Аннотация Строго аэробный, грамотрицательный, абрикосово-пигментированный, неподвижный, палочковидный штамм, обозначенный как KMU14T, был выделен из морской воды, собранной в прибрежной зоне острова Йокджи, Кёнсан-Намдо, Республика Корея. Филогенетический анализ, основанный на последовательности гена 16S рРНК, показал, что новый изолят был связан с родом Lysobacter в пределах класса Gammaproteobacteria и что он показал наибольшее сходство последовательности (97,1 %) с Lysobacter concretionis Ko07T. Значение гибридизации для ДНК-ДНК родства между штаммами KMU-14T и L. concretionis Ko07T составило 34,8 %, что было ниже 70 %, рекомендуемого значения разграничения для дифференциации видов. Содержание ДНК G?C штамма KMU-14T составило 64,9 мол.%. Основным дыхательным хиноном был убихинон 8 (Q-8), а основными ([10 %) клеточными жирными кислотами были изо-C15:0, изо-C16:0 и 10-метил C16:0 и/или изо-C17:1 x9c. Присутствовал полярный липидный профиль, состоящий из дифосфатидилглицерина, фосфатидилэтаноламина, неопознанного фосфогликолипида, двух неопознанных аминофосфолипидов и двух неопознанных фосфолипидов. Из-за особого филогенетического положения и сочетания генотипических и фенотипических характеристик штамм считается представляющим новый вид, для которого дано название Lysobacter maris sp. nov. Электронный дополнительный материал Онлайн-версия этой статьи (doi:10.1007/s00284-015-0949-9) содержит дополнительный материал, который доступен авторизованным пользователям. & Jaewoo Yoon jwyoon@kmu.ac.kr 1 Фармацевтический колледж, Университет Кемён,

1095 Dalgubeoldaero, Dalseo-Gu, Daegu 704-701, Республика Корея

предложено. Типовой штамм L. maris sp. nov. — KMU-14T

(=KCTC 42381T =NBRC 110750T)

Введение

Филогенетические исследования, основанные на последовательностях гена 16S рРНК, показали, что виды класса Gammaproteobacteria широко распространены в разнообразных экосистемах, включая глубокие и приливные отложения, морскую воду и соленую почву [10]. Кроме того, представители этой филогенетической группы преобладают среди морского бактериопланктона,

вместе с представителями класса Alphaproteobacteria и типа Bacteroidetes [8]. Галофильные и хемогетеротрофные представители считаются представляющими большую часть морских бактерий, которые способны ассоциироваться с разложением сложных органических макромолекул [20]. Род Lysobacter был впервые предложен Кристенсеном и Куком [4] для скользящих бактерий с высоким содержанием ДНК G?C, которые не имеют плодового тела. На момент написания статьи род Lysobacter включает 29 видов, которые были выделены из различных природных сред (http://www.bacterio.net/lysobacter.html). В 2014 году в ходе нашего исследования разнообразия культивируемых морских бактерий в морской воде из образцов, собранных в прибрежной зоне острова Йокджи, была выделена бактерия, обозначенная как KMU-14T. Филогенетический анализ, основанный на последовательностях гена 16S рРНК, показал, что новый штамм принадлежит к роду Lysobacter класса Gammaproteobacteria. В этом исследовании мы охарактеризовали

морской штамм Lysobacter, KMU-14T, выделенный из морской воды с помощью полифазных таксономических методов, включая анализ последовательности гена 16S рРНК, физиологический, биохимический и хемотаксономический анализы. На основании полифазных таксономических данных мы предполагаем, что изолят

представляет собой новый вид рода Lysobacter в пределах класса Gammaproteobacteria.

Материалы и методы

Выделение бактериального штамма и культивирование

Условия

Образец морской воды был собран в прибрежной зоне острова Йокчи, Кёнсан-Намдо, Республика Корея, в июле 2014 года в стерильную полиэтиленовую бутылку объемом 1,5 л. 50 мкл образца было высеяно на агар R2A крепостью 1/2 (Difco), содержащий 75 % искусственной морской воды [16].

Несколько колоний, которые развивались при 25 °C, были отобраны и повторно перенесены на новые чашки с агаром R2A крепостью 1/2, и процедура была повторена дважды. Колония абрикосового цвета была отобрана как представитель нескольких подобных колоний, названная KMU-14T, и использовалась для дальнейшего исследования.

Штамм был стандартно субкультивирован на морском агаре 2216 (Difco) при 30 C и поддерживался в морском бульоне 2216 (Difco) с добавлением 20% (об./об.) глицерина при -70 C. Морфологический, физиологический и биохимический анализы

Морфология клеток наблюдалась с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), а подвижность измерялась с помощью фазово-контрастной микроскопии (Primo Star; ZEISS). Для наблюдения с помощью ПЭМ клетки монтировались на покрытых формваром медных сетках и негативно окрашивались 1% (м/о) водным уранилацетатом. Сетки наблюдались с помощью микроскопа Hitachi H-7100, работающего при 75 кВ и увеличении 930 000.

Диапазон температур (4, 10, 15, 20, 30, 37, 40 и 45 °C) и диапазон pH (5,5–9,5) для роста определяли путем инкубации изолята в течение 2 недель на морском агаре 2216. Для тестов pH использовали следующие буферы: MES (pH 5,5), ACES (pH 6,5 и 7,0), TAPSO (pH 7,6), TAPS (pH 8,5) и CHES (pH 9,0 и 9,5). Диапазон концентраций NaCl для роста определяли на агаровой среде TY [0,2 % триптона, 0,1 % дрожжевого экстракта и 1,5 % агара (w/v) с 0–10 % (w/v) NaCl], и клетки выращивали при 30 °C. Окрашивание по Граму проводили с использованием набора для окрашивания BD Gram Staining Kit (Becton, Dickinson and Company, США). Анаэробный рост тестировался в течение 2 недель на морском агаре 2216 в банке, содержащей AnaeroPack-Anaero (Mitsubishi Gas Chemical Co, Inc). Активность каталазы определялась по образованию пузырьков в 3% (об./об.) растворе H2O2. Тест на активность оксидазы проводился с использованием коммерческого капельного оксидазного реагента (Becton, Dickinson and Co). Деградацию ДНК тестировали с использованием агара ДНКазы (Scharlau Chemie). Способность гидролизовать казеин, Твин 20, Твин 80 и тирозин определяли по Хансену и Сёрхайму [9]. Для определения физиологических и биохимических характеристик использовались полоски API 20E, API 50CH и API ZYM (bioMe´rieux). Все суспензионные среды для тестовых полосок API были дополнены 0,85% (м/о) раствором NaCl (конечная концентрация). Тест-полоски API 20E, API 50CH и API ZYM считывали после 72 ч инкубации при 30 °C. Определение содержания ДНК G1C, секвенирование гена 16S рРНК и филогенетический анализ Геномная ДНК была подготовлена ​​в соответствии с методом Мармура [17], а состав оснований ДНК был определен методом ВЭЖХ Месбаха и др. [18]. Фрагмент гена 16S рРНК длиной около 1500 п.н. был амплифицирован с использованием универсальных бактериальных праймеров: 27F и 1492R [25]. Последовательность гена 16S рРНК штамма KMU14T была сравнена с последовательностями, полученными из NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). База данных EzTaxon-e [12] была использована для идентификации ближайших таксонов. Множественные выравнивания последовательностей были выполнены с использованием CLUSTAL\_X (версия 1.83) [24]. Пробелы в выравнивании и неоднозначные основания не принимались во внимание при сравнении 1388 оснований генов 16S рРНК. Эволюционные расстояния (двухпараметрическая модель Кимуры; [11]) были рассчитаны, а кластеризация была выполнена с помощью метода объединения соседей [22] с использованием программного обеспечения MEGA5 [23]. Топология филогенетического дерева была оценена методом повторной выборки бутстрепа Фельзенштейна [7] с 1000 репликациями

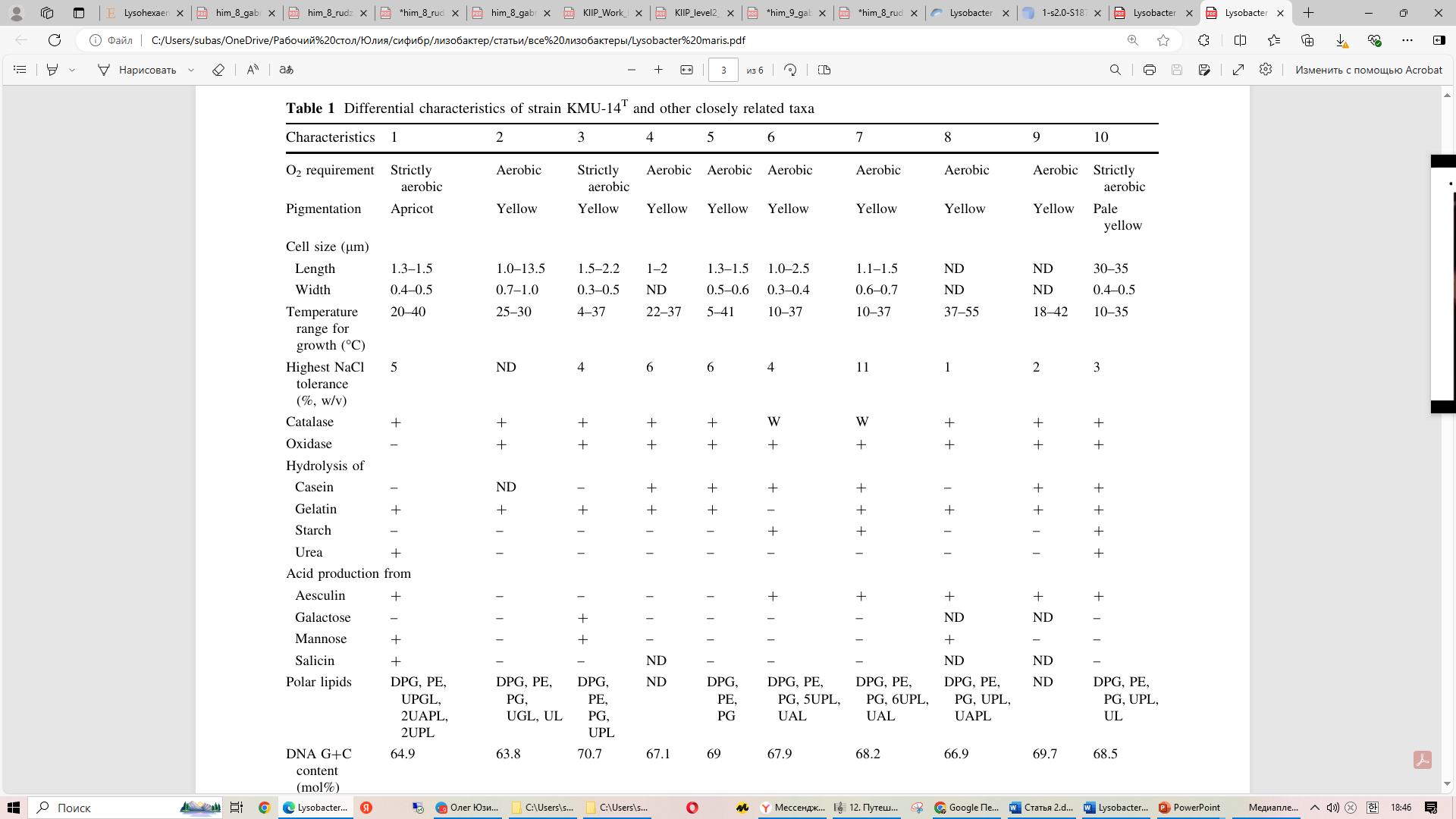
Тест гибридизации ДНК–ДНК

Гибридизация ДНК–ДНК проводилась методом мембранного фильтра [1]. Каждую смесь меченых и немеченых ДНК инкубировали при 37 °C в течение 12 часов. Тест реципрокной гибридизации проводили в трех повторностях.

Хемотаксономический анализ

Метиловые эфиры жирных кислот были извлечены и приготовлены из культуры, выращенной на морском агаре 2216 при 30 °C в течение 3 дней в соответствии со стандартными протоколами, предоставленными системой идентификации микроорганизмов MIDI/Hewlett Packard Sherlock версии 3.10/TSBA 50. Полярные липиды были извлечены в соответствии с процедурами, описанными Минникиным и др. [19], и они были идентифицированы ранее описанными методами [6,

13, 19, 26]. Определение дыхательной хинонной системы проводилось в соответствии с методом, описанным Коллинзом и Джонсом [5].



PEфосфатидилэтаноламин, PGфосфатидилглицерин, DPGдифосфатидилглицерин, SGLсфингогликолипид, UALнеопознанныйаминолипид,UAPLнеопознанныйаминофосфолипид, ULнеопознанныйлипид, UPLнеопознанныйфосфолипид,?положительный,-отрицательный, Wслабоположительный, NDнетданных, Штаммы1KMU-14T(Lysobactermarissp.nov.; настоящее исследование), 2LysobacterconcretionisKo07T[3,21], 3LysobacterarsenicirestensZS79T[15], 4Lysobacterdefluvii IMMIBAPB-9T [27], 5LysobacterspongiicolaKMM329T [21], 6LysobacterkorlensisZLD-17T[28], 7LysobacterbugurensisZLD-29T [28], 8LysobacteroryzaeYC6269T [2], 9Lysobacter xinjiangensis RCML-52T [14], 10LysobacterenzymogenesKCTC12131T (данные из этого исследования)

Результаты и обсуждение

Морфологические, физиологические и биохимические

Характеристики

Клетки штамма KMU-14T, выращенные на морском агаре 2216,

были обнаружены как прямые палочки шириной 0,4–0,5 л мин и длиной 1,3–1,5 л мин, лишенные лагеллы или клеточных придатков (Дополнительный рис. 1), и вырабатывают пигмент абрикосового цвета. Скользящая подвижность не наблюдалась с помощью световой микроскопии. Пигменты типа флексирубина не вырабатывались. Штамм показал отчетливые фенотипические, физиологические и биохимические особенности, которые отличали его от близкородственных членов рода Lysobacteria, как показано в Таблице 1.

Филогенетический анализ и ДНК–ДНК гибридизация Тест Почти полные последовательности гена 16SrRNA KMU-14T были определены (GenBank/EMBL/DDBJ номер доступа LC021525). Эволюционное дерево, основанное на методе соседнего присоединения, сгенерировало сравнение последовательностей гена 16S rRNA и показало, что штамм KMU-14T был филогенетически связан с видом Lysobacter, родом, принадлежащим к классу Gammaproteobacteria (рис. 1). Штамм KMU-14T показал наибольшее сходство последовательностей (97,1%) с Lysobacter concretionis Ko07T, за ним следуют L. arseniciresistensZS79T (96,6%) и L. defluviiIMMIBAPB-9T(96,2%).Все остальные валидно названные виды рода Lysobacter были более отдаленными/

Результаты и обсуждение

Морфологические, физиологические и биохимические

Характеристики

Клетки штамма KMU-14T, выращенные на морском агаре 2216,были обнаружены как прямые палочки шириной 0,4–0,5 л мин и длиной 1,3–1,5 л мин, лишенные лагеллы или клеточных придатков(Дополнительный рис. 1), и вырабатывают пигмент абрикосового цвета. Скользящая подвижность не наблюдалась с помощью световоймикроскопии. Пигменты типа флексирубина не вырабатывались.Штамм показал отчетливые фенотипические, физиологические ибиохимические особенности, которые отличали его отблизкородственных членов рода Lysobacteria, как показано

в Таблице 1.

Филогенетический анализ и ДНК–ДНК гибридизацияТестПочти полные последовательности гена 16SrRNA KMU-14Tбыли определены (GenBank/EMBL/DDBJ номер доступаLC021525). Эволюционное дерево, основанное на методе соседнегоприсоединения, сгенерировало сравнение последовательностей гена 16SrRNA и показало, что штамм KMU-14Tбыл филогенетически связан с видом Lysobacter,родом, принадлежащим к классу ammaproteobacteria(рис. 1). Штамм KMU-14T показал наибольшее сходство последовательностей (97,1%) с Lysobacter concretionis Ko07T,за ним следуют L. arseniciresistensZS79T (96,6%) и L.defluviiIMMIBAPB-9T(96,2%).Все остальные валидно названныевиды рода Lysobacter были более отдаленно связаны, показывая сходство генной последовательности 16SrRNAменее 96%.Значение гибридизации ДНК–ДНК между штаммом KMU14T и Lysobacter concretionisKo07Tсоставило 34,8%.Этирезультаты убедительно свидетельствуют о том, что штамм KMU-14T можноклассифицировать как отдельный вид. Хемотаксономические характеристикиПреобладающие клеточные жирные кислоты ([10%) штаммаKMU-14T были изо-C15:0 (13,1%), изо-C16:0 (31%) исуммарный признак 9 (10-метилC16:0 и/или изо-C17:1x9c)(11,7%), как идентифицировано системой MIDI (таблица 2). На основе состава жирных кислот штамм KMU-14Tможно было легко отличить от филогенетическинаиболее близкого таксона Lysobacter concretionis Ko07T (таблица 2).Более того, штамм KMU-14T можно было отличить отдругих членов рода Lysobacter поразномусоотношению C10:03-OH, anteiso-C17:0, суммарного признака8 (C18:1x7c и/или C18:1x6c), и суммарного признака910-метилC16:0 и/или изо-C17:1x9c), что указывает на то, чтоштамм KMU-14T, вероятно, представляет собой независимый вид рода Lysobacter (таблица 2).олярные липиды штамма KMU-14T были определеныкак состоящие из дифосфатидилглицерина, фосфатидилэтаноламина, неопознанного фосфогликолипида,двух неопознанных аминофосфолипидов и двух неопознанныхфосфолипидов (Дополнительный рис. 2). Неидентифицированныекомпоненты отличают штамм KMU-14T от другихвидов рода Lysobacter (таблица 1). Из этихрезультатов предполагается, что штамм KMU-14T представляетнезависимый вид рода Lysobacter, для которогопредложено название Lysobacter maris sp. nov.Описание Lysobacter maris sp. novLysobacter maris (ma’ris. L. gen. n. maris of the sea).Клетки представляют собой прямые палочки шириной 0,4–0,5 мкм и длиной 1,3–1,5 мкм. Клетки лишены жгутиков и неподвижны.Скользящая подвижность не наблюдается. Колонии, выращенные на морскомгаре 2216, имеют круглую форму и окрашены в абрикосовый цвет после 3 днейинкубации при 30 °C. Диапазон температур для роста составляет20–40 °C; оптимальная температура около 30 C, но рост не происходит при 4 или 45 C. Диапазон pH для роста составляет 6–8(оптимум, pH 7), в то время как рост не наблюдался ниже 5 иливыше 9. NaCl требуется для роста и может переноситься при

концентрации до 5 % (м/о), но рост не происходитвыше 6 % (м/о)NaCl. Активность оксидазы отрицательная. Желатини мочевина гидролизуются, но агар, казеин, ДНК, крахмал,тирозин, Твин 20 и Твин 80 — нет. Реакции наo-нитрофенил-b-D-галактопиранозид (ONPG), аргининдигидролазу, орнитиндекарбоксилазу, утилизацию цитрата,тест Фогеса-Проскауэра положительны (API 20E). Кислота образуется из маннозы, N-ацетилглюкозамина, амигдалина, эскулина, цитрата железа, салицина, целлобиозы, L-фукозы и D-арабитола (API 50CH). Присутствуют щелочная фосфатаза, эстераза (C4), кислая фосфатаза, нафтол-AS-BI-фосфогидролаза и a-глюкозидаза (API ZYM). Все отрицательные результатыполосок API 20E, API 50CH и API ZYMуказаны на Дополнительном рис. 3. Основные жирные кислоты([10 %) штамма KMU-14T были идентифицированы как изо-C15:0(13,1 %), изо-C16:0 (31 %) и суммарный признак 9 (10метил C16:0 и/или изо-C17:1 x9c) (11,7 %). Основныеполярные липиды - это дифосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин, неидентифицированный фосфогликолипид, два неидентифицированныхаминофосфолипида и два неидентифицированныхфосфолипида. G?C геномной ДНК штамма типасоставляет 64,9 мол.%.Типовой штамм — KMU-14T (=KCTC 42381T =NBRC110750T), который был выделен из морской воды, собранной вприбрежной зоне острова Йокчи, Кёнсан-Намдо,Республика Корея. Номер доступа GenBank/EMBL/DDBJпоследовательности гена 16S рРНК штамма KMU14T — LC021525