Lysobacter concretionis

Таксономические позиции видов Lysobacter с валидно опубликованными названиями и нового штамма Ko07T, который был недавно изолирован из потока аэробного реактора с иловым слоем, очищающего сточные воды пивоваренного завода, были(пере)оценены на основе результатов, полученных с использованием подхода полифазной таксономии. Филогенетический вывод, основанный на последовательностях генов 16SrRNA, показал, что штамм Ko07T и все виды Lysobacter с валидно опубликованными названиями сгруппированы вместе в филогенетической ветви в пределах класса «Gammaproteobacteria». Эти

сходство последовательностей штамма Ko07T с типовыми штаммами установленных видов Lysobacter находилось в диапазоне 94?9–96?7%. Убихинон Q-8 и разветвленные жирные кислоты, C11:0iso, C15:0iso, C16:0iso, isoC17:1v9 candC11:0 iso3OH, преимущественно появились в штамме Ko07T, а также в одном из штаммов всех типов известных видов Lysobacter. Значения ДНК–ДНКгибридизации штамма Ko07T с таковыми известных видов Lysobacter оценивались в 2–20%. Несмотря на общие таксономические черты в важных фенотипических характеристиках, таких как скользящее движение, форма длинного стержня и протеолитическая активность, штамм Ko07T можно отличить от видов Lysobacter с обоснованно опубликованными названиями по его низкому значению ДНК-ДНК гибридизации, сравнительно низкому содержанию ДНК G+C (63?8 моль%), использованию субстрата и некоторым физико-химическим характеристикам. На основании результатов, полученных в этом исследовании, предлагается,

что штамм Ko07T следует классифицировать как представляющий новый член рода Lysobacter,

для которого предложено название Lysobacter concretionis sp.nov. Типовой штамм - Ko07T

(=KCTC12205T=DSM16239T). Род Lysobacter был установлен Кристенсеном и Куком

(1978) для неплодовых тел, скользящих бактерий с высоким содержанием G+C. Виды Lysobacter с валидно опубликованными названиями: Lysobacter antibioticus, Lysobacter brunescens,

Lysobacterenzymogenes и Lysobactergummosus. Хотя

описание вида, продуцирующего антибиотики, «Lyso

bacter lactamgenus», было опубликовано (Onoetal., 1984;

Kimura et al., 1996), его таксономическое положение еще не подтверждено, и его название не подтверждено; таким образом,

новыйвидродаLysobacterпредлагался

с 1978 года. Профили жирных кислот для двух типов штаммов, L.

enzymogenes ATCC 29487T и L. antibioticus ATCC

29479T, доступны в базе данных MIDI, но идентификация

бактериальных штаммов как принадлежащих к родуLysobacter

использованиемтолькосистемыMIDIнедостаточна. Кроме того,

поскольку видыLysobacter быликлассифицированы

первоначально на основе только нескольких фенотипических характеристик (Christensen

&Cook, 1978), было неясно, могут ли они все еще

сохранять свои таксономические позиции, если учитывать филогенетические и/или

хемотаксономические особенности.

Анаэробные гранулы — это бактериальные агрегаты, которые образуются в результате

флокуляции ила в реакторе с восходящим потоком анаэробного ила

(UASB) (deZeeuw&Lettinga, 1980). Считается, что они

состоят из микроорганизмов, неорганических

ядер и внеклеточных полимеров (Fukuzaki et al., 1991;

Shenet al., 1993). Большое внимание уделялось

внутренней структуре и каталитической активности гранул

(MacLeodet al., 1990; Schmidt&Ahring, 1996). В нашей

лаборатории взаимосвязь между структурой и

устойчивостью к токсичным химикатам в анаэробных гранулах из

Сокращение: UASB, восходящий поток анаэробного ила.

Номера доступа GenBank/EMBL/DDBJ для последовательностей генов 16S рРНК

штамма Ko07T, Lysobactergummosus ATCC29489T

и Lysobacterbrunescens ATCC29482T — AB161359, AB161361

и AB161360 соответственно.

Данные об идентификации последовательности гена 16S рРНК для штамма Ko07T и близкородственных

бактерий доступны в качестве дополнительного материала в IJSEM

Онлайн.

63399G2005IUMS Напечатано в Великобритании 1155

Международный журнал систематической и эволюционной микробиологии (2005), 55, 1155–1161 DOI10.1099/ijs.0.63399-0

Х.-С. Бэ, В.-Т. Им и С.-Т. Ли

пивоварня сточных вод-очистки реактор UASB был изучен

(Bae & Lee, 1999; Bae et al., 2000). В серии исследований мы

попытались изолировать микроорганизмы из анаэробных

гранул, чтобы исследовать структуру сообщества

основанную на системе культивирования. Интересно, что гранулы содержали аэробные бактерии, даже несмотря на то, что они

хранились в анаэробных условиях в течение 2 лет. Штамм Ko07T был

одним из доминирующих бактериальных изолятов, растущих в аэробных

условиях. В этом исследовании полифазный подход, включающий

филогенетический анализ на основе последовательностей генов 16S рРНК,

связь ДНК-ДНК и хемотаксономические и фенотипические свойства, был использован для определения точного таксономического положения штамма Ko07T. Полученные результаты указывают,

что штамм Ko07T следует классифицировать как представляющий новый вид рода Lysobacter, и что его можно четко отличить от видов Lysobacter с действительно опубликованными названиями. В этом отчете мы предлагаем Ko07T как типовой штамм нового вида, для которого предлагается название Lysobacter concretionis sp. nov. Мы также представляем межвидовые связи видов Lysobacter, выведенные заново с помощью использованного полифазного подхода.

Для выделения аэробных бактерий коричневато-черные гранулы (диаметром около 2 мм) из реактора UASB для очистки сточных вод пивоваренного завода,который работал анаэробно в течение 2 лет, были гомогенизированы с помощью гомогенизатора Ace (Nihonseiki Kaisha).

Суспензию распределяли по чашкам с агаром R2A (Difco) после серийного разбавления 50 мМ фосфатным буфером (pH 7,0). Чашки инкубировали при 30uC в течение 2 недель.

Отдельные колонии очищали путем переноса на свежие чашки, затем проводили вторую инкубацию в тех же условиях. Очищенные колонии предварительно идентифицировали с помощью частичного секвенирования гена 16S рРНК. Ko07T был одним из доминирующих изолятов, растущих на чашках в аэробных условиях.

Изолят был помещен в Корейскую коллекцию типовыхкультур как KCTC 12205T (=DSM 16239T). Виды Lysobacter с действительными опубликованными названиями были получены из BCCMTM/LMG (Бельгийские координированные коллекции микроорганизмов/Laboratorium voor Microbiologie). Морфологические характеристики и подвижность наблюдались с помощью дифференциальной интерференционной контрастной микроскопии.

Окрашивание по Граму и тесты на каталазу и оксидазу проводились в соответствии с протоколами, изложенными Smibert & Krieg (1981). Некоторые физиологические свойства и использование субстрата определялись с помощью наборов API 20 NE, API ID 32 GN и API 50 CHB (bioMe´rieux). Деградация хитина, крахмала и Tween 80 также исследовалась с использованием протоколов, изложенных Atlas (1993). Клетки, выращенные на пластинах агара R2A при 30uC в течение 2 дней, использовались для экспериментов, упомянутых выше. Чтобы определить, имеет ли штамм Ko07T гены нитритредуктазы (nirK и nirS), ПЦР проводилась с использованием двух различных систем праймеров, разработанных Braker et al. (1998), nirK1F/nirK5R для nirK и nirS1F/nirS6R для nirS, при различных температурных профилях. Клетки, выращенные на пластинах агара R2A в течение 2 дней, использовались для анализа состава жирных кислот клеток. Жирные кислоты клеток были омылены, метилированы и экстрагированы в соответствии с протоколом Системы идентификации микроорганизмов Sherlock (MIDI). Жирные кислоты были проанализированы с помощью газового хроматографа (6890; Hewlett Packard), оснащенного программным пакетом Microbial Identification (Sasser, 1990). Убихиноны были экстрагированы из клеток, выращенных в жидкой среде с тем же составом, что и R2A, но без агара, в соответствии с протоколом, описанным Komagata & Suzuki (1987). Убихиноны анализировали методом ВЭЖХ с использованием колонки с обращенной фазой C18 при 254 нм и подвижной фазы, включающей ацетонитрил и изопропанол (65:35, об./об.) при 1 мл мин21.

Геномную ДНК выделяли с использованием протокола, описанного Шмидтом и др. (1991). РНК удаляли обработкой смесью РНКазы А и Т1 (каждая по 20 ед. мл21) при 30 мкС в течение 1 ч. Экстракт ДНК использовали для геномных и филогенетических исследований. Содержание G+C геномной ДНК определяли, как описано Месбахом и др. (1989). Значение гибридизации ДНК–ДНК оценивали флуорометрически с использованием ДНК-зондов, меченных фотобиотином, и лунки для микроразведения в соответствии с методом Эзаки и др. (1989). Ген 16S рРНК был амплифицирован с использованием бактериального универсального набора праймеров 9F (59-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-39) и 1512R [59-ACG G(A/T/C)T ACC TTG TTA CGA CTT-39]. Продукт ПЦР был очищен с помощью набора GFX PCR DNA и Gel Band Purification (Amersham Biosciences). Он был секвенирован с использованием набора ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) и автоматического секвенатора ДНК (модель 310; Applied Biosystems). Для полного секвенирования также использовались следующие праймеры: 519F (59-CAG CAGCCGCGGTAA TAC-39), 907F [59-AAA CTC AAA(G/T)GAATTGACGG39], 536R (59-GTA TTA CCG CGG CTG CTG-39) и 1100R (59-GGG TTG CGC TCG TTG-39). Частичные последовательности были выровнены и объединены с помощью программы BioEdit (Hall, 1999). Поиск BLAST был выполнен для получения последовательностей гена 16S рРНК из родственных таксонов в GenBank. Эти собранные последовательности были выровнены и отредактированы с помощью программы CLUSTAL\_X (Thompson et al., 1997) и программы BioEdit (Hall, 1999) соответственно. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием двухпараметрической модели Кимуры (Kimura, 1983), а филогенетическое дерево было построено с использованием метода соседнего присоединения (Saitou & Nei, 1987) в программе MEGA 2 (Kumar et al., 2001). Метод бутстрепа был использован для получения уровней достоверности для анализа соседнего присоединения с набором данных бутстрепа 1000 (Felsenstein, 1985).

Штамм Ko07T является аэробным, грамотрицательным и палочковидным (0?7–1?061?0–13?5 мм). Размер клеток менялся со временем. Клетки, выращенные на пластинах агара R2A в течение 5 дней, выглядели как изогнутые палочки длиной более 5 мм, тогда как клетки, инкубированные в течение 30 дней, были короче, как показано на рис. 1. Движение жгутиков не наблюдалось при микроскопии. Колонии, выращенные на пластинах агара R2A в течение 2 дней, были желтоватого цвета, гладкие, круглые, выпуклые и неблестящие, и 2–4 мм при инкубации (¢3 недели). Распространяющиеся и роящиеся колонии, указывающие на скользящее движение, наблюдались на пластине агара R2A, инкубированной в течение 1 месяца, и на пластинах YA [0,5% (w/v) дрожжевой экстракт плюс 1,5% бактоагара] и CCA (0,2% триптон плюс 1,5% бактоагара), инкубированных в течение 2 недель. Тесты на каталазу и оксидазу были положительными. Желатин разжижался в течение 1 дня, что указывает на протеолитическую активность; это также наблюдалось для всех типовых штаммов видов рода Lysobacter. Способность расщеплять полисахарид на хитине и крахмале, присутствующая у некоторых видов Lysobacter (Christensen & Cook, 1978), не наблюдалась у штамма Ko07T. Активность липазы на Твине 80 также не была обнаружена, тогда как большинство видов Lysobacter обладают этой активностью (Christensen & Cook, 1978). Различия в фенотипических характеристиках, включая использование субстрата, между Ko07T и типовыми штаммами некоторых видов Lysobacter суммированы в таблице 1; результаты показывают, что Ko07T отличается от других типовых штаммов в фенотипических аспектах.

Нитрат не восстанавливался до нитрита. Гены нитритредуктазы nirK и nirS не амплифицировались праймерными системами nirK1F/nirK5R и nirS1F/nirS6R соответственно. Ko07T хорошо рос при 25–30uC и pH6?8–7?5, но не при 4 или 45uC. Q-8 был основным хиноном в штамме Ko07T и во всех типовых штаммах признанных видов Lysobacter. Преобладающими жирными кислотами клеток, наблюдаемыми в Ko07T и в типовых штаммах всех известных видов Lysobacter, были C16:0, C11:0 iso, C11:0 iso 3OH, C15:0 iso, C15:0 anteiso, C16:0 iso, C17:0 iso, iso C17:1v9c и суммарный признак 4 (C15:0 iso 2OH/C16:1v7c), хотя их относительные количества немного отличались (таблица 1). Полученные профили жирных кислот хорошо соответствовали профилям L.antibioticus ATCC 29479T и L. enzymogenes ATCC 29487T из MIDI, а также профилям штаммов N4-7 и C3, которые были идентифицированы как принадлежащие к роду Lysobacter (Sullivan et al., 2003). Результаты показывают, что штамм Ko07T имеет общие хемотаксономические черты с признанными видами Lysobacter. Содержание геномной ДНК G+C штамма Ko07T составило 63?8 мол.%, что ниже, чем у типовых штаммов

признанных видов Lysobacter, 65?7–69?2 мол.% (таблица 2), что указывает на то, что штамм Ko07T следует рассматривать как представляющий новый вид рода Lysobacter. Для филогенетического анализа была получена почти полная последовательность гена 16S рРНК штамма Ko07T (1481 нт). Последовательности гена 16S рРНК L. gummosus ATCC 29489T (1482 нт) и L. brunescens ATCC 29482T (1467 нт) также были определены в этом исследовании; L. enzymogenes DSM 2043T и L. antibioticus DSM 2044T были получены из GenBank. Как показано на филогенетическом дереве (рис. 2), штамм Ko07T тесно кластеризован с типовыми штаммами видов Lysobacter с валидно опубликованными названиями и неназванными видами Lysobacter в независимой филогенетической ветви в классе «Gammaproteobacteria», которая явно отличается от соседних родов Xanthomonas и Thermomonas. Сходство последовательностей штамма Ko07T с этими организмами в кластере составило 94?9–96?7% (см. Дополнительную таблицу в IJSEM Online). Высокое значение бутстрепа (98%) обеспечивает сильную поддержку включения штамма Ko07T в род Lysobacter. Это также подтверждается вышеупомянутыми таксономическими характеристиками и типичными фенотипическими свойствами, первоначально описанными Кристенсеном и Куком (1978), например. скользящее движение, форма длинного стержня, протеолитическая активность и высокое содержание G+C геномной ДНК. L. brunescens ATCC 29482T также был помещен в кластер Lysobacter, но в ветвь с низким значением бутстрепа, 42% (рис. 2). Этот организм имеет сходство последовательностей 94?1–96?1% с некоторыми видами Thermomonas и Xanthomonas melonis, некоторые значения которых выше, чем у типовых штаммов признанных видов Lysobacter (95?2–95?6%) (см. Дополнительную таблицу в IJSEM Online). Несмотря на слабую филогенетическую связь с другими видами Lysobacter, штамм Ko07T по-прежнему разделяет общие черты членов рода Lysobacter в отношении представленных фенотипических и хемотаксономических аспектов (таблица 1)

Для того чтобы определить, представляет ли штамм Ko07T новый вид рода Lysobacter, были оценены значения гибридизации ДНК–ДНК между Ko07T и признанным видом Lysobacter. Гибридизация ДНК–ДНК достаточна для подтверждения того, что Ko07T следует классифицировать как представляющий новый вид Lysobacter. Его более низкое содержание ДНК G+C (63?8 мол.%) и различия в фенотипических характеристиках (таблица 1) также предполагают, что Ko07T следует рассматривать как новый вид. Поэтому на основе результатов, полученных в этом исследовании, мы предлагаем классифицировать штамм Ko07T как новый вид в пределах рода Lysobacter, для которого предлагается название Lysobacter concretionis sp. nov. Описание Lysobacter concretionis sp. nov. Lysobacter concretionis (con.cret.i.on9is. L. gen. n. concretionis компактирующего, конденсирующего, застывающего). Грамотрицательная, аэробная палочковидная или нитевидная форма, различных размеров (0,7–1,061,0–13,5 мм), после роста на пластинах агара R2A при 25uC в течение 10 дней. Не перемещается с помощью жгутиков, а скользит по поверхности агара. Колонии, выращенные на пластине агара R2A в течение 2 дней, желтые и круглые, но через 1 месяц становятся слабой коричневато-желтой роящейся формой. Оптимальная температура роста и pH составляют 25–30uC и 6,8–7,5 соответственно. Содержание ДНК G+C составляет 63,8 мол.%, как определено с помощью ВЭЖХ. Q-8 является преобладающим хиноном. Основные клеточные жирные кислоты: C16:0 (2,4%), C11:0 изо (6,42%), C15:0 изо (36,1%), C16:0 изо (19,9%), изо C17:1v9c (13,9%) и C11:0 изо 3OH (5,6%). Не восстанавливает нитрат. Может разжижать желатин, но не может разлагать хитин, Твин 80 или крахмал. Другие фенотипические характеристики, такие как использование субстрата и выработка ферментов, обобщены в Таблице 1. Типовой штамм — Ko07T (=KCTC 12205T=DSM 16239T), выделенный из реактора UASB, очищающего сточные воды пивоваренного завода.





