Два штамма бактерий с отрицательной реакцией по Граму, палочковидные, скользящие, желтопигментированные, обозначенные ZLD-17T и ZLD-29T, были выделены из образцов засушливой почвы, собранных в провинции Синьцзян, на северо-западе Китая, и подвергнуты анализу с использованием полифазного таксономического подхода. Оба новых штамма требовали 1,0–2,0% (м/о) морской соли для оптимального роста. Филогенетический анализ, основанный на последовательностях генов 16SrRNA, показал, что эти два штамма относятся к роду Lysobacter в пределах класса Gammaproteobacteria. Штамм ZLD-17T показал наивысший ген 16SrRNA сходство последовательностей с LysobactercapsiciKCTC22007T (96,9%), Lysobacter spongiicola DSM 21749T (96,8%) и LysobacterkoreensisKCTC12204T (96,8%), тогда как штамм ZLD-29T показал наибольшую сходство последовательностей с Lysobacter niastensis DSM18481T (96,0%) и Lysobacteren zymogenes DSM2043T (95,9%).16С ходство последовательностей генов Sr RNA междуZLD-17TиZLD-29T составило 96,1%. Содержание ДНК+C штаммов ZLD-17T и ZLD-29T Составило 67,9 и 68,2 моль % соответственно. Основные клеточные жирные кислоты обоих штаммов суммарный признак3 (изо-C15:02-OH и/или C16:1v7c), изо-C17:1v9c, изо-C16:0, C16:0 иизо-C11:03-OH; их преобладающим изопреноидхиноном был Q-8, а их основными полярными липидами были дифосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерин. На основании их фенотипических характеристик, филогенетического положения, определенного с помощью анализа последовательности гена 16SrRNA и хемотаксономических данных, штаммы ZLD-17T (5CCTCCAB207174T5KCTC23076T) и ZLD-29T (5CCTCCAB207175T5KCTC23077T) представляют два новых вида род Lysobacter, для которого предложены названия Lysobacter korlensis sp.nov. и Lysobacter bugurensis sp.nov., соответственно.

Род Lysobacter был впервые описан Кристенсеном и Куком (1978), а затем описание было изменено Парком и др. (2008). Члены рода Lysobacter в семействе Xanthomonadaceae содержат убихинон Q-8 в качестве основного дыхательного хинона и имеют высокое содержание ДНКГ+C (Parketal.,2008; Wangetal.,2009). Члены рода являются сильно протеолитическими и характеризуются лизисом различных микроорганизмов, включая грамотрицательные бактерии, грамположительные бактерии, цианобактерии, нитчатые грибы, дрожжи, водоросли и нематоды (Christensen& Cook,1978). На момент написания статьи род включал 17 видов с валидно опубликованными названиями, включая недавно описанные виды Lysobacter soli (Srinivasanetal.,2010) и Lysobacterpanaciterrae (Tenetal.,2009). В ходе исследования культивируемого бактериального сообщества в почве из засушливого района в провинции Синьцзян на северо-западе Китая, было выделено 180 штаммов бактерий; 60 чистых культур были случайно отобраны для секвенирования гена 16S рРНК и филогенетического анализа. Эти изоляты включали представителей фил Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes и Deinococcus–Thermus. В этом исследовании полифазный таксономический подход использовался для характеристики двух изолятов, обозначенных штаммами ZLD-17T и ZLD-29T, принадлежащих к гамма-протеобактериям. На основе фенотипических характеристик, хемотаксономических данных и филогенетического анализа последовательностей гена 16S рРНК было обнаружено, что эти два изолята представляют два новых вида рода Lysobacter. Штаммы ZLD-17T и ZLD-29T были выделены из почвы, взятой из засушливой области (42u 789–43u 159N88u 659–88u839E) Сокращение: PNPG, p-нитрофенил-b-D-галактопиранозид. Номера доступа GenBank/EMBL/DDBJ для последовательностей гена 16SrRNA штаммов ZLD-17T и ZLD-29T — EU908051 и EU780693 соответственно. в провинции Синьцзян на северо-западе Китая. Образцы почвы суспендировали в стерилизованной воде, а разбавленные растворы наносили на агаровые пластины, содержащие половинный морской бульон 2216 (MB; Difco) с добавлением 1,5% агара. Изоляция достигалась после инкубации при 28 uC в течение 1 недели. В отличие от других видов Lysobacter с валидно опубликованными названиями, штаммы ZLD-17T и ZLD-29T показали плохой рост на агаре R2A (Difco); первый не рос, а последний образовывал несколько небольших колоний после инкубации при 28 uC в течение 1 недели. Таким образом, изоляты обычно культивировали на половинном агаре MB при 28 uC и суспензиях глицерина (20%, об./об.) при 280 uC.

Для секвенирования гена 16S рРНК и филогенетического анализа ДНК извлекали с помощью коммерческого набора для извлечения геномной ДНК (ChaoShi-Bio). Пара праймеров 27f (59-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-39) и 1527r (59-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-39) использовалась для амплификации гена 16S рРНК (Lane, 1991). ПЦР и секвенирование гена 16S рРНК проводились, как описано Lin et al. (2004). Идентификация филогенетических соседей и расчет парного сходства последовательностей гена 16S рРНК были достигнуты с использованием сервера EzTaxon (http://www.eztaxon.org/; Chun et al., 2007). Филогенетический анализ был выполнен с использованием MEGA версии 4.1 (Tamura et al., 2007),

после множественного выравнивания данных с помощью CLUSTAL\_X (Thompson et al., 1997). Использовался метод матрицы расстояний (варианты расстояний в соответствии с двухпараметрической моделью Кимуры), включая кластеризацию с использованием метода объединения соседей и метода максимальной экономии на основе дискретных символов. В каждом случае значения бутстрепа рассчитывались на основе 1000 репликаций. Были определены почти полные последовательности гена 16S рРНК для штаммов ZLD-17T и ZLD-29T (1448 и 1453 п.н. соответственно). Сходство последовательностей гена 16S рРНК между штаммами ZLD-17T и ZLD-29T составило 96,1%. В филогенетических деревьях, основанных на алгоритмах объединения соседей и максимальной экономии (рис. 1; дополнительный рис. S1, доступный в IJSEM Online), штаммы ZLD-17T и ZLD-29T попали в радиацию кластера, включающего виды рода Lysobacter. Однако топология филогенетического дерева, полученного с помощью алгоритма максимальной экономии (Дополнительный рис. S1), несколько отличалась от топологии дерева, реконструированного с помощью метода соседнего объединения (рис. 1). Штамм ZLD-17T образовал кладу с Lysobacter koreensis KCTC 12204T в дереве соседнего объединения, но образовал отдельную монофилетическую группу в дереве максимальной экономии.

Для штаммов ZLD-17T и ZLD-29T клеточную морфологию определяли с помощью фазово-контрастной микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии с 2-дневными клетками, выращенными на половинной концентрации агара MB. Реакцию по Граму проводили в соответствии с классической процедурой Грама, описанной Doetsch (1981). Скользящую подвижность определяли, как описано Bowman (2000). Рост оценивали на половинной концентрации среды MB при 4, 7, 10, 15, 20, 28, 33, 37, 42 и 45 uC и при pH 4–11 с интервалом в одну единицу pH для определения диапазонов температуры и pH для роста. Рост в отсутствие NaCl и в присутствии 0,5–5,0% (w/v) NaCl (с шагом 0,5%) исследовали в среде пептон-дрожжевой экстракт (PY) (пептон Bacto, 2,5 г; дрожжевой экстракт, 0,5 г; дистиллированная вода, 1 л). Рост также определяли в среде PY, содержащей 0,5% (w/v) морских солей (с шагом 0,5%; Sigma). Рост в анаэробных условиях определяли путем инкубации в течение 1 недели в анаэробной камере (система Oxoid AnaeroJar) на агаре MB половинной крепости. Активность оксидазы проверяли с использованием 1% раствора тетраметил-п-фенилендиамина (Kova´cs, 1956). Активность каталазы определяли путем оценки образования пузырьков после добавления капли 3% H2O2. Тесты по определению разложения аденина, гуанина, гипоксантина, ксантина, тирозина, эластина, кератина и тестостерона проводились с использованием метода Гордона и Смита (1955). Гидролиз крахмала и казеина тестировался, как описано Смибертом и Кригом (1994). Гидролиз гиппурата определялся, как описано Киньоном и Харрисом (1979). Гемолитическую активность тестировали на агаре МБ половинной крепости, дополненном 5% (об./об.) дефибринированной овечьей крови. Также тестировали гидролиз CM-целлюлозы (0,1%, м/о) и хитина из панцирей крабов (1%, м/о). Рост оценивали на триптиказо-соевом агаре (TSA; Difco), агаре Макконки (Difco) и агаре с сердечно-мозговой вытяжкой (BHI) (Becton Dickinson) при 28 uC. Кислотность

продукция из углеводов определялась, как описано Лейфсоном (1963). Коммерчески доступные системы API 20 E, API 20 NE, API ID 32GN и API ZYM (bioMe ´rieux) использовались для определения биохимических свойств, утилизации углеводов и активности ферментов в соответствии с инструкциями производителя, за исключением того, что все

суспензионные среды для штаммов ZLD-17T и ZLD-29T были дополнены 1% (w/v) морской соли. Клетки штаммов ZLD-17T и ZLD-29T были аэробными, грамреакционно-отрицательными, скользящими и палочковидными (Дополнительный рис. S2). Колонии обоих штаммов были желтыми, круглыми и выпуклыми с четкими краями после инкубации при 28 uC в течение 2 дней на агаре MB половинной крепости (Difco). Морские соли были благоприятны для роста обоих новых штаммов. Штамм ZLD17T не рос в среде PY, содержащей NaCl (0–5%) в качестве единственной соли, но рос в среде PY с добавлением 0,5–4,0% морских солей (оптимум 1–2%). Штамм ZLD-29T рос очень слабо в среде PY, но рос гораздо лучше в среде PY с добавлением 0,5–3,0% NaCl. Однако оптимальный рост штамма ZLD-29T наблюдался в среде PY с добавлением 1–2% морских солей. Оба штамма не могли расти на TSA (Difco), агаре Макконки (Difco) или агаре BHI (Becton Dickinson). При более длительном времени инкубации (.1 неделя) центры колоний штамма ZLD-17T приобретали коричневую окраску. Штамм ZLD-17T отличался от штамма ZLD-29T своей способностью гидролизовать тирозин, ONPG и p-нитрофенил-b-D-галактопиранозид

(PNPG), но не желатин. Кроме того, штамм ZLD-17T продуцировал такие ферменты, как трипсин и b-галактозидаза, а штамм ZLD-29T — нет. Фенотипические характеристики штаммов ZLD-17T и ZLD-29T обобщены в описании видов, а сравнение селективных характеристик с признанными представителями рода

Lysobacter приведено в Таблице 1. Содержание ДНК G+C определялось с помощью ВЭЖХ по методу Месбаха и др. (1989). Дыхательные хиноны извлекались и определялись с помощью ВЭЖХ, как описано Xie & Yokota (2003). Полярные липиды извлекались и анализировались, как описано Tindall (1990). Для анализа полярных липидов 6,75 мл порции хлороформа/метанола/0,3% водного NaCl (1:2:0,8, об./об./об.) добавляли

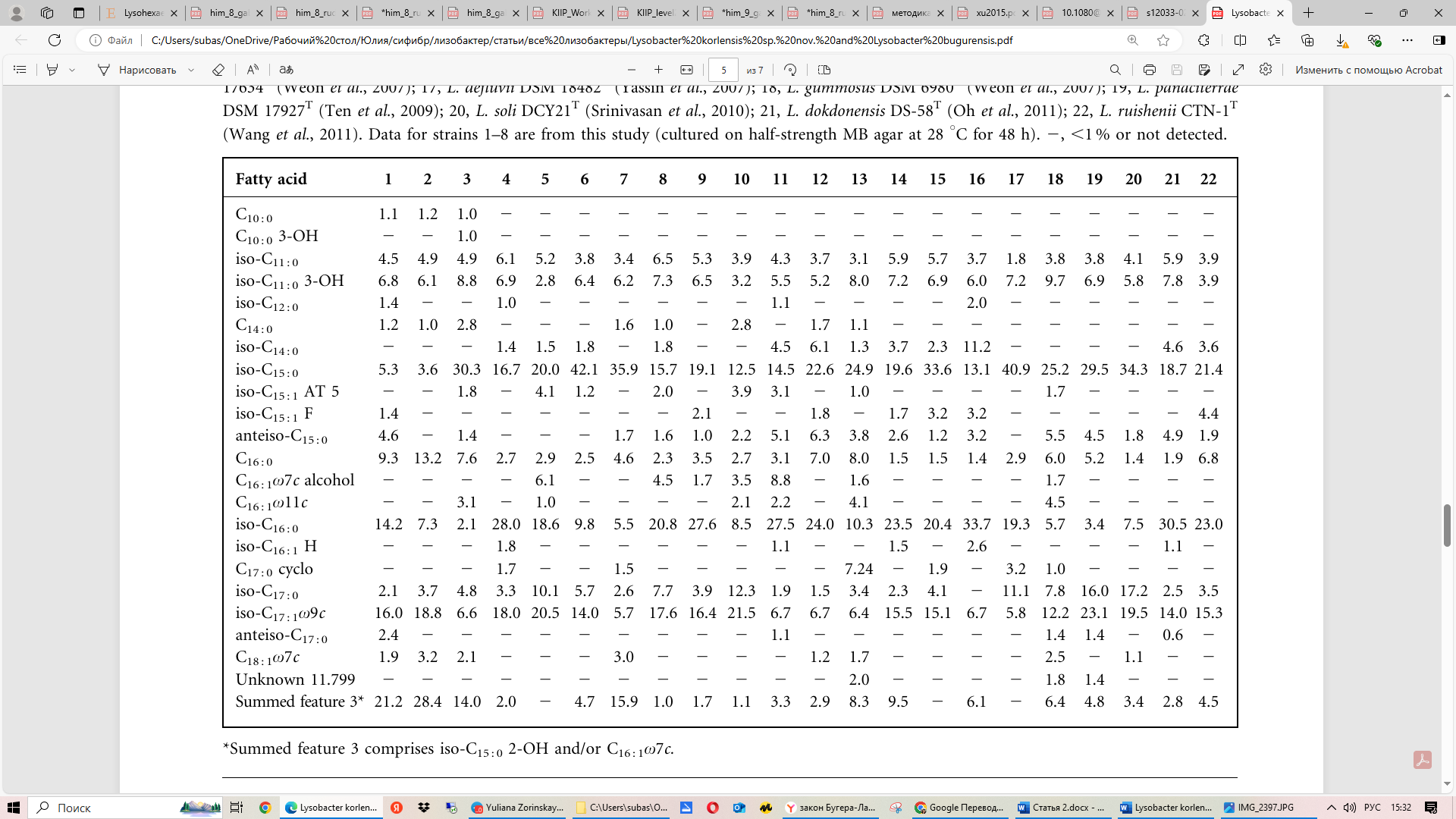
к 100 мг лиофилизированного клеточного материала. Препарат перемешивали в течение ночи, а клеточный дебрис осаждали центрифугированием. Полярные липиды извлекали в фазу хлороформа, доводя смесь хлороформа/метанола/0,3% водного NaCl до соотношения 1:1:0,9 (об./об./об.), а затем высушивали в атмосфере азота. Высушенные полярные липиды ресуспендировали в хлороформе/метаноле (2:1, об./об.) и разделяли с помощью двумерной ТСХ. Общий липидный материал и специфические функциональные группы были обнаружены с использованием додекамолибдофосфорной кислоты (общие липиды), реактива Зинзадзе (фосфат), нингидрина (свободные аминогруппы), периодата Шиффа (a-гликоли), реактива Драгендорфа (четвертичный азот) и анисальдегид-серной кислоты (гликолипиды). Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводился в соответствии со стандартным протоколом Системы идентификации микроорганизмов Sherlock (MIDI, 1999). Содержание ДНК G+C штаммов ZLD-17T и ZLD-29T составило 67,9 и 68,2 мол.% соответственно. Оба штамма имели убихинон-8 (Q-8) в качестве основного изопреноидного хинона, что является характерной чертой представителей рода Lysobacter (Bae et al., 2005). Составы жирных кислот новых штаммов и типовых штаммов известных видов Lysobacter приведены в Таблице 2. Основные жирные кислоты, обнаруженные

(проценты от общего количества клеточных жирных кислот) из штаммов ZLD-17T и ZLD-29T, были суммированы признак 3 (изо-C15:0 2-OH и/или C16:1v7c; 21,2 и 28,4% соответственно), изо-C17:1v9c (16,0 и 18,8%), изо-C16:0 (14,2 и 7,3%), C16:0 (9,3 и 13,2%) и изо-C11:0 3-OH (6,8 и 6,1%). Штаммы ZLD-17T и ZLD-29T также отличались друг от друга по относительному количеству антиизо-C15:0. По сравнению со всеми признанными членами рода Lysobacter, оба новых штамма содержали большее количество суммарного признака 3, но значительно меньшее количество изо-C15:0. Полярные липидные профили штаммов ZLD-17T и ZLD-29T (рис. 2) были схожи с точки зрения их основных компонентов, включая фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин и дифосфатидилглицерин, которые являются характерными полярными липидами рода Lysobacter (Park et al., 2008; Romanenko et al., 2008). Кроме того, оба штамма содержали небольшое количество неизвестного аминолипида (AL1) и трех неизвестных фосфолипидов (PL1–3). Тем не менее, в их полярных липидных профилях можно было наблюдать некоторые небольшие различия. Штамм ZLD-17T отличался от штамма ZLD-29T наличием неизвестных фосфолипидов PL4 и PL5 и отсутствием неизвестного фосфолипида PL6.

Таким образом, на основании представленных данных штаммы ZLD17T и ZLD-29T представляют два новых вида рода Lysobacter, для которых предложены названия Lysobacter korlensis sp. nov. и Lysobacterbugurensis sp. nov. соответственно. Описание Lysobacter korlensis sp.nov. Lysobacter korlensis (kor.len9sis. N.L.masc. adj. korlensis, относящийся к Корле, городу провинции Синьцзян на северо-западе Китая, откуда был выделен типовой штамм). Клетки аэробные, грамположительные, скользящие и палочковидные (0,3–0,46–1,0–2,5 мм). Колонии желтые, круглые, выпуклые и 1–2 мм в диаметре с четкими краями после инкубации при 28°C в течение 2 дней в половинной концентрации MBagar (Difco). Рост происходит при 10–37°C (оптимум 28°C), при pH 6–11 (оптимум pH7–8) и в 0,5–4,0% (вес/объем) морских солях (оптимум 1,0–2,0%), но рост не происходит в среде, содержащей NaCl в качестве единственной соли. Слабоположительный для каталазы; оксидаза-положительный. Демонстрирует a-гемолиз. Гидролизует эскулин, казеин, крахмал, тирозин, ONPG и PNP G, но не желатин, аденин, гуанин, гипоксантин, ксантин, эластин, кератин, тестостерон, гиппурат, CM-целлюлозу или хитин. Восстановление нитрата и продукция ацетоина (реакция Фогеса-Проскауэра) слабоположительны. Продукция сероводорода, утилизация цитрата, продукция индола и активность аргининдигидролазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, уреазы и триптофандеаминазы отрицательны(API 20 E). Отрицательно для усвоения D-глюкозы, L-арабинозы, D-маннозы, D-маннита, N-ацетилглюкозамина, мальтозы, глюконата калия, каприновой кислоты, адипиновой кислоты, яблочнойкислоты, тринатрийцитрата, фенилуксусной кислоты, L-рамнозы,рибозы, сахарозы, субериновой кислоты, молочной кислоты, аланина, гликогена,мелибиозы, 3-гидроксимасляной кислоты, пролина, инозита, итаконовой кислоты, малоната натрия, ацетата натрия, калия5-кетоглюконата, 3-гидроксибензойной кислоты, L-серина, салицина, L-фукозы, D-сорбита, пропионовой кислоты, валериановой кислоты, L-гистидина,калия 2-кетоглюконата и 4-гидроксибензойной кислоты (API20NE и APIID32GN). Кислота, полученная из D-глюкозы, но не из D-маннита, глицерина, mальтозы, D-арабинозы, L-арабиноза, D-рибоза, D-ксилоза, D-галактоза, D-фруктоза, D-манноза, L-рамноза, лактоза, сахароза или трегалоза. Согласно галерее APIZYM (bioMe ´rieux), положительный по щелочной фосфатазе, эстеразе (C4), эстеразелипазе (C8), лейцинариламидазе, трипсину, a-химотрипсину, кислой фосфатазе, нафтол-AS-BI-фосфогидролазе и b-галактозидазе, но отрицательный по липазе (C14), валинариламидазе, цистинариламидазе, a-галактозидазе, b-глюкуронидазе, a-глюкозидазе, b-глюкозидазе, N-ацетил-b-глюкозаминидазе, a-маннозидазе и a-фукозидазе. Преобладающим дыхательным хиноном является Q-8. Полярные липиды состоят из дифосфатидилглицерина, фосфатидилглицерина, фосфатидилэтаноламина, неизвестного аминолипида и пяти неизвестных фосфолипидов. Основные жирные кислоты суммируются признаком 3 (изо-C15:02-OH и/или C16:1v7c), изо-C17:1v9c, изо-C16:0, C16:0 и изо-C11:0 3-OH; подробные составы жирных кислот приведены в Таблице 2.

Типовой штамм LD-17T (5CCTCCAB207174T5KCTC 23076T) был выделен из образца аридной почвы, собранного в Корле, провинция Синьцзян, северо-запад Китая. Содержание ДНК G+C в типовом штамме составляет 67,9 моль%.

Описание Lysobacter bugurensis sp.nov. Lysobacter bugurensis (bu.gur.en9sis. N.L. муж. нареч. прил. bugurensis, относящийся к Бугуру, уезду провинции Синьцзян на северо-западе Китая, откуда был выделен типовой штамм). Клетки аэробные, грам-отрицательные, скользящие и палочковидные (0,6–0,76–1,1–1,5 мм). Колонии желтые, круглые, выпуклые и диаметром 1–2 мм с четкими краями после инкубации при 28°C в течение 2 дней на половинном агаре MB (Difco). Рост происходит при 10–37uC (оптимум 28uC), при pH 6–11 (оптимум pH 7–8) и в присутствии 0–3% (w/v) NaCl; оптимальный рост требует присутствия 1–2% (w/v) морских солей. Слабоположительный для каталазы; оксидаза-положительный. Демонстрирует a-гемолиз. Гидролизует эскулин, желатин, казеин и крахмал, но не тирозин ONPG, PNPG, аденин, гуанин, гипоксантин, ксантин, эластин, кератин, тестостерон, гиппурат, CM-целлюлозу или хитин. Восстановление нитрата слабоположительное. Продукция сероводорода, продукция ацетоина (реакция Фогеса-Проскауэра), утилизация цитрата, продукция индола и активность аргининдигидролазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, уреазы и триптофандезаминазы отрицательны (API 20 E). Отрицательно для усвоения D-глюкозы, L-арабинозы, D-маннозы, D-маннита, N-ацетилглюкозамина, мальтозы, глюконата калия, каприновой кислоты, адипиновой кислоты, яблочной кислоты, тринатрийцитрата, фенилуксусной кислоты, L-рамнозы, рибозы, сахарозы, пробковой кислоты, молочной кислоты, аланина, гликогена, мелибиозы, 3-гидроксимасляной кислоты, пролина, инозита, итаконовой кислоты, малоната натрия, ацетата натрия, 5-кетоглюконата калия, 3-гидроксибензойной кислоты, L-серина, салицина, L-фукозы, D-сорбита, пропионовой кислоты, валериановой кислоты, L-гистидина, 2-кетоглюконата калия и 4-гидроксибензойной кислоты (API 20 NE и API ID32GN). Кислота производится из D-глюкозы и мальтозы, но не из D-маннита, глицерина, D-арабинозы, L-арабинозы, D-рибозы, D-ксилозы, D-галактозы, D-фруктозы, D-маннозы, L-рамнозы, лактозы, сахарозы или трегалозы. Согласно галерее API ZYM (bioMe ´rieux), положительный для щелочной фосфатазы, эстеразы (C4), эстеразы липазы (C8), лейцинариламидазы, a-химотрипсина, кислой фосфатазы и нафтол-AS-BI-фосфогидролазной активности, но отрицательный для липазы (C14), валинариламидазы, цистинариламидазы, трипсина, a-галактозидазы, b-галактозидазы, b-глюкуронидазы, a-глюкозидазы, b-глюкозидазы, N-ацетил-b-глюкозаминидазы, a-маннозидазы и a-фукозидазы. Преобладающим дыхательным хиноном является Q-8. Полярные липиды состоят из дифосфатидилглицерина, фосфатидилглицерина, фосфатидилэтаноламина, неизвестного аминолипида и четырех неизвестных фосфолипидов. Основные жирные кислоты суммируются признаком 3, изо-C17:1v9c,C16:0, изо-C16:0 и изо-C11:0 3-OH; подробный состав жирных кислот приведен в Таблице 2. Типовой штамм ZLD-29T (5CCTCC AB 207175T 5KCTC 23077T) был выделен из образца засушливой почвы, собранного в Бугуре, провинция Синьцзян, северо-запад Китая. Содержание ДНК G+C в типовом штамме составляет 68,2 мол.%.



Клеточные жирнокислотные составы (%) штаммов ZLD-17T и ZLD-29T и типы штаммы виды рода LysobacterШтаммы: 1,ZLD-17T; 2,ZLD-29T; 3,L. capsici KCTC22007T; 4,L. spongiicola DSM21749T; 5,L. koreensis KACC11581T; 6, L.niastensis DSM 18481T; 7, L.enzymogenes DSM2043T; 8, L.niabensis DSM18244T; 9, L.xinjiangensis RCML-52T (Liuetal., 2011); 10, L.oryzae YC6269T (Aslam et al., 2009); 11, L. yangpyeongensis DSM17635T(Weonetal.,2007); 12, L.ximonensis XM415T (Wangetal.,2009); 13, L.antibioticus DSM2044T (Weonetal.,2007); 14, L.brunescens DSM6979T (Weonetal.,2007); 15, L.concretionis KCTC12205T (Weonetal.,2007); 16, L.daejeonensis DSM 17634T(Weonetal.,2007);17,L.defluviiDSM18482T (Yassinetal.,2007); 18, L.gummosus DSM6980T (Weonetal.,2007); 19,L.panaciterae DSM17927T (Тенетал.,2009); 20, Л. soliDCY21T (Srinivasanetal.,2010); 21 , L.dokdonensis DS-58T (Ohetal.,2011); 22, L. ruishenii CTN-1T(Wangetal.,2011). Данные для штаммов 1–8 взяты из этого исследования (культура половинной силы MBagarat28uC в течение 48 часов).2,,1% или не обнаружено.