Lysobacter Chinensis

Аннотация

Новый штамм бактерий TLK-CK17T был выделен из образца компоста коровьего навоза. Штамм был окрашен по Граму отрицательно, не образует спор, имеет форму короткой палочки, аэробный и демонстрировал рост при 15–40 °C с оптимумом при 35 °C, с 0–5,0% (мас./об.) NaCl (оптимум 0,5) и при pH 6,5–8,5 (оптимум 7,0–7,5). Клетки содержали суммарные изо-C16:0, изо-C15:0 и признак 9 (включающий C17:1 ω9c и/или 10-метил C16:0) в качестве основных клеточных жирных кислот (>10,0%) и убихинон-8 (Q-8) в качестве исключительно дыхательного хинона. Полярный липидный профиль штамма TLK-CK17T состоял из фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина и дифосфатидилглицерина. Содержание ДНК G+C составило 68,2 моль%. На основе сравнения последовательности гена 16S рРНК штамм TLK-CK17T показал наибольшее сходство последовательностей (98,9%) с L. penaei GDMCC 1.1817T, за которым следует L. maris KCTC 42381T (98,3%). Кроме того, средняя нуклеотидная идентичность (ANI) и цифровая ДНК–ДНК гибридизация (dDDH) между штаммом TLK-CK17T и близкородственными штаммами L. penaei GDMCC 1.1817T и L. maris KCTC 42381T составили 79,9–85,6% и 23,9–29,6% соответственно. На основании представленных результатов мы предлагаем новый вид, для которого предлагается название Lysobacter chinensis sp. nov., с типовым штаммом TLK-CK17T (=CCTCC AB2021257T= KCTC 92122T).

Введение

Род Lysobacter был предложен Кристенсеном и Куком (1978) из семейства Lysobacteraceae, филюма «Proteobacteri». По состоянию на декабрь 2021 года род включает 85 валидно опубликованных видов с правильным названием; типовой вид — Lysinimonas soli (Jang et al. 2013). Представители рода Lysobacter, как известно, являются грамотрицательными, палочковидными с розовыми или желтыми колониями и содержат высокое содержание ДНК G+C (61,7–70,1 мол. %) (Christensen 2005; Li et al. 2018). Штаммы Lysobacter, которые, как считается, играют жизненно важную роль в окружающей среде благодаря своей высокой способности к производству ферментов, повсеместно распространены в различных экосистемах. В настоящее время они были выделены из различных местообитаний, включая различные типы почв, такие как почва пещер (Chen et al. 2016), лесная почва (Margesin et al. 2018), возделываемая почва (Siddiqi and Im 2016), почва марганцевого завода (Li et al. 2018), почва засушливой местности (Lee et al. 2017a) и заброшенная золотая шахта (Liu et al. 2011). Здесь мы сообщаем о полифазном таксономическом описании нового штамма бактерии, разрушающей целлюлозу, обозначенного как TLK-CK17T. Фенотипические, хемотаксономические и генотипические свойства указывают на то, что штамм TLK-CK17T представляет собой новый вид в пределах рода Lysobacter, для которого предложено название Lysobacter chinensis sp. nov.

Материалы и методы

Изоляция и культивирование

В нашем исследовании разнообразия культивируемых бактерий в компосте из коровьего навоза, Синьцзян-Уйгурский автономный район, Китай (43°81′ с. ш., 87°57′ в. д.), был выделен штамм TLK-CK17T. Образец компоста суспендировали в стерильной воде и последовательно разбавляли до 10−1, 10−2, 10−3, затем 100 мкл из каждого разбавления распределяли по 1/3 пластин питательного агара (NA). Пластины инкубировали при 30°C и проверяли на рост

Страница 2/14

через 2-3 дня. После инкубации одну колонию очищали путем субкультивирования в тех же условиях. Для дальнейшего исследования изолят был субкультивирован на чашках NA при 30 °C и сохранен при −80 °C в виде суспензии глицерина (20%, вес/объем). Между тем, близкородственные штаммы L. penaei GDMCC 1.1817T и L. maris KCTC 42381T были получены из Центра коллекции микробных культур провинции Гуандун (GDMCC)

и Корейской коллекции типовых культур, соответственно. Извлечение ДНК и секвенирование генома Геномная ДНК штамма TLK-CK17T была извлечена и очищена с использованием набора для бактериальной геномной ДНК

(Takara), следуя рекомендациям производителя. Таксономическое положение штамма TLK-CK17T было сначала определено по последовательности гена 16S рРНК с использованием праймеров XJ11 (5’

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) и XJ22 (5’-GGTTACCTTGTTACGACTT-3’). Секвенирование всего генома было выполнено на платформе Illumina HiSeq PE150. Для реконструкции библиотеки использовались A-хвост, лигированный с адаптерами парных концов и ПЦР-амплификация со вставкой 350 п.н. Необработанные считывания были собраны с использованием программного обеспечения SOAPdenovo версии 2.04 (Li et al. 2008; Li et al. 2010). Гены штамма TLK-CK17T были идентифицированы сервером NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline онлайн и базой данных Pfam (Angiuoli et al. 2008; http://pfam.xfam.org/), а гены, участвующие в метаболических путях, были подробно проанализированы с использованием информации, представленной в RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology; https://rast.nmpdr.org). Содержание G+C хромосомной ДНК было рассчитано с использованием секвенирования генома. Значения цифровой ДНК-ДНК гибридизации (dDDH) были рассчитаны с использованием калькулятора расстояний от генома к геному (GGDC 2.0) (Meier-Kolthoff et al. 2013). Средние значения нуклеотидной идентичности (ANI) были рассчитаны с использованием алгоритма Гориса и др. (Goris et al. 2007) с использованием веб-сервиса EzGenome.

Обработка данных о последовательностях и филогенетический анализ

Полная последовательность 16S рРНК штамма TLK-CK17T была загружена на сервер EzTaxon-e (http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/) и в NCBI GenBank для идентификации штамма на основе доступных последовательностей. Множественные выравнивания с соответствующими последовательностями близкородственных штаммов были выровнены с использованием CLUSTAL\_X (Thompson et al. 1997). Филогенетический анализ проводился методами присоединения соседей (NJ) (Saitou et al. 1987), максимальной экономии (MP) (Fitch et al. 1971) и максимального правдоподобия (ML) (Felsenstein et al. 1981) в программе MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016) с использованием двухпараметрической модели Кимуры (Kimura et al. 1980), а пробелы обрабатывались с использованием метода частичного удаления. Был проведен бутстреп-анализ с 1000 репликациями, направленный на оценку топологии филогенетического дерева (Felsenstein et al. 1985).

Фенотипические и биохимические характеристики

Окрашивание по Граму и морфологические особенности были протестированы на клетках, выращенных на чашках NA при 35°C в течение 24 часов. Окрашивание по Граму проводили с использованием набора для окрашивания по Граму (bioMérieux) в соответствии с инструкциями производителя. Морфологию и размер клеток исследовали с помощью световой микроскопии (E600; Nikon) и просвечивающей электронной микроскопии (JEM-1200; JEOL). Подвижность определяли с помощью метода висячей капли, а скользящую подвижность определяли, как описано Боуманом (Bowman et al. 2000). Восстановление нитрата проводили, как описано Коуэном и Стилом (Cowan et al. 1974). Активность каталазы, оксидазы и липазы (Tweens 20 и 80), а также гидролиз крахмала и CM-целлюлозы были протестированы в соответствии с методами Дуна и Кай (Dong and Cai et al. 2001). Анаэробный рост был протестирован после инкубации в течение 2 недель при 35°C на NA с или без 0,1% (w/v) KNO3, в анаэробной камере, заполненной газовой смесью (10% H2, 10% CO2 и 80% N2). Рост при различных температурах (0, 4, 10, 15, 20, 28, 30, 33, 37, 40, 45 и 50°C) и при различных концентрациях NaCl (0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 и 6%, w/v) был исследован на NA в течение до 10 дней. Рост при pH 5,5–9,5 (с интервалом в 0,5 единицы pH) определялся путем измерения оптической плотности (длина волны 600 нм) культур в NB с pH, отрегулированным перед стерилизацией путем добавления соответствующих буферов, включая MES (для pH 5,5 и 6,0), PIPES (для pH 6,5 и 7,0), HEPES (для pH 7,5 и 8,0), Tricine (для pH 8,5) и CAPSO (для pH 9,0 и 9,5). Чувствительность к антибиотикам оценивали, как описано в Институте клинических и лабораторных стандартов (CLSI et al. 2012), и инокулированные чашки инкубировали при 35°C в течение до 48 часов. Другие физиологические и биохимические характеристики штамма TLK-CK17T и близкородственных штаммов определялись с использованием систем идентификации API 20E, APIZYM и API 50CHB (bioMérieux) и системы идентификации Biolog GEN III в соответствии с инструкциями производителей.

Хемотаксономический анализ

Штамм TLK-CK17T и два близкородственных штамма были проведены параллельно с этим анализом метиловых эфиров жирных кислот (FAME), когда бактериальные сообщества достигли поздней экспоненциальной стадии роста в соответствии с методом штриховки четырех квадрантов. Клеточные метиловые эфиры жирных кислот были подготовлены и идентифицированы в соответствии с Системой идентификации микроорганизмов (версия Sherlock 4.5; база данных: TSBA40; MIDI; Sasser et al. 1990). Изопреноидный хиноновый штамм TLK-CK17T и два близкородственных штамма были извлечены из лиофилизированного клеточного материала с использованием двухэтапного метода, описанного Тиндаллом и др. (Tindall et al. 2007) и последующим образом проанализированы с помощью ВЭЖХ (Kroppenstedt et al. 1982). Полярные липиды были извлечены с использованием системы хлороформ/метанол и проанализированы с использованием двумерной тонкослойной хроматографии, как описано ранее (Fang et al. 2017; Minnikin et al. 1984)

Результаты и обсуждение

Филогенетический анализ

Согласно сравнениям с полной последовательностью гена 16S рРНК (1545 п.н.) в базе данных EzTaxon, наивысший уровень сходства последовательностей наблюдался у L. penaei GDMCC 1.1817T (98,9%) и L. maris KCTC 42381T (98,3%). Филогенетическое положение нового изолята, определенное с использованием различных алгоритмов построения деревьев, подтвердило, что штамм TLK-CK17T является представителем рода Lysobacter, образуя согласованный кластер с двумя вышеупомянутыми представителями этого рода на деревьях NJ, ML и MP с низкими значениями бутстрепа соответственно (рис. 1). На основе филогенетического анализа последовательности гена 16S рРНК в качестве референтных штаммов в этом исследовании были выбраны два штамма L. penaei GDMCC 1.1817T и L. maris KCTC 42381T.

Фенотипическая и биохимическая характеристика

Среда NA использовалась для общего лабораторного культивирования, но новый штамм также хорошо растет на средах TSA и R2A. После 24 ч роста на NA при 30 °C наблюдались колонии диаметром 1,0–1,5 мм, круглые, гладкие и абрикосовые. Было обнаружено, что штамм TLK-CK17T является аэробной бактерией с отрицательной реакцией по Граму и каталазой. Между тем, он показал положительную реакцию на каталазу (слабо) и восстановление нитрата. Клетки неподвижны, растут в 0–5,0% (w/v) NaCl, в диапазоне pH от 6,5 до 8,5 и при температурах от 15 до 40 °C. Оптимальный рост наблюдался при 35 °C, 0,5% (w/v) NaCl и pH 7,0–7,5. Клетки штамма TLK-CK17T представляют собой короткие палочки, каталазоотрицательные, но оксидазоположительные, средний размер клеток составляет 0,3–0,5 мкм в ширину и 1,5–2,0 мкм в длину (Дополнительный рис. 2). Нитрат может восстанавливаться до нитрита. Штамм был положительным для гидролиза Tween 20, 80, казеина, CM-целлюлозы, но отрицательным для альгината, крахмала. Тест на чувствительность к антибиотикам показал, что штамм чувствителен к хлорамфениколу (30 мкг), цефтриаксону (30), ооксацину (5 мкг) и ципрооксацину (5 мкг). Однако он был устойчив к пенициллину (10 мкг), тетрациклину (30 мкг), ванкомицину (30 мкг), ампициллину (10 мкг), стрептомицину (10 мкг), клиндамицину (2 мкг),

Амоксициллину (25 мкг) и Cephalexixn (30 мкг)

Хемотаксономические характеристики

Преобладающими клеточными жирными кислотами штамма TLK-CK17T были изо-16:0 (24,3%), изо-C15:0 (23,8%) и признак 9 (включающий C17:1 ω9c и/или 10-метил C16:0, 15,4%). Профиль жирных кислот был похож на профиль близкородственных штаммов L. penaei GDMCC 1.1817T и L. maris KCTC 42381T, в соответствии с описанием рода Lysobacter. Однако соотношения различных компонентов различны. Полный состав жирных кислот показан в Таблице 2. Убихинон-8 (Q-8) как исключительно дыхательный хинон. Штамм TLK-CK17T продемонстрировал сложный полярный липидный профиль, состоящий из фосфатидилэтаноламина (PE), дифосфатидилглицерина (DPG) и фосфатидилглицерина (PG) в качестве доминирующих элементов, и одного неохарактеризованного липида (L) (Дополнительный рис. 3)

Анализ последовательности всего генома

Геном вносит важный вклад в понимание генетической эволюции бактерий, профилактики и лечения заболеваний, а также разработки антибиотиков; таким образом, геном штамма TLK-CK17T был проанализирован для расшифровки генетического кода, участвующего в пригодности окружающей среды. Размер генома и содержание G + C TLK-CK17T составляют 4 300 099 п.н. и 68,2 мол.% соответственно. Длина генов в 3 695 277 п.н. была найдена на основе предсказания генов, а соотношение длины гена/генома составило 85,9%. Кроме того, в геноме содержалось 3792 CDS, и всем были назначены функции. CDS были дополнительно аннотированы в NR, Swiss-Prot, COGs, KEGGs, GO и Pfam, и их номера были 3630, 1485, 2762, 3421, 2419 и 2419 соответственно. Значения ANI штаммов TLK-CK17T с L. penaei GDMCC 1.1817T и L. maris KCTC 42381T были 79,9% и 85,6% соответственно, в то время как значения GGDC были 29,6 и 23,8 соответственно. Для разграничения видов обычно принимаются значения ANI 95–96% и значения dDDH 70% соответственно (Wayne et al. 1987; Thompson et al. 2013). Эти результаты показали, что штамм TLK-CK17T представляет собой новый вид рода Lysobacter. Связанные геномные данные штамма TLK-CK17T и двух близкородственных типовых штаммов приведены в таблицах S1 и S2. Анализ RAST выявил наличие 302 подсистем, покрытие подсистем составило 25% (всего 977, негипотетических 936, гипотетических 41), и были идентифицированы 67 гликозидгидролаз (GH), 42 гликозилтрансферазы (GT), 44 углевод-определяющих модуля (CBM), 6 углевод-эстераз (CE) и 4 вспомогательных активности (AA). Поскольку коровий навоз богат лигноцеллюлозой, сосуществование этих генов предполагает, что они играют важную роль в расщеплении и модификации углеводов при компостировании коровьего навоза. Собранный геном штамма TLK-CK17T сравнивали с геномами близкородственных штаммов L. penaei GDMCC 1.1817T и L. maris KCTC 42381T. Результат показал, что количество семейств GH, GT и CBM было больше в штамме TLK-CK17T, в то время как L. penaei GDMCC 1.1817T содержал больше членов семейств CE и AA (таблица S2). Мы посчитали, что это может быть тесно связано с их изолированной средой обитания, L. penaei GDMCC 1.1817T и L. maris KCTC 42381T были выделены из тихоокеанских белых креветок и морской воды соответственно. Lysobacter spp. был идентифицирован как гетеротрофный с широким спектром внеклеточных ферментов и других метаболитов против других микроорганизмов, включая грибы и нематоды, поэтому он сыграл важную роль в подавлении патогенных бактерий (de Bruijn et al. 2015; Xie et al. 2012; Pidot et al. 2014). Наши результаты показали, что штамм TLK-CK17T обладал активностью хитиназы, протеазы и глюканазы, подтверждая и расширяя предыдущие исследования (Zhang et al. 2001; Palumbo et al. 2005). Активность хитиназы, глюканазы и протеазы может способствовать антимикробной активности, поскольку хитин, α- и β-глюканы и гликопротеины являются основными компонентами клеточных стенок грибов (Figueiredo et al. 2014). Более того, мы проанализировали, что штаммы Lysobacter показали высокое генетическое разнообразие, которое может дать преимущество в неблагоприятных условиях окружающей среды (Foster et al. 2005). Чтобы лучше понять потенциальное влияние штамма TLK-CK17T на общую активность микробных сообществ в компосте из коровьего навоза, наша будущая работа будет включать его тестирование с другими родами бактерий, обильно распространенных в компосте. Взаимодействие штамма TLKCK17T с другими бактериями, независимо от того, стимулируют ли они выработку антимикробных соединений, чтобы быстро удалять патогенные микроорганизмы в навозе скота. На основании филогенетического анализа было обнаружено, что штамм TLK-CK17T связан с представителями рода Lysobacter в семействе Xanthomonadaceae. Штамм TLK-CK17T представлял собой новый вид рода Lysobacter, что подтверждается соответствующими данными генома. Кроме того, фенотипические и биохимические данные в совокупности подтверждают тот факт, что штамм TLK-CK17T был различим, в то время как хемотаксономические анализы согласуются с его принадлежностью к роду Lysobacter. Фенотипическая характеристика, представленная в таблице 1, выделяет штамм TLK-CK17T в отдельный вид. Исключительно респираторным хиноном был Q-8, как и сообщалось для основного респираторного хинона всех членов рода Lysobacter. Основными жирными кислотами типового штамма TLK-CK17T были изо-C16:0, изо-C15:0 и признак 9 (включающий C17:1 ω9c и/или 10-метил C16:0). На основании результатов, представленных в этом исследовании, предполагается, что штамм TLK-CK17T представляет собой нового члена в роде Lysobacter, для которого предложено название Lysobacter chinensis sp. nov. Номера доступа GenBank/EMBL/DDBJ для последовательности гена 16S рРНК и проекта по исследованию всего генома штамма TLK-CK17T: OK143236

Описание Lysobacter chinensis sp. nov.

Lysobacter chinensis (chi.nen′sis. N.L. муж. подвид. прил. chinensis, относящийся к Китаю, где был выделен типовой штамм)

Клетки окрашены по Граму отрицательно, аэробны, неподвижны и имеют форму коротких палочек размером 0,3–0,5×1,5–2,0 мкм. Хороший рост наблюдается на агаре R2A, TSA и NA, но не на MA. Колонии на NA бежевые или абрикосовые, гладкие, непрозрачные, круглые (приблизительно 1,0–1,5 мм в диаметре) с цельными краями и выпуклые.

Рост на NA происходит при температуре 15–40 °C (оптимум 35 °C). Диапазон pH для роста составляет от pH 6,5 до 8,5 (оптимум pH 7,0–7,5). Рост происходит при концентрации NaCl 0–5,0% (оптимальная 0,5). Каталазаположительны и оксидазаотрицательны. Нитрат может восстанавливаться до нитрита. CM-целлюлоза, крахмал, казеин, Tweens 20 и 80 гидролизуются, но альгинат не гидролизуется. Положительны для щелочной фосфатазы, эстеразы (C4), лейцинариламидазы, валинариламидазы, нафтол-AS-BI-фосфогидролазы, кислой фосфатазы, α-глюкозидазы и β-глюкозидазы, но отрицательны для эстеразы липазы (C8), липазы (C14), цистин ариламидазы, α-химотрипсина, кислой фосфатазы, β-глюкуронидазы, N-ацетилглюкозаминидазы и α-маннозидазы. Положительный результат на ONPG-тест, продукцию индола и желатиназу, но отрицательный на продукцию H2S, реакцию Фогеса-Проскауэра, утилизацию цитрата Симмонса. Кислота образуется из L-арабинозы, d-ксилозы, d-галактозы, d-глюкозы, d-маннозы, амигдалина, ESC, d-целлобиозы, d-мальтозы (слабо), d-лактозы, d-мелибиозы, d-укрозы, d-ранозы, гликогена, d-гентиобиозы. Положительный результат на окисление d-трегалозы, d-целлобиозы (слабо), гентиобиозы, N-ацетил-β-d-аннозамина (слабо), d-маннозы, d-галактозы. Основные клеточные жирные кислоты — изо-C16:0, изо-C15:0 и признак 9 (включающий C17:1 ω9c и/или 10-метил C16:0). Основные полярные липиды — фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин и дифосфатидилглицерин. Исключительно дыхательный хинон — Q-8.

Типовой штамм TLK-CK17T (=CCTCC AB2021257T= KCTC 92122T) был выделен из образца компоста коровьего навоза, собранного в Синьцзян-Уйгурском автономном районе, Китай (43°81′N, 87°57′E). Содержание геномной ДНК G+C в типовом штамме составило 68,2 моль%