

И.В.Грачева, Т.Б.Караваяева, Т.К.Меркулова, О.П.Плотников

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ КЛАССИФИКАЦИИ НЕКОТОРЫХ ПАТОГЕННЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДОВ *BACILLUS*, *BRUCELLA*, *BURKHOLDERIA*, *FRANCISELLA*, *VIBRIO*, *YERSINIA*

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В работе рассмотрены современные принципы классификации прокариот, определение и границы прокариотического вида как единицы классификации и идентификации, критерии законности научных названий микроорганизмов. Прослежены основные изменения в классификации некоторых патогенных представителей родов *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia*, в первую очередь патогенов I–II групп, после выхода в 1980 г. Одобренных списков названий бактерий. Рассмотрены перспективы развития и совершенствования прокариотической классификации, основанной на филогении 16S рПНК.

Ключевые слова: *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia*, таксономия, классификация, филогения.

Классификация прокариотических организмов и систематика в целом являются очень динамичными разделами биологии. Новые методологии в изучении прокариот, накопление данных об их свойствах и структуре генома являются основой для совершенствования классификаций и их периодического пересмотра. Изменения в иерархической классификации прокариот в последние два десятилетия являются результатом использования молекулярных методов в таксономических исследованиях, в первую очередь секвенирования 16S рПНК или кодирующих ее генов (16S рДНК).

Цель классификации – упорядочение большого числа реально существующих в природе биологических объектов в систему, состоящую из формальных групп (таксонов) и основанную на принципах подобия и эволюционной связанности. Для прокариотической систематики характерен постоянный поиск объективных методов классификации изолятов в гомогенные группы для создания иерархической эволюционной системы, полезной в практической и научной работе. Первые фенотипические классификации были основаны на подобии классифицируемых объектов по морфологическим, затем физиологическим, биохимическим, хемотаксономическим признакам. Достижения в области молекулярной биологии в конце 70-х годов позволили начать разработку новых подходов к классификации, основанных на сравнении геномов. В 1987 г. экспертами Международного комитета по систематике бактерий (МКСБ, в последующем Международный комитет по систематике прокариот – МКСП) было определено, что самым надежным основанием для классификации прокариот является филогения, и она должна определять их таксономию.

Современное направление в таксономии прокариот называют таксономией согласия или полифазной таксономией [19, 37]. Она основана на учете филогенетических, генетических, фенотипических, хемотаксономических критериев при классификации.

В качестве филогенетического маркера, «молекулярного хронометра» эволюции прокариот, позволяющего измерять относительное время дивергенции организмов, в настоящее время принято использовать последовательности генов 16S рПНК или 16S рДНК, на основании которых построена современная иерархическая классификация [38].

Базовой единицей классификации биологических объектов является вид. Среди микробиологов нет согласия по вопросу определения вида у прокариот [2, 10, 11, 33, 34]. Экспертами МКСП сформулированы компромиссные рабочие определения прокариотического вида, как базовой единицы классификации и идентификации. Последнее определение было представлено в сообщении специального комитета по пересмотру определения вида в бактериологии в 2002 г. [37].

Описание прокариотического вида на современном этапе стало достаточно прагматичным. Экспертами МКСП рекомендованы формальные молекулярные критерии границ прокариотического вида, в соответствии с которыми расхождение в последовательностях 16S рПНК (16S рДНК) более 1 % свидетельствует о принадлежности бактерий к разным видам [37, 39]. Если процент гомологии более 99, помещение изолятов в один или два разных вида устанавливается по результатам ДНК-ДНК гибридизации. К одному виду, как правило, относят штаммы, показывающие не менее 70 % подобия ДНК с ДНК типового штамма, определяемого в строго стандартизированных условиях. Эти два подхода являются «золотыми» стандартами в современных таксономических исследованиях при определении границ вида (ДНК-ДНК гибридизация) и при выяснении филогенетических отношений таксонов более высоко ранга (секвенирование 16S рДНК) и применяются при описании подавляющего большинства новых видов. Однако данные рекомендации не должны использоваться как установленное правило. Для многих патогенных микроорганизмов значение ДНК-ДНК подо-

бия не учитывается для лучшей корреляции фено- и генотипических данных и экологических особенностей [37]. Учитывая недостатки метода гибридизации, применяемого в таксономии более 30 лет, МКСП поощряет исследователей использовать другие молекулярные методы при описании видов, показывающие высокую корреляцию с ДНК-ДНК гибридизацией в пределах описываемого таксона, чтобы в будущем дополнить и заменить основной на сегодня формальный критерий вида у прокариот [37].

Для упорядочения классификации на внутривидовом и внутривидовом уровне в качестве перспективных рассматриваются методы сравнения целых геномов (AFLP-анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов, RAPD-метод амплификации полиморфной ДНК с произвольно выбранными праймерами, PFGE-гель-электрофорез в пульсирующем поле), отдельных кластеров генов, межгенных областей 16S-23S рДНК, мультилокусного секвенирования консервативных генов [37, 41]. В качестве альтернативы ДНК-ДНК гибридизации предлагается использование метода определения средней идентичности нуклеотидов (ANI), вычисленной от попарного сравнения общих генов двух штаммов [34]. На примере 70 близко связанных и полностью секвенированных геномов показано, что 70 % ДНК-ДНК подобие соответствует приблизительно 95 % средней идентичности нуклеотидов.

Фенотипические признаки являются такими же важными при описании нового вида, как и молекулярные, особенно те, которые позволяют дифференцировать его от других близкородственных видов. Специалистами в области популяционной генетики и микробной экологии обсуждается необходимость учета экологических особенностей в классификации при определении границ вида прокариот, а также предлагается введение нового подвидового таксона – эковара, определяемого на основе нуклеотидной последовательности метаболических генов [13, 15, 16, 33]. Экологический критерий имеет приоритетное значение в классификации патогенных бактерий, для которых достаточно четко определены занимаемые экологические ниши [37]. Определение границ таксонов высокого ранга в настоящее время остается более субъективным, существует необходимость в руководящих принципах для обозначения подвидов [18].

В современной прокариотической систематике не существует понятия «официальная классификация» [18]. Вопросы таксономии – это вопросы научного суждения и общего соглашения. Описание новых таксонов является ответственностью предложивших их авторов, при этом определены правила составления, предложения и использования научных названий таксонов. Международные согласованные принципы и правила номенклатуры сформулированы в Международном кодексе номенклатуры бактерий (Бактериологический кодекс, 1990 г., пересмотр), разработанном МКСБ [5, 17]. Бактериологический кодекс определяет использование в научном сообще-

стве только законно изданных названий таксонов, имеющих положение в официальной номенклатуре.

Название таксона является законно изданным в случае соблюдения одного из нижеследующих критериев [5, 17]:

1. Название процитировано в Одобренных списках названий бактерий (Validation Lists – Одобренные списки), изданных Юридической комиссией МКСБ в 1980 г. Одобренные списки временно устранили постоянную проблему систематики – синонимию. В литературе для большинства давно описанных микроорганизмов можно найти несколько различных латинских видовых названий, отражающих изменение принципов и критериев классификации и взглядов микробиологов на положение микроорганизма в существующей системе. За прошедшие почти 30 лет после опубликования Одобренных списков произошли значительные изменения в классификации прокариот, что естественно привело к изменению их номенклатуры. Из более чем 6500 законно изданных на 2002 г. названий бактерий треть уже является синонимами.

2. Название должно быть предложено в статьях, опубликованных в Международном журнале систематической бактериологии (МЖСБ до 1999 г. включительно) или в Журнале систематической и эволюционной микробиологии (МЖСЭМ после 2000 г.) в соответствии с требованиями Бактериологического кодекса, который определяет обязательное открытое депонирование типового штамма нового вида или референтного для подвида в двух признанных коллекциях, находящихся в разных странах, что гарантирует доступность штамма для исследователей.

3. Название может быть предложено в статьях, изданных в признанных научных журналах на доступном для большинства бактериологов языке в соответствии с правилами Бактериологического кодекса. Для получения статуса законно опубликованного названия позднее оно должно быть процитировано в Validation Lists, публикуемых в МЖСЭМ, и дата этой публикации определяет приоритет названия [18].

Хотя понятия «официальная прокариотическая классификация» не существует, и бактериолог может использовать любое законно опубликованное название, соответствующее правильной с его точки зрения классификации, на практике придерживаются классификации, приводимой в Руководстве (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) и Определителях Берджи (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology). Эти периодические издания учитывают все законно изданные названия прокариотических таксонов и соответствующие им изменения в классификации.

В 2001 г. вышел первый том второго издания Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, в который вошли законно опубликованные названия новых видов, их положение в классификации, основанной на филогении 16S рРНК. В новом издании представлены два новых таксона самого высокого ранга – домены и филумы [цит. по 9].

Использование молекулярно-генетических методов в таксономических исследованиях привело к изменению систематического положения давно описанных видов. Новые таксономические подходы были применены в исследованиях патогенных микроорганизмов, в том числе относимых к I–II группе патогенности. Изменился видовой состав родов и родовой состав семейств, включающих патогены, на основе филогении 16S рРНК определено их положение в современной иерархической классификации на уровне таксонов высокого ранга. Изменения в номенклатуре (в классификации на уровне рода и вида) произведены только для возбудителей сапа и мелиоидоза, что в значительной степени связано с действием Правила 56а Бактериологического кодекса, которое вводит понятие рискованного имени (*nomina periculosis*). Это название, использование которого в бактериологии подвергает опасности жизнь и здоровье людей [5, 17]. МКСП также рекомендовано в случае патогенных бактерий, имеющих медицинское и ветеринарное значение, не следовать текущим генетическим критериям при классификации, если это возможно (и должно), вести и сохранять номенклатуру, отличающую таксоны очень близкие в генетическом плане [37]. Для патогенных микроорганизмов стабильность номенклатуры рассматривается как важнейший принцип их классификации. Этой точки зрения придерживаются все бактериологи и Юридическая комиссия МКСП.

Рассмотрим основные изменения в классификации некоторых патогенных видов родов *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia* после выхода Одобрённых списков (1980) на уровне таксонов, охваченных правилами Бактериологического кодекса (выше ранга подвида и ниже ранга класса).

Род *Bacillus*. Классификация рода *Bacillus* очень динамична. Это связано, во-первых, с описанием новых видов бацилл. Род *Bacillus* на 01.01.1980 г. включал 31 вид, объединённый на основании фенотипических признаков [6]. За последние 1,5 года описано 3 новых вида рода *Bacillus* [18]. Во-вторых, в последние годы род подвергся реклассификации. Разделение в восемь родов базировалось на секвенировании 16S рРНК, структуре пептидогликана, форме клетки и споры, способности к анаэробному росту, способности роста на средах с 10 % NaCl, составе жирных кислот [38]. Реклассификация рода и семейства идет медленными темпами, что связано с существенными различиями между фенотипической классификацией и филогенетическим положением видов.

Проблемой классификации бацилл является наличие генетически родственных видов, отличающихся по комплексу фенотипических признаков. Первые эксперименты по ДНК-ДНК гибридизации бацилл показали ДНК-ДНК подобие на уровне одного вида для *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis*, классифицированных как самостоятельные таксоны на основании фенотипических признаков, значительная часть которых детерминируется плазмид-

ными генами, и экологических особенностей [18, 38]. Филогенетические исследования 3 видов бацилл свидетельствуют о более чем 99 % гомологии их 16S рРНК. Сравнительный анализ геномов показывает сохранение набора общих генов (75–80 %) между видами, что, вероятно, связано с недавним расхождением от общей предковой формы [44]. На основании молекулярных исследований бацилл и рекомендованных формальных критериев вида неоднократно предлагалось объединить *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis* в один вид *B. anthracis* с тремя подвидами [19, 26]. По соображениям медицинской важности *B. anthracis* и *B. cereus*, способного вызывать пищевые отравления при накоплении в продуктах питания, экономического значения *B. thuringiensis*, используемого в биологической борьбе с насекомыми, в соответствии с Правилем 56а Бактериологического кодекса для этих бактерий сохранен видовой статус и оставлены разные названия в использовании [19, 37].

Возбудитель сибирской язвы является гомогенным видом по фено- и генотипическим свойствам, что связывают с низкой частотой внутривидовой и внутриродовой рекомбинации, обусловленной особенностями жизненного цикла: длительным нахождением в состоянии анабиоза в виде спор и взрывным развитием в период вегетативной фазы [44]. Систематическое положение возбудителя сибирской язвы в текущей классификации представлено в табл. 1.

На сегодняшний день род остается гетерогенным, и классификация бацилл будет подвергаться дальнейшим изменениям для создания монофилетических видов и родов.

Род *Brucella*. В соответствии с Одобрёнными списками род *Brucella* на 01.01.1980 г. включал 6 видов, классифицированных на основании фенотипических признаков, различной патогенности для человека и вида основного хозяина. Положение бруцелл в иерархической системе классификации долгое время не было определено, и его относили к родам с неясным систематическим положением [8].

Виды рода *Brucella* характеризуются ДНК-ДНК подобием в гибридизации на уровне одного геномо-

Таблица 1

Иерархическая классификация <i>B. anthracis</i> , <i>Brucella</i> spp., <i>B. mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i>			
Ранг таксона	Название таксона		
Вид	<i>B. anthracis</i>	<i>Brucella</i> spp.	<i>B. mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i>
Домен	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>
Филум	<i>Firmicutes</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
Класс	<i>Bacilli</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>
Порядок	<i>Bacillales</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Burkholderiales</i>
Семейство	<i>Bacillaceae</i>	<i>Brucellaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>
Род	<i>Bacillus</i>	<i>Brucella</i>	<i>Burkholderia</i>
Типовой вид	<i>B. subtilis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. cepacia</i>

вида (более 70 %). На основании ДНК-ДНК гибридизации было предложено объединить известные виды бруцелл в один *B. melitensis* с 18 биоварами [43]. Изменения были обсуждены и одобрены на заседании подкомитета по таксономии бруцелл в Манчестере в 1986 году [28]. Юридической комиссии предложено изменить таксономическое мнение относительно рода, как моновидового, на основании только ДНК-ДНК гибридизации. Пять номенклатурных видов получили такой же статус, как и биовары, выделенные в пределах видов *B. abortus*, *B. ovis*, *B. melitensis*.

Новая классификация не нашла широкой поддержки среди бактериологов, и на практике продолжали использовать законно опубликованные в Одобренных списках названия классических видов бруцелл.

В 1994 г. на очередном заседании члены подкомитета по таксономии бруцелл отметили отсутствие четкой концепции вида и биовара в пределах рода *Brucella* и предложили сохранить классификацию, в которой номенклатурный вид эквивалентен эковиду, до получения дополнительных геномных доказательств моноопределенности рода [29]. Через 10 лет члены подкомитета на заседании в Испании единодушно высказались за возвращение к классификации бруцелл, существовавшей до 1986 г., когда каждый эквид бруцелл имел статус номенклатурного вида, и обратились в Юридическую комиссию с запросом об изменении таксономического мнения о роде *Brucella* [30]. По мнению подкомитета, «манчестерская» классификация рассматривается как правильная на основании генетических исследований, но вводит в заблуждение эпидемиологов, рассматривающих связанность номенклатурного вида с определенным видом животного и географическим распространением.

В соответствии с текущей классификацией род включает 9 видов. В 1994 г. появилось сообщение о выделении на побережье Шотландии от морских млекопитающих семейства китовых новых видов бруцелл. Названия новых видов *B. ceti* и *B. pinnipedialis* законно опубликованы в 2007 г. [31]. В период эпизоотии на юге Моравии в 1999 г. от больных диких полевок выделены культуры, соответствующие по фено- и генотипическим свойствам роду *Brucella*. Название нового вида *B. microti* законно опубликовано в 2008 г. [31].

Филогенетические исследования бруцелл показали их близкую связь с родами *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Phyllobacterium*, *Ochrotrichum* [9, 23, 29]. Положение бруцелл в иерархической системе классификации, представлено в табл. 1.

Современные таксономические исследования бруцелл направлены на разработку альтернативных фено- и генотипических критериев видов и биоваров рода *Brucella*. Подкомитет по таксономии бруцелл считает необходимым дополнить критерии определения видов рода *Brucella* с учетом новых видов,

развивать филогенетически-эволюционный подход к таксономии бруцелл, где важнейшими критериями вида являются патогенность и экологическая характеристика.

Род *Burkholderia*. В соответствии с Одобренными списками возбудители сапа и мелиоидоза входили в род *Pseudomonas*, включавший на 01.01.1980 г. 87 видов с типовым *P. aeruginosa*, объединенных на основании фенотипических признаков [6]. Род был гетерогенным по фенотипическим, хемотаксономическим свойствам видов, нуклеотидному составу ДНК [1]. Внутри рода по результатам ДНК-рРНК гибридизации было выделено 5 рРНК-групп, менее родственных друг с другом, чем с некоторыми другими грамнегативными родами. Исследовательской группой E.Yabuuchi *et al.* в 1993 г. на основании секвенирования 16S рРНК, ДНК-ДНК гибридизации, изучения жирно-кислотного состава, фенотипических свойств было предложено выделить II РНК гомологичную группу рода *Pseudomonas* в новый самостоятельный род *Burkholderia* с типовым видом *B. cepacia* [45]. Всего в новый род было включено 7 видов, в их числе возбудители сапа и мелиоидоза. После 1993 г. было законно опубликовано более 20 новых названий и новых комбинаций видов буркхолдерий [18]. Позднее часть видов буркхолдерий была выделена в новые роды семейства *Burkholderiaceae* (*Ralstonia*, *Pandorea*).

B. mallei и *B. pseudomallei* классифицированы как самостоятельные виды на основании фенотипических свойств, экологических и эпидемиологических особенностей. Молекулярные исследования двух патогенных видов показали высокий уровень их геномного родства, на основании чего выдвинута гипотеза о том, что *B. mallei* является клоном *B. pseudomallei*, возникшим в результате перехода к облигатному паразитическому образу жизни [24]. Для этих патогенов экологические особенности также имеют приоритетное значение перед молекулярными при определении таксономического положения. Считается, что именно экологические различия явились причиной изменения фенотипа и редукции генома возбудителя сапа [24, 34].

Род *Burkholderia* является типовым родом семейства *Burkholderiaceae*. Вместе с семействами *Oxalobacteriaceae*, *Alcaligenaceae*, *Comammobacteriaceae* формирует порядок *Burkholderiales* класса *Beta-proteobacteria* (табл. 1).

Род *Francisella*. На 01.01.1980 г. род *Francisella* в соответствии с Одобренными списками включал 2 вида – *F. tularensis* и *F. novicida* [6]. Последний вид длительное время после описания был представлен одним штаммом, выделенным из воды в 1951 г. в штате Юта. Положение рода в иерархической системе классификации не было определено, и его относили к родам с неясным систематическим положением [8].

В 1989 г. по предложению D.G.Hollis *et al.* в род *Francisella* в качестве вида *F. philomiragia* были включены микроорганизмы, классифицированные

в 1969 г. как *Yersinia philomiragia* [6, 27]. Их предложение было основано на уникальном для рода *Francisella* составе жирных кислот изученных микроорганизмов, комплексе биохимических и физиологических признаков. Более поздние исследования по секвенированию 16S рРНК подтвердили филогенетическое родство двух видов [20]. В 2008 г. законно опубликовано название нового вида *F. piscicida* – патогена морских промысловых рыб [18, 35].

Внутривидовая классификация возбудителя туляремии была разработана отечественными исследователями Н.Г.Олсуфьевым и И.С.Мещеряковой еще в 70-х годах прошлого века [7]. Внутри вида *F. tularensis* было выделено 3 подвида *holarctica*, *nearctica*, *mediasiatrica*, отличающиеся по патогенности для человека и животных, биохимическим свойствам, экологии, ареалу распространения. В 1983 г. названия подвигов были законно опубликованы и имеют положение в официальной номенклатуре [18]. Подвидовой эпитет самого вирулентного подвида *nearctica* в соответствии с правилами Бактериологического кодекса был заменен на *tularensis*.

Во втором издании Bergey's Manual of Systematic Bacteriology в вид *F. tularensis* включен четвертый подвид *novicida* [цит. по 32]. Название нового подвида не было предложено в строгом соответствии с правилами Бактериологического кодекса, но данная классификация, в соответствии с которой вид включает 4 подвида с разной патогенностью для человека, используется в научных публикациях. Изменение таксономического статуса *F. novicida* произведено на основании исследований D.G.Hollis et al., показавших 86–95 % ДНК-ДНК подобие *F. novicida* и *F. tularensis* [27]. На основании текущих молекулярных критериев вида было предложено включить их в вид *F. tularensis* в качестве биовара, а названия *F. tularensis* и *F. novicida* рассматривать как субъективные синонимы.

В соответствии с текущей классификацией род *Francisella* является типовым и пока единственным родом семейства *Francisellaceae*. Наиболее филогенетически близкими для франциселл являются эндосимбионты клещей вида *Wolbachia persica* [32]. Молекулярные исследования экологических объектов показывают, что патогенные для человека виды

рода *Francisella* представляют только часть биоразнообразия франциселл. Исследования объектов внешней среды на наличие ДНК *F. tularensis*, которые трудно выделить в чистой культуре из экологических образцов, показали наличие в пробах почвы ДНК, филогенетически родственные франциселлам, но не принадлежащие известным подвидам, видам и родам [13]. По мнению исследователей ДНК представляет новые подвиды, виды и рода семейства *Francisellaceae*. Поэтому классификация семейства *Francisellaceae* и рода *Francisella* будет меняться.

Род *Vibrio*. Род *Vibrio* является типовым и самым крупным родом семейства *Vibrionaceae*. На 01.01.1980 г. в него входило 9 видов, в том числе *V. cholerae*, включающий возбудителя тяжелого инфекционного заболевания [6]. После 1980 г. было описано и законно опубликовано более 50 названий новых видов в основном морских вибрионов [18]. Классификация рода очень динамична. Некоторые из вновь описанных видов были реклассифицированы в другие рода на основании филогенетических исследований как в пределах семейства *Vibrionaceae* (*Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Grimontia*), так и вне его (*Colwellia*, *Shewanella*, *Moritella*) [18, 41].

Современная классификация вибрионов на уровне таксонов выше ранга рода основана в первую очередь на последовательности 16S рРНК. Семейство *Vibrionaceae* является одним из примеров несоответствия классификаций, основанных на классических фенотипических признаках и филогенетических критериях. С 1965 г. в семейство *Vibrionaceae* входили рода *Aeromonas* и *Plesiomonas*, объединенные на основании значительного фенотипического сходства их представителей. На основании ДНК-ДНК гибридизации и секвенирования 16S рРНК видов вибрионов род *Aeromonas* выделен в самостоятельное семейство *Aeromonadaceae*, а род *Plesiomonas* переведен в семейство *Enterobacteriaceae* [8]. В соответствии с текущей классификацией семейство включает пять родов – *Vibrio*, *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, последние три выделены из рода *Vibrio* [18, 41].

Для упорядочения классификации вибрионов на внутриродовом уровне, наряду с ДНК-ДНК гибридизацией широко используется метод AFLP, мультилокусное секвенирование генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes) [41, 42]. Метод AFLP рассматривается для вибрионов как альтернатива ДНК-ДНК гибридизации. Подобие образцов AFLP на уровне 60–70 % соответствует ДНК-ДНК подобию в гибридизации выше 70 % [41]. Филогенетически информативными для вибрионов являются последовательности генов 23S рДНК, *pyrH*, *gapA*, *gyrB*, *hsp60*, *rpoA*, *recA*, характеризующиеся большей дифференцирующей способностью, чем 16S рДНК.

Типовой вид рода *Vibrio* – *V. cholerae*. Вид *V. cholerae* является гетерогенным по фенотипическим свойствам входящих в него вибрионов, в первую очередь по составу О-антигена и патогенности

Таблица 2

Иерархическая классификация видов *F. tularensis*, *V. cholerae*, *Y. pestis*

Ранг таксона	Название таксона		
Вид	<i>F. tularensis</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>Y. pestis</i>
Домен	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>
Филум	<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
Класс	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
Порядок	<i>Thiotrichales</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Enterobacteriales</i>
Семейство	<i>Francisellaceae</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
Род	<i>Francisella</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Yersinia</i>
Типовой вид	<i>F. tularensis</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>Y. pestis</i>

для человека. Вид традиционно подразделяют на внутривидовые таксоны (биовары, серовары, серогруппы). В 1985 г. по результатам ДНК-ДНК гибридизации в вид включены вибрионы, описанные как *V. albensis*, а название вида рассматривается в качестве синонима *V. cholerae* [4, 25].

Филогенетические исследования гена *recA* холерных вибрионов подтвердили гетерогенность вида [40]. В соответствии с этим исследованием токсигенные эпидемически опасные штаммы холерного вибриона, независимо от серогруппы, формировали два компактных кластера, филогенетически не связанных с нетоксигенными штаммами вида. В то же время авторами показано отсутствие строгой корреляции между серотипом и филогенией гена *recA*, что связывают с горизонтальным переносом генов, детерминирующих синтез боковых цепей липополисахарида. Положение вида *V. cholerae* в современной иерархической классификации представлено в табл. 2.

Будущие филогенетические исследования вибрионов безусловно приведут к изменению текущей классификации рода и семейства. Уже сегодня предлагается на основании секвенирования филогенетически значимых последовательностей 16S рДНК, *recA*, *rpoA*, *pyrH* выделить роды *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Enterovibrio* + *Grimontia* в самостоятельные семейства, а кластеры филогенетически родственных видов рода *Vibrio* – в самостоятельные роды [41]. Независимо от будущих изменений типовой вид рода *Vibrio* – *V. cholerae* всегда будет связан с данным родом и семейством *Vibrionaceae*.

Род *Yersinia*. Род *Yersinia* на 01.01.1980 г. включал 5 видов [6]. В 1989 г. вид *Y. philomiragia* был реклассифицирован в род *Francisella* [27]. За период с 1981 по 2008 год было описано 8 новых видов иерсиний *Y. aleksiciae*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. rohdei*, *Y. aldovae*, *Y. kristensenii*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, последние 4 выделены из гетерогенного по фенотипическим признакам вида *Y. enterocolitica* [8, 18]. В 2002 г., по предложению H. Neubauer, внутри вида *Y. enterocolitica* выделено два подвида *enterocolitica* и *palaearctica*, включающие соответственно американские и европейские изоляты [18]. Обсуждается возможность выделения третьего подвида [22]. Последний из описанных видов иерсиний *Y. aleksiciae* выделен из вида *Y. kristensenii* на основании секвенирования 16S рРНК, ДНК-ДНК гибридизации и фенотипа [36].

Типовой вид рода *Y. pestis* – возбудитель тяжелого инфекционного заболевания. Использование молекулярно-генетических подходов в таксономических исследованиях иерсиний показало геномное родство *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* на уровне одного вида (ДНК-ДНК подобие выше 70%). На основании ДНК-ДНК гибридизации H. Bercovier *et al.* предложили объединить два вида в один *Y. pseudotuberculosis* с подвидами *pseudotuberculosis* и *pestis* [14]. Новые названия были законно опубликованы в 1980 г. [18]. Впоследствии Юридической комиссией

по настоянию медицинской общественности законно изданные названия были помещены в список отвергнутых названий [17]. Последующие молекулярные исследования двух видов иерсиний подтвердили их геномное родство и позволили выдвинуть гипотезу о том, что *Y. pestis* является клоном *Y. pseudotuberculosis*, возникшим 20000 лет назад [12].

Внутри вида *Y. pestis* выделено 4 биовара *antiqua*, *mediavalis*, *microtus*, *orientalis*, на которые не распространяются принципы и правила Бактериологического кодекса [3, 5]. Названия описанных отечественными исследователями подвидами чумного микроба – *pestis*, *altaica*, *caucasica*, *hissarica*, *ulegeica* не были опубликованы в соответствии с правилами Бактериологического кодекса. Поэтому сегодня подвиды не имеют положения в официальной международной номенклатуре [3, 15]. Положение *Y. pestis* в текущей классификации представлено в табл. 2.

Современная иерархическая классификация прокариот, базирующаяся на гомологии 16S рРНК и 16S рДНК, подвергается критике и безусловно будет меняться [2, 15, 16]. По оптимистическому мнению ведущих систематиков, эти изменения не будут столь масштабными и радикальными как последние, а произойдут в пределах таксонов общего генеалогического происхождения, даже в случаях изменения формальных видовых границ, поскольку филогения является надежным основанием для прокариотической классификации [38]. Классификация патогенов I–II групп остается достаточно стабильной, что связано с рекомендациями МКСП, в соответствии с которыми экологические особенности патогенных микроорганизмов имеют приоритетное значение перед текущими молекулярными границами прокариотического вида. Современное состояние знаний о молекулярно-генетической организации прокариот еще не позволяет говорить о ревизии формальных видовых границ, которые, с учетом практики классификации патогенов, являются слишком широкими [16, 34]. Необходимо накопление и глубокий анализ данных о молекулярной организации различных таксономических групп бактерий, в том числе патогенных видов, для создания теоретической базы определения вида у бактерий. МКСП ориентирует микробиологов на поиск филогенетических маркеров, независимых от 16S рДНК генов, адаптацию инновационных методов молекулярной биологии для целей прокариотической систематики, таких как мультилокусное секвенирование метаболических генов, методы сравнения полных геномов, в том числе DNA arrays [37]. Среди систематиков найдено согласие, что филогенетическая классификация может быть улучшена на основе мультигенных деревьев, созданных на базе последовательностей не менее пяти консервативных генов, кодирующих метаболические функции. Альтернативные филогенетические маркеры должны отвечать нескольким требованиям. Гены должны быть широко распространены среди геномов прокариот, присутствовать в единственной

копии в пределах данного генома, содержать значительный объем информации (900–2250 нуклеотидов), должна быть высокая корреляция филогении таксонов, определенной на основании этой последовательности, 16S рДНК и ДНК-ДНК подобия [37]. Реализация проектов по секвенированию геномов прокариот позволило выявить гены, перспективные для филогенетических исследований на уровне таксонов разного ранга [цит. по 41].

Будущее прокариотической классификации связано с развитием не только микробиологии, включая популяционную генетику и микробную экологию, но и математики, разрабатывающей алгоритмы методов классификации, информатики, создающей интегрированные базы микробиологических данных, способные анализировать возрастающие объемы информации о свойствах и структуре генома прокариот и делающие определение таксономических рангов более прагматическим.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блохина И.Н., Леванова Г.Ф., Антонов А.С. Систематика бактерий (с основами геносистематики). Нижний Новгород; 1992. 170 с.
2. Головлев Е.Л. Микробиология. 1998; 67(2):281–6.
3. Домарадский И.В. Чума. М.: Медицина; 1998. 175 с.
4. Изменения в таксономии и номенклатуре бактерий. Клини. микробиол., антимикроб. химиотер. 2004; 6(1):4–9.
5. Международный кодекс номенклатуры бактерий. М.; 1978. 207 с.
6. Одобренные списки названий бактерий. Ереван; 1982. 420 с.
7. Олсуфьев Н.Г., Мецержакова И.С. Внутривидовая таксономия возбудителя туляремии *Francisella tularensis* McCoy et Chapin. Журн. гигиены, эпидемиол., микробиол. и иммунол. 1982; 26(3):281–91.
8. Определитель бактерий Берджи. 9-е изд. М.; 1997. 799 с.
9. Романовская В.А., Рокитко П.В. Второе издание «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology». Микробиол. журн. 2006; 68(3):72–85.
10. Рятис Л.А., Беляков В.Д. Бактериальные виды и их структура. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1997; 5:110–4.
11. Рятис Л.А. Концепция бактериального вида и эволюция генома прокариот. Там же, 2006; 6:97–101.
12. Achtman M., Zurth K., Morelli G. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1999; 96:14043–8.
13. Barns S.M., Grow C.C., Okinaka R.T. et al. Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71(9):5494–5500.
14. Bercovier H., Molaret H., Alonso J. et al. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. Curr. Microbiol. 1980; 4(4):225–9.
15. Cohan F.M. Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006; 361(1475):1985–96.
16. Cohan F.M., Perry E.B. A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. Current Biology. 2007; 17(10):R373–86.
17. Definitions and abbreviations. Available from: <http://www.bacterio.cict.fr>.
18. List of bacterial names with standing in nomenclature Available from: <http://www.bacterio.cict.fr>.
19. Euzéby J.P. Definitions d'une genospecies et d'une espece bacterienne. Available from: <http://www.bacterio.cict.fr>.
20. Forsman M., Sandström G., Sjöstedt A. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. Int. J. Syst. Bacteriol. 1994; 44(1):38–46.
21. Gevers D., Dawyndt P., Vandamme P. et al. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006; 361(1475):1911–6.
22. Gierczyński R., Golubov A., Neubauer H. et al. Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for *Yersinia enterocolitica* subsp. *palaearctica* and its application to bioserogroup 4/O3 subtyping. J. Clin. Microbiol. 2007; 45(8):2508–15.
23. Godfroid J., Cloeckaert A., Liautard J.-P. et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. Vet. Res. 2005; 36(3):313–26.
24. Godoy D., Randle G., Simpson A.J. et al. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(5):2068–79.
25. Hada H.S., Stemmler J., Grossbard M.L. et al. Characterization of non-O1 serovar *Vibrio cholerae* (*Vibrio albensis*). Syst. Appl. Microbiol. 1985; 6(2):203–9.
26. Helgason E., Okstad O.A., Caugant D.A. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66(6):2627–30.
27. Hollis D.G., Weaver R.E., Steigerwalt A.G. et al. *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. J. Clin. Microbiol. 1989; 27(7):1601–8.
28. International Committee on Systematic Bacteriology; Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. Correspondence Report (Interim Report), 1991–1993. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006; 56:1167–8.
29. International Committee on Systematic Bacteriology; Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: Minutes of the meeting, 5 and 7 July 1994, Prague, Czech Republic. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006; 56:1169–70.
30. International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006; 56:1173–5.
31. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. Available from: <http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm>
32. Keim P., Johansson A., Wagner D.M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007; 1105:30–66.
33. Koepfel A., Perry E.B., Sikorski J. et al. Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2008; 105(7):2504–9.
34. Konstantinidis K.T., Ramette A., Tiedje J.M. The bacterial species definition in the genomic era. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2006; 361(1475):1929–40.
35. Ottem K.F., Nylund A., Karlsbakk E. et al. New species in the genus *Francisella* (*Gammaproteobacteria*; *Francisellaceae*); *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). Arch. Microbiol. 2007; 188(5):547–50.
36. Sprague L.D., Neubauer H. *Yersinia aleksiciae* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005; 55:831–5.
37. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M. et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002; 52:1043–7.
38. Stackebrandt E. Defining Taxonomic Ranks. In: Dworkin M., Falkow S. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. 3rd ed. Springer, 2006. P. 29–57.
39. Stackebrandt E., Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiol. Today. 2006; 33:152–5.
40. Stine O.C., Sozhamannan S., Gou Q. et al. Phylogeny of *Vibrio cholerae* based on *recA* sequence. Infect. Immun. 2000; 68(12):7180–5.
41. Thompson F.L., Iida T., Swings J. Biodiversity of vibrios. Microbiol Mol Biol Rev. 2004; 68(3):403–31.
42. Thompson F.L., Gevers D., Thompson C.C. et al. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71(9):5107–15.
43. Verger J.M., Grimont F., Grimont P.A.D., Grayon M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol. 1985; 35(3):292–5.
44. Vilas-Boas G.T., Peruca A.P.S., Arantes O.M. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. Can. J. Microbiol. 2007; 53(6):673–87.
45. Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H. et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol. Immunol. 1992; 36(12):1251–75.

Об авторах:

Грачева И.В., Караваева Т.Б., Меркулова Т.К., Плотников О.П. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. Тел. (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

I.V.Gracheva, T.B.Karavaeva, T.K.Merkulova,
O.P.Plotnikov

**Present-Day State of Classification
of Some Pathogenic Representatives of the *Bacillus*, *Brucella*,
Burkholderia, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia* Genera**

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Considered are modern principles of prokaryotes classification, definition and limits of prokaryotic species as classification and identification unit, criteria of validity of scientific names of the microorganisms. Traced are main alterations in classification of some pathogenic representatives of the *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia* genera, first of all – of

I–II groups pathogens, after Validation Lists of Bacterial Names were issued in 1980. Prospects of development and refinement of prokaryotic classification based on 16S rRNA phylogeny are discussed.

Key words: *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia*, prokaryotic classification, phylogeny.

Authors:

Gracheva I.V., Karavaeva T.B., Merkulova T.K., Plotnikov O.P. Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 18.09.08.