-биохимическими признаками широко используются данные, характеризующие первичную структуру дезоксирибонуклеиновой кислоты — ДНК.

Такой подход интересен тем, что при этом изучаются не вторичные, фенотипические свойства организмов, а непосредственно геном клетки, материальной структурой которого является ДНК. Данные о нуклеотидном составе, характере распределения пиримидинов и степени гомологии ДНК помогают разрешить некоторые спорные вопросы систематики микроорганизмов.

Рядом авторов (¹⁻⁴) была предложена новая классификация семейства Microsossaceae на основании использования в качестве одного из главных признаков — нуклеотидного состава ДНК. По составу оснований в ДНК кокковидных микроорганизмов были четко разграничены два больших рода: род Microsoccus с содержанием ГЦ в ДНК 65—75 мол. % и род Staphylococcus 30,7—36,4 мол. % ГЦ. Дополнительным признаком для разделения этих родов послужило образование кислоты из глюкозы в анаэробных условиях. Культуры кокков, у которых содержание ГЦ составляло 48—51%, ранее входившие в род Microsoccus, предложено этими авторами выделить в особый род, с учетом также и других отличительных морфологических особенностей этих организмов.

Целью нашего исследования было определение систематического положения своеобразной группы кокковых микроорганизмов, выделенных из литофильных лишайников Памира и Тянь-Шаня и составляющих специфическую эпифитную микрофлору последних (⁵).

Изучаемые культуры характеризуются наличием красно-розового, оранжевого и желтого пигментов. В соответствии с характером пигментации они были разбиты на три группы. Микроорганизмы, колонии которых окрашены в оранжевый цвет, имеют правильную форму клеток, делятся в двух взаимно перпендикулярных направлениях, образуя тетрады. Морфологически близки к микрококкам.

Кокки с желтой окраской колоний образуют плотные конгломераты клеток, часто неопределенной конфигурации. Клетки после формирования перегородок остаются долго связанными друг с другом. Форма отдельных клеток, наблюдаемая под электронным микроскопом, не всегда правильная.

Особый интерес представляет установление таксономического положения кокков с красно-розовым пигментом. Клетки этих организмов имеют неправильно-сферическую, угловатую или клиновидную форму, часто клетки сдавлены с одной или нескольких сторон. В одной и той же культуре размер клеток варьирует от 0,5 до 3,0 м. Изучение морфологии и цикла развития этих организмов показало, что культуры имеют особый способ размножения, состоящий в неправильном, в нерегулярном деле-

нии (дроблении) крупных клеток на несколько более мелких. Поскольку перегородки проходят в случайных направлениях под разными углами и отсекают неравные части клетки, то образующиеся новые клетки имеют часто неправильную форму. Со временем клетки приобретают форму близкую к шаровидной и подвергаются обычному делению на две части.

Такой способ размножения является нормальным для изучаемых культур и сохраняется на всех средах при разных условиях культивирования.

Изучение ультратонкого строения показало, что клетки исследуемых микроорганизмов имеют все структуры, свойственные грамположительным бактериям. Полиморфизм кокков, проявляющийся в резких колебаниях величины и формы клеток в культуре, описан только для одного рода кокков — *Мусососсус* Krassilnicov, 1938 ⁽⁶⁾.

Таблица 1

Нуклеотидный состав ДНК кокковидных микроорганизмов

Группа	Род	Штамм	Содержание оснований в ДНК, мол. %				
			Г	А	Ц	Т	Г + Ц
Красно-розовая	<i>Мусососсус</i>	90н	34,1	15,8	34,5	15,6	68,6
		196н	34,5	15,4	34,6	15,5	69,1
		390	34,6	15,4	34,8	15,2	69,4
		8н	34,5	15,4	34,8	15,3	69,3
		303н	35,1	15,5	34,0	15,4	69,1
		360н	34,8	15,3	34,6	15,3	69,4
		129н	34,8	15,5	34,4	15,3	69,2
Оранжевая	<i>Мисрососсус</i>	96н	37,0	13,1	37,0	12,9	74,0
		384н	37,1	13,0	37,0	12,9	74,1
		130н	37,0	13,1	36,8	13,1	73,8
		94н	37,1	12,9	37,1	12,9	74,2
		216н	37,2	12,9	37,0	12,9	74,2
Желтая	<i>Мусососсус?</i>	191н	31,4	18,9	31,0	18,8	62,4
		256н	31,8	18,6	31,1	18,5	62,9
		199н	31,3	18,8	31,3	18,6	62,6
		338н	31,4	18,6	31,5	18,5	62,9
		411н	31,3	18,9	31,0	18,8	62,3

Для уточнения систематического положения изучаемых кокковидных микроорганизмов нами был определен нуклеотидный состав ДНК у 19 штаммов: 8 штаммов с красно-розовым пигментом, 6 штаммов с желтым, 5 штаммов с оранжевым пигментом.

Определение нуклеотидного состава ДНК проводили по методу Спирина и Белозерского ⁽⁷⁾ в модификации Ванюшина ⁽⁸⁾ в 3—4-суточных культурах, выращенных на среде МПБ с глицерином.

Полученные данные свидетельствуют о том, что группы кокков, выделенные первоначально по пигментации и морфологии, четко разграничиваются и по нуклеотидному составу (табл. 1).

ДНК всех изученных организмов по составу удовлетворяют правилам Чаргаффа и относятся к высокому ГЦ-типу. Внутри каждой группы наблюдается довольно строгая гомогенность штаммов по составу ДНК. Повидимому, каждая отмеченная группа штаммов представляет собой один вид.

Содержание ГЦ-пар оснований ДНК культур с оранжевым пигментом колеблется от 73,8 до 74,2 мол. %. По морфологическим и физиологическим признакам культуры этой группы близки к микрококкам. Данные по нуклеотидному составу подтверждают принадлежность этих микроорганизмов к роду *Мисрососсус*, у которого содержание ГЦ-пар в ДНК колеблется от 65 до 75 мол. %.

Таким образом, кокки с оранжевой окраской на основании морфологии, физиологии и состава ДНК отнесены нами к роду *Micrococcus*.

В ДНК культур с желтым пигментом содержание ГЦ-пар оснований колеблется от 62,3 до 62,9 мол.%, что явно ниже минимального, известного для ДНК микрококков (65 мол. % ГЦ).

Морфология этих микроорганизмов также не совсем типична для представителей рода *Micrococcus*. Поэтому культуры этой группы не могут быть определены как микрококки. Для выяснения систематического положения кокков с желтой окраской колоний требуются дополнительные данные, касающиеся способа деления клеток и цикла развития. Предположительно они могут быть отнесены к роду *Mycosoccus*.

Культуры с красно-розовой окраской колоний характеризуются содержанием ГЦ-пар оснований в ДНК 68,6—69,4 мол. % (табл. 1). Следова-

Таблица 2

Частота встречаемости пиримидиновых изоплит в ДНК бактерий, мол. %

Изоплиты	<i>Micrococcus</i> sp. штамм 94н	<i>Mycosoccus</i> sp. штамм 8н	<i>Arthrobacter</i> <i>citreus</i>
I	12,48±0,05	12,82±0,17	12,24±0,18
II	14,17±0,09	14,83±0,27	14,20±0,23
III	9,39±0,04	9,07±0,11	8,36±0,02
IV	6,00±0,18	6,00±0,03	5,65±0,10
V	3,50±0,17	3,62±0,12	3,66±0,07
VI	2,00±0,08	1,44±0,27	2,67±0,20
VII	2,46±0,20	2,22±0,12	3,22±0,42

тельно, по нуклеотидному составу ДНК этих организмов соответствует ДНК микрококков: 65—75 мол. % ГЦ. Однако морфологические особенности и цикл развития резко отличают их от представителей рода *Micrococcus*. На основании морфологических признаков, цикла развития, ультра-тонкого строения и физиологических свойств культуры красно-розовой группы отнесены нами к роду *Mycosoccus* Krassilnikov, 1938. Других родов кокков, характеризующихся таким полиморфизмом клеток при обычных условиях развития, в литературе не описано. Некоторые специфические особенности размножения, свойственные исследуемым коккам и не описанные для микрококков, вероятно, связаны с экологией этих организмов, со специфическими условиями обитания в высокогорных районах.

Сведения о микрококках в литературе весьма ограничены (⁹⁻¹⁰), а данные о составе их ДНК отсутствуют. В ДНК всех исследованных нами штаммов дополнительные минорные основания (5-метилцитозин, N₆-метиладенин) нами не обнаружены. По-видимому, отсутствие этих оснований в ДНК весьма характерно для видов из рода *Mycosoccus*, многих микрококков и других бактерий (¹¹). По составу ДНК изученные нами представители рода *Mycosoccus* довольно сходны с видами других близкородственных родов — *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, это подтверждает их родство, при условии сходства основных морфолого-физиологических признаков:

Микроорганизмы	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Mycosoccus</i>
ГЦ, %	62—68	65—75	62—70	66—70	68,6—69,7 (наши данные)

Наряду со сходством ряда фенотипических признаков и состава ДНК, микроорганизмы из этих относительно близкородственных родов в целом, по-видимому, весьма близки и по другим основным моментам организации их геномов. Так, например, оказалось, что изученные нами ДНК красных микрококков, оранжевых микрококков и *Arthrobacter* (ГЦ 65%) довольно

сходны по степени сблоченности пиримидинов и частоте встречаемости разных пиримидиновых изоплит (табл. 2). Аналогично большинству других бактерий (¹²⁻¹³) и в отличие от животных и растений (¹⁴), ДНК этих микроорганизмов характеризуются низкой степенью сблоченности пиримидинов и, кроме того, в них количество дипиримидиновых фрагментов выше, чем монопиримидиновых.

Таким образом, изученные пигментные группы кокков, выделенных из литофильных лишайников, четко разграничиваются как по морфологическим признакам, так и по нуклеотидному составу и относятся, по-видимому, к различным родам: культуры с красно-розовым пигментом — к роду *Mycosoccus* (68,6—69,4 мол. % ГЦ); оранжевая группа — к роду *Microsoccus* (73,8—74,2 мол. % ГЦ). Для определения родовой принадлежности желтой группы (62,3—62,9 мол. % ГЦ) продолжается изучение цикла развития и способа деления клеток.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
7 IX 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Косур, Т. Мартинес, *Folia Prirod. Faculty U. J. E. R.*, 3, 1 (1962). ² L. G. Silvestri, L. R. Hill, *J. Bacteriol.*, 90, 136 (1965). ³ A. Rosypalova, J. Bohacek, S. Rosypal, *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol.*, 32, 192 (1966). ⁴ J. Bohacek, М. Косур, Т. Мартинес, *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol.*, 35, 185 (1969). ⁵ И. П. Бабьева, И. С. Решетова и др., *Вестн. Московск. ун-в., сер. биол., почвовед.*, 5, 11 (1971). ⁶ Н. А. Красильников, *Микробиология*, 7, 335 (1938). ⁷ А. С. Спири, А. Н. Белозерский, *Биохимия*, 21, 768 (1956). ⁸ Б. Ф. Ванюшин, В сборн. *Современные методы в биохимии*, М., 1964, стр. 236. ⁹ И. Н. Позмогова, Р. Сахатов, Л. Г. Логинова, *Микробиол. пром.*, № 3 (1970). ¹⁰ Н. М. Мальцева, В. В. Изжеурова, *Микробиол. журн.*, № 1 (1970). ¹¹ B. F. Vanyushin, A. N. Belozersky et al., *Nature*, 218, 1066 (1968). ¹² K. Burton, *Biochem. J.*, 77, 547 (1960). ¹³ Б. Ф. Ванюшин, Е. П. Дедиева и др., *Научн. докл. высш. школы, Биол. науки*, № 12, 82 (1970). ¹⁴ А. Л. Мазин, Б. Ф. Ванюшин, *Молекулярная биол.*, 3, 846 (1969). ¹⁵ L. R. Hill, *J. Gen. Microbiol.*, 44, 419 (1966).