

УДК 424.576.851.12

ПАРАДОКСЫ БИОРАЗНООБРАЗИЯ, ФИЛОГЕНИИ И СИСТЕМАТИКИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

А.В. Пиневи́ч*(кафедра микробиологии биолого-почвенного факультета СПбГУ;
e-mail: pinevich.A@mail.ru)*

В начале 80-х гг. XX в. Роджер Стэниер аргументировал в рамках прокариотной концепции бактериальную природу синезеленых “водорослей” и переименовал их в цианобактерии (греч. *kíaneos* — темно-синий). Полоса неприятия ортодоксальными альгологами нового таксономического статуса этих микроорганизмов закончилась с выходом 2-го издания “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (2001).

По нуклеотидной последовательности 16S рДНК цианобактерии принадлежат к архаичной филе ВХ *Cyanobacteria* домена *Bacteria*. Их мембранная система — триплет СМ/ОМ/ИСМ, что соответствует усложненному бактериальному морфотипу (Пиневи́ч, 2006). По числу родов (56) фила занимает 4-е место среди бактерий; в нее входит единственный класс *Cyanobacteria*, состоящий из 5 субсекций, эквивалентных порядкам.

За исключением уникального свойства, способности к оксигенной фототрофии (Пиневи́ч, Аверина, 2002), цианобактерии, на первый взгляд, тривиальны. Однако в действительности этому филогенетическому таксону присущи парадоксы, анализу которых и посвящена данная статья.

Парадокс биоразнообразия

Для оценки биоразнообразия цианобактерий приведем характеристику их важнейших цитологических, метаболических и физиологических свойств, а также охарактеризуем их распределение по природным нишам.

Цитология. Все цианобактерии имеют оболочку граммотрицательного типа и за одним исключением (*Gloeobacter violaceus*) постоянно содержат ламеллярные ИСМ, или тилакоиды. Размер клеток от 0,5 (род *Prochlorococcus*) до > 100 мкм (род *Oscillatoria*). Деление бинарно-эквивалентное, бинарно-неэквивалентное (почкование) или множественное с образованием до 2¹⁰ дочерних клеток (беоцитов). Одноклеточные цианобактерии сферической, эллипсоидной, палочковидной (редко — изогнутой) или веретеновидной формы, одиночные или в агрегатах, стабилизированных капсулой либо чехлом. Нитчатые, или трихомные, цианобактерии имеют интеркалярные клетки цилиндрической, сплюснутой или лопастной формы и терминальные клетки с за-

кругленным или коническим (редко — загнутым) концом. Трихомы прямые или спирализованные, однорядные или многорядные, окруженные чехлом или без чехла, с ложным или истинным ветвлением. Некоторые в условиях стресса образуют миниатюрные трихомы (гормогонии), устойчивые к физико-химическому повреждению цисты (акинеты), а также ассимилирующие N₂ диазотисты (гетероцисты). Активно подвижные формы перемещаются скольжением; пассивная вертикальная миграция происходит за счет образования газовых везикул (всплытие) или полиглюкозидных включений (погружение).

Метаболизм. Цианобактерии — облигатные или факультативные фототрофы с тандемом реакционных центров RC1/RCII, содержащих хлорофилл *a* (*a/d* в случае *Acaryochloris marina*). Светособирающая антенна — эпимембранная частица (фикобилисома), состоящая из фикобилипротеинов, взаимосвязанных линкерными полипептидами. Члены группы прохлорофитов вместо фикобилисомы (или наряду с ней) обладают интегральной светособирающей антенной — в первом случае в нее входят хлорофиллы *a/b* (родов *Prochloron* и *Prochlorothrix*) или хлорофиллы *a₂/b₂* (род *Prochlorococcus*), во втором случае хлорофилл *d* (род *Acaryochloris*). Фототрофия оксигенного типа, на основе H₂O-дегидрогеназного комплекса; возможна факультативно аноксигенная фототрофия (донор электронов S²⁻). Фотоавтотрофы, ассимилируют CO₂ через цикл Кельвина—Бенсона—Бессема, реже фотогетеротрофы, ассимилируют сахара или ацетат или миксотрофы. Редко растут в темноте на экзогенных сахарах, спиртах или ацетате за счет аэробного дыхания, а также могут поддерживать жизнеспособность за счет серного дыхания или гликолиза, используя запасные полиглюкозиды. У многих наблюдается диазотрофия, для чего необходимо находиться в микроаэробной среде или обладать механизмами защиты нитрогеназы от кислорода, в том числе путем дифференциации гетероцист.

Физиология и ниши. Цианобактерии мезофилы, редко термофилы (в горячих источниках до 75°) или психрофилы (в пресных субполярных водоемах). Многие развиваются в аридных зонах и при высокой солености. Нейтрофилы, редко экстремальные алкалофилы (pH > 10). Вступают в симбиоз с дру-

гими бактериями, протистами, растениями, грибами и животными. Цианобактерии считают космополитами, хотя среди них есть эндемики, например *G. violaceus*. В водоемах плавают по поверхности, а также ведут планктонный или сидячий образ жизни, в последнем случае входят в состав микробных матов. Образуют биопленки на твердых субстратах. Некоторые относятся к эндолитам. Среди симбионтов есть ассоциативные, эпи- и эндосимбионты. Могут образовывать гиперпопуляции, вызывающие цветение водоемов.

Как видно, главный парадокс биоразнообразия цианобактерий в том, что они сильно варьируют по цитологическим признакам при однотипном метаболизме.

Парадокс филогении

Использование разных алгоритмов для обработки результатов секвенирования 16S рДНК показало, что дендрограмма цианобактерий — не ветвящийся ствол, а сжатый веер. Вероятно, фила ВХ *Cyanobacteria* “взрывообразно” формировалась одновременно с возникновением оксигенной фототрофии, т.е. ее ветви дивергировали на короткой дистанции. Именно это не позволяет разработать филогенетическую систему с отчетливой иерархией таксономических уровней.

По данным секвенирования 16S рДНК, цианобактерии образуют 14 кластеров, помимо них существуют последовательности-одиночки (Пиневиц, Аверина, 2002).

Кластер I включает трихомные формы, образующие гетероцисты (рода *Nostoc*, *Fischerella* и др.). Кластер II представлен ансамблем одноклеточных форм и содержит пикопланктонные штаммы *Synechococcus* из Саргассова моря, пресноводные штаммы рода *Cyanobium* с крупными клетками, а также штаммы рода *Prochlorococcus*. Кластер III состоит из нескольких штаммов нитчатых прохлорофитов рода *Prochlorothrix*. Кластер IV объединяет морские штаммы рода *Leptolyngbya*, имеющие узкие трихомы и содержащие фикоэритрин; с ними группируется морской одноклеточный штамм *Synechococcus* sp. PCC 7335. Кластер V — это пресноводные штаммы рода *Leptolyngbya*. Кластер VI состоит из штаммов рода *Pseudanabaena* — трихомных цианобактерий осцилляториевого типа, которые образуют агрегаты газовых везикул, расположенные у поперечных перегородок, а также характерные перетяжки между соседними клетками. Кластер VII объединяет штаммы одноклеточных галотолерантных цианобактерий эллипсоидной (род *Cyanothece*) или палочковидной (род *Dactylococcopsis*) формы. Кластер VIII содержит одноклеточные штаммы, образующие беоциты (род *Pleurocapsa* и др.). Кластер IX объединяет штаммы рода *Spirulina*. Кластер X представляет собой гетерогенный ансамбль одноклеточных (*Sy-*

nechococcus sp. PCC 7002 и др.) или трихомных (*Leptolyngbya* sp. PCC 7376 и др.) штаммов. Кластер XI — одноклеточные бинарно делящиеся штаммы (*Synechocystis* sp. PCC 6803, *Microcystis* sp. PCC 7941 и др.). Кластер XII состоит из группы штаммов трихомных цианобактерий родов *Oscillatoria* и *Trichodesmium*. Кластер XIII содержит штаммы с прямыми (*Lyngbya* sp. PCC 7419 и др.) или спиральными (*Arthrospira* sp. PCC 8005 и др.) трихомами. Кластер XIV представлен трихомными штаммами осцилляториевого типа (род *Geitlerinema*).

Таким образом, главный парадокс филогении цианобактерий в том, что структурные гены рРНК слишком консервативны для такой крупной филы. На парадоксальном родословном древе соседствуют объекты с резко контрастными фенотипами, а объекты со сходными фенотипами имеют гетерологичную структуру 16S рДНК.

Парадокс систематики

Во 2-м издании “Bergey’s Manual...” цианобактерии разбиты на 5 квазитаксономических групп, или субсекций (англ. Subsection). Для их диагноза используется дихотомический ключ: морфотип одноклеточный или квазимногоклеточный (трихомный); деление бинарное или множественное (с образованием беоцитов); наличие или отсутствие дифференцированных клеток (акинет и гетероцист); отсутствие или наличие ветвления (истинного или ложного) у трихома.

Субсекция I, или порядок “Chroococcales”. Названа по “форме-роду” *Chroococcus*. Содержит 14 “форм-родов”. Это одноклеточные цианобактерии, делящиеся бинарно-эквивалентно (род *Synechococcus*) или бинарно-неэквивалентно (род *Chamaesiphon*). К числу важнейших диагностических признаков относятся: отсутствие ИСМ (род *Gloeobacter*); последовательная реориентация плоскости деления на 90°, приводящая к образованию тетрад и кубических пакетов (род *Synechocystis*); образование концентрических чехлов, удерживающих клетки в неупорядоченных агрегатах (род *Gloeotheca*); наличие газовых везикул (род *Microcystis*). Для сборных родов (род *Chroococcus*) предложено подразделение на кластеры, в которые входят штаммы с разным размером клетки и разным молярным % ГЦ-пар. Помимо обычных цианобактерий, в эту субсекцию помещены одноклеточные прохлорофиты — роды *Prochloron* и *Prochlorococcus*.

Субсекция II, или порядок “Pleurocapsales”. Названа по “группе” *Pleurocapsa*. Состоит из 6 “форм-родов”, а также сборной “группы” *Pleurocapsa*, которая подразделяется на 3 кластера штаммов с клетками разного размера и разным молярным % ГЦ-пар. Это одноклеточные цианобактерии, способные к множественному делению на беоциты. Ведущими диагностическими признаками служат: нали-

чие (род *Stanieria*) или отсутствие (род *Xenococcus*) подвижности у беоцитов, что связано с отсутствием или образованием чехла; способность к бинарному делению помимо множественного (род *Dermocarpella*); последовательная реориентация плоскости деления на 90°, приводящая к образованию кубических пакетов клеток (род *Myxosarcina*); преобладание бинарного деления над множественным с возникновением филаментозных или ветвящихся агрегатов (“группа” *Pleurocapsa*).

Субсекция III, или порядок “Oscillatoriales”. Названа по “форме-роду” *Oscillatoria*. Содержит 17 “форм-родов”. Это трихомные цианобактерии, неспособные образовывать акинеты и гетероцисты. У них отсутствует истинное ветвление, хотя в некоторых случаях при образовании чехла наблюдается ложное ветвление. Ведущими диагностическими признаками служат: дискоидная форма клетки (род *Oscillatoria*); овальное (род *Crinalium*) или лопастное (род *Starria*) поперечное сечение клетки; присутствие агрегатов газовых везикул (род *Limnothrix*); присутствие (род *Pseudanabaena*) или отсутствие (род *Geitlerinema*) перетяжек между соседними клетками трихома; “бревитрихомия”, или образование олигомерных трихомов по 2–10 клеток (род *Borzia*); спирализация трихома (род *Spirulina*); образование чехла (род *Lyngbya*); объединение трихомов в пучки (роды *Microcoleus* и *Trichodesmium*); способность к ложному ветвлению (род *Symploca*). Помимо обычных цианобактерий, в данную субсекцию помещен нитчатый прохлорофит — род *Prochlorothrix*.

Субсекция IV, или порядок “Nostocales”. Объединяет трихомные цианобактерии, неспособные к истинному ветвлению. В стрессовых условиях образуют акинеты и гетероцисты, а также дифференцированные ювенильные трихомы (гормогонии), которые в онтогенезе выполняют роль расселительной стадии. Данная субсекция подразделяется на две части — IV.I (9 “форм-родов”) и IV.II (3 “формы-рода”). В первом случае трихом никогда не проявляет базеоапикальную полярность, а гормогонии, как правило, не образуются. Во втором случае полярность трихома выражена и образуются гормогонии значительно меньше родительского трихома. Ведущими диагностическими признаками служат: дискоидная форма клетки (род *Nodularia*); спирализация трихома (род *Cyanospira*); способность к ложному ветвлению (род *Scytonema*); объединение трихомов в пучки (род *Aphanizomenon*); образование крупных гетероцист (род *Anabaenopsis*) и крупных цилиндрических акинет (род *Cylindrospermum*); подвижные (род *Nostoc*) или неподвижные (род *Calothrix*) гормогонии. Представители сборных родов (например, род *Anabaena*) подразделяются на кластеры штаммов с клетками разного размера, разным молярным % ГЦ и разным размером генома.

Субсекция V, или порядок “Stigonematales”. Содержит 6 “форм-родов”, объединяющих цианобак-

терии с истинно ветвящимися трихомами. Они могут образовывать гетероцисты и акинеты, а также гормогонии. Это наиболее сложные в морфологическом отношении цианобактерии. Ведущими диагностическими признаками служат: дихотомическое (род *Geitleria*) или латерально-нерегулярное (род *Fischerella*) истинное ветвление; однорядный (род *Fischerella*) или многорядный (род *Stigonema*) трихом; фрагментация трихомов на отдельные клетки (род *Chlorogloeopsis*); наличие (род *Nostochopsis*) или отсутствие (род *Geitleria*) гетероцист, а также их локализация; образование гормогониев (род *Iyengariella*).

При сопоставлении таксономического состава филы ВХ *Cyanobacteria* с дендрограммой видно, что часть субсекций нельзя считать естественными ансамблями — в частности, морфологически простые представители субсекции I полифилетичны. Морфологически сложные представители субсекций IV и V, напротив, монофилетичны. Наряду с цианобактериями к этой филе относятся пластиды, в том числе наиболее архаичные (цианеллы).

Таким образом, цианобактерии фенотипически консервативны (имеют одинаковый тип клеточного строения и используют общий способ питания) и характеризуются узким спектром генной дивергенции (не подразделяются на субфилы). По этой причине систематика цианобактерий логически противоречива (Pinevich et al., 1997).

С одной стороны, филы ВХ *Cyanobacteria* в целом обособляются на молекулярно-филогенетической основе. С другой стороны, в соответствии с традиционным ботаническим алгоритмом, который используется при классификации синезеленых “водорослей”, она искусственно разбита на морфологические группы (ультраструктурные признаки учитываются лишь в единичных случаях).

Наконец, уникальная особенность систематики цианобактерий (за немногими исключениями, например *Cyanobacterium stanieri*) — это тотальный отказ от использования категории вида; место видового эпитета занимает штаммовый индекс (например, *Anabaena* sp. PCC 7122).

Прохлорофиты и “группа” *Pleurocapsa* как пробный камень для систематики цианобактерий

Сравнительный анализ последовательностей 16S рДНК позволяет проследить истинную филогению, однако использование этого критерия для близкородственных организмов, в частности для демаркации видов, ограничено. Примером служат прохлорофиты рода *Prochlorothrix*.

Прохлорофитами называют атипичные цианобактерии, которые содержат хотя бы один вспомогательный хлорофилл (Пиневи́ч, Аверина, 2002). В ранних версиях таксономии цианобактерий та-

кие объекты рассматривались обособленно. Предложение по реорганизации системы оксигенных фототрофов (Pinevich et al., 1997), переводящее “пигментный” критерий в ранг второстепенного, было использовано без ссылки на приоритет во 2-м издании “Bergey’s Manual...”. По этому же предложению, одноклеточные и трихомные прохлорофиты попали в субсекции I и III.

Валидность предварительного фенотипического разграничения трихомных прохлорофитов на видовом уровне (Pinevich et al., 1999) была недавно оценена нами с помощью геносистематических критериев. Как известно, условными границами вида для прокариот являются: Δ мол. % ГЦ ≤ 5 (Блохина, Леванова, 1990), % ДНК—ДНК-гибридизации ≥ 30 (Wayne et al., 1987) и % гомологии 16S рДНК ≥ 97 (Cohan, 2002). Для *Prochlorothrix hollandica* и “*P. scandica*” Δ мол.% ГЦ составляет 6, % ДНК—ДНК-гибридизации 17, а % гомологии 16S рДНК 98 (Тимофеева et al., 2003). Формально по третьему критерию “*P. scandica*” не является самостоятельным видом.

Дополнительные сведения для выявления связей на (суб)видовом уровне можно получить путем анализа внутреннего транскрибируемого спейсера между генами 16S рДНК и 23S рДНК (16S—23S ITS; см.: Boyer et al., 2001). Нами выявлен один 16S—23S ITS у *P. hollandica* и два 16S—23S ITS у “*P. scandica*”, из которых больший на 99% идентичен единственному 16S—23S ITS у *P. hollandica*, а взаимная гомология большего и меньшего прослеживается лишь в отдельных участках (Pinevich et al., неопубликованные данные).

Для определения принадлежности изолятов цианобактерий к разным видам также проводится анализ палиндромной последовательности HIP1, часто

встречающейся в хромосомной ДНК (Robinson et al., 1995). При использовании двух пар праймеров для амплификации HIP1 нами получены резко контрастные профили электрофоретического разделения ПЦР-продуктов для *P. hollandica* и “*P. scandica*” (Velichko, Pinevich, неопубликованные данные), т.е. по данному критерию это два разные вида.

В систематике цианобактерий парадоксально сосуществуют антагонистические тенденции, которые порождены беспрецедентным отходом от использования бинарной номенклатуры.

С одной стороны, в качестве видового критерия избираются уникальная морфология (*Crinalium epipsammum*, *Cyanospira rippkae*, *Starria zimbabweensis*), ультраструктура (*Gloeobacter violaceus*) или пигментный состав (прохлорофиты). Согласно требованиям полифазной таксономии (см.: Rosselló-Mora, Amann, 2001) наряду с комплексом фенотипических признаков могут использоваться геносистематические критерии.

С другой стороны, из-за неопределенности критерия вида у цианобактерий они могут стать испытательным полигоном для отказа от этой таксономической категории у прокариотов в целом. В случае “группы” *Pleurocapsa* мы даже сталкиваемся с парадоксальным отказом от критерия рода и общим признаком субсекции II, или порядка “*Pleurocapsales*”, служит уникальный тип множественного деления в сочетании с обособленным положением кластера VIII на дендрограмме филы VX *Cyanobacteria*.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 05—04—49621).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Блохина И.Н., Леванова Г.Ф. 1990. Геносистематика бактерий и ее прикладное значение // Усп. микробиол. **24**. 3—25.
- Пиневи́ч А.В. 2006. Микробиология. СПб. 351 с.
- Пиневи́ч А.В., Аверина С.Г. 2002. Оксигенная фототрофия. СПб. 234 с.
- Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. 2001 / Eds. D.R. Boone, R.W. Castenholz. New York. 721 p.
- Boyer S.L., Flechtner V.R., Johansen J.R. 2001. Is the 16S—23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in *Cyanobacteria* // Mol. Biol. Evol. **18**. 1057—1069.
- Cohan F.M. 2002. What are bacterial species? // Ann. Rev. Microbiol. **56**. 457—487.
- Pinevich A.V., Averina S.G., Velichko N.V. 1997. Another view on the role of photosynthetic pigments in taxonomy of oxygenic-phototrophic bacteria // Int. J. Syst. Bacteriol. **47**. 1264—1267.
- Pinevich A.V., Skulberg O.M., Matthijs H.C.P., Schubert H., Willen E., Gavrilova O.V., Velichko N.V. 1999. Characterization of a novel chlorophyll *b*-containing *Prochlorothrix* species (*Prochlorophyta*) and its photosynthetic apparatus // Microbios. **100**. 159—174.
- Robinson N.J. 1995. Singular over-representation of an octameric palindrome, HIP1, in DNA from many cyanobacteria // Nucl. Acids Res. **23**. 729—735.
- Rosselló-Mora R., Amann R. 2001. The species concept for prokaryotes // FEMS Microbiol. Rev. **25**. 39—67.
- Timofeyeva A., Verbitskaya A., Pinevich A. 2003. Genetic diversity of filamentous chlorophyll *b*-bearing cyanobacteria // Abstr. 11th Int. Symp. on Phototrophic Prokaryotes. Tokyo. P. 2—3.
- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R. 1987. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics // Int. J. Syst. Bacteriol. **37**. 463—464.

**PARADOXES OF BIODIVERSITY, PHYLOGENY,
AND TAXONOMY OF CYANOBACTERIA***A.V. Pinevich*

Cyanobacterial biodiversity is paradoxical, since they strongly vary in cytological characters being metabolically uniform. Cyanobacterial phylogeny is also paradoxical, since structural genes of rRNA are too conservative for a large phylum. On the paradoxical evolutionary tree, neighbors with strongly contrast phenotypes reside, while objects with alike phenotypes demonstrate heterological structure of 16S rDNA. Cyanobacterial systematics is paradoxical too, since it is logically contradictory (on the one hand, phylum BX *Cyanobacteria* generally separates itself on molecular-biological grounds; on the other hand, in accordance with traditional botany algorithm which is used in the classification of blue-green algae, this phylum artificially subdivides itself in morphological groups (ultrastructural characters are taken into account in rare instances only). The unique peculiarity of cyanobacterial taxonomy (with rare exceptions, e.g. *Cyanobacterium stanieri*) is its general non-usage of the category of species; species epithet is substituted for by strain index (e.g. *Anabaena* sp. PCC 7122).