Новый штамм бактерий, обозначенный THG-PC7T, был выделен из почвы залежных сельскохозяйственных угодий вЙонгине, Южная Корея. Клетки штамма THG-PC7T были окрашены по Граму отрицательно, темно-желтыми, аэробными,палочковидными и имели скользящую подвижность. Штамм THG-PC7T оптимально рос при 25–358 °C, при pH 7и в отсутствие NaCl. Сравнительный анализ последовательности генов 16SrRNA выявил штаммTHG-PC7T, принадлежащий к роду Lysobacter, демонстрирующий наибольшее сходство последовательностей сLysobacterximonensis KCTC22336T (98,7%), за которым следует Lysobacterniastensis KACC11588T (95,7%). В тестах ДНК-ДНК-гибридизации ДНК-родственность между штаммом THGPC7T и его ближайшим филогенетическим соседом L.ximonensis была ниже 25%. Содержание ДНКГ+Cнового изолята было определено как 62,5 моль%. Были обнаружены пигменты типа флексирубина. Основные клеточные жирные кислоты были определены как изо-C15:0, изо-C16:0,антеизо-C15:0 и изо-C17:1v9c. Основной дыхательный хинон был идентифицирован как субиквонон8(Q8). Преобладающими полярными липидами были дифосфатидилглицерол, фосфатидилэтаноламин,фосфатидилглицерол и неопознанный аминофосфолипид. На основе результатовДНК–ДНКгибридизация и полифазные данные, штамм THG-PC7T представляет собой новый вид рода Lysobacter, для которого предложено название Lysobacternovalis sp.nov. Типовой штамм THG-PC7T (5KACC18276T5CCTCCAB2014319T)

Род Lysobacter был впервые предложен Кристенсеном и Куком (1978) и классифицирован в составе семейства Xanthomonadaceae. На момент написания статьи, после классификации Lysobacterthermophilus (Yuetal.2013), род Lysobacter включает 26 видов с валидно опубликованными названиями(http://www.bacterio.net/lysobacter.html). Виды рода Lysobacter обычно встречаются в разнообразных экологических средах обитания, особенно в почве (Liuetal., 2011; Srinivasan et al., 2010; Tenet al., 2009), и тесно связаны с представителями родов Xanthomonas, Pseudoxanthomonas, Stenotrophomonas, Thermomonas, Vulcaniibacterium и Xylella. Представители рода являются грамотрицательными, палочковидными, имеют высокое содержание G+C (61,7–70,7 моль%) и содержат убихинон 8 (Q-8) в качестве основного дыхательного хинона (Christensen & Cook, 1978; Wei et al., 2012; Weon et al., 2006). Сообщается, что у представителей рода отсутствуют жгутики (Lee et al., 2006; Wei et al., 2012), за исключением Lysobacter spongiicola (Romanenkoet al., 2008), Lysobacter arseniciresistens (Luoetal., 2012) и Lysobacter mobilis (Yangetal., 2015). Обычно виды рода Lysobacter имеют преобладание изоразветвленных жирных кислот, а также дифосфатидилглицерина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилглицерина в качестве основныхполярных липидов (Luoetal., 2012; Parketal. 2008; Romanenkoet al., 2008; Wang et al., 2011; Zhang et al., 2011). Всевиды рода Lysobacter с валидно опубликованными названиями показывают отрицательные результаты по активности уреазы ипродукции индола (Tenet al., 2009; Zhanget al., 2011). В этом исследовании мы сообщаем о характеристике нового штамма THG-PC7T с использованием полифазного подхода. На основании результатов мы предлагаем, чтобы он был помещен в род Lysobacter и назван Lysobacter novalissp.nov., с THG-PC7T в качестве типового штамма этого нового вида.

Штамм THG-PC7T был выделен из паровой почвы сельскохозяйственных угодий в Йонгине, Южная Корея, методом посева методом серийных разведений на агаре Ризонера 2A (R2A, Difco). Почву (1 г) суспендировали в 10 мл стерильного 0,85 % NaCl (м/о). Серийные разведения готовили до 1024 с использованием раствора NaCl. Затем 100 мл каждого разбавленного образца высевали на агар R2A пять раз. Чашки инкубировали при 28 8C в течение 7 дней. Отдельные колонии очищали путем переноса на новые чашки с агаром R2A. Один изолят, THG-PC7T, был выбран для дальнейшего изучения. Изолят был рутинно культивирован на агаре R2A при 28 8C и сохранен в виде суспензии в бульоне R2A (R2B; Difco) с глицерином (25 %, вес/объем) при 280 8C. Штамм THG-PC7T был депонирован в Корейской коллекции сельскохозяйственных культур (KACC 18276T) и Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC AB 2014319T). Для сравнительного исследования референтные штаммы Lysobacter ximonensis KCTC 22336T, Lysobacter niastensis KACC 11588T и Lysobacter enzymogenes KACC 10127T (типовой вид рода) были получены из Корейской коллекции типовых культур и Корейской коллекции сельскохозяйственных культур соответственно. Эти штаммы были культивированы в оптимальных условиях для штамма THG-PC7T. Геномная ДНК штамма THG-PC7T была извлечена и очищена с использованием коммерческого набора для выделения геномной ДНК (Solgent). Ген 16S рРНК был амплифицирован с помощью универсальной бактериальной пары праймеров 27F и 1492R (Weisburg et al., 1991), а очищенные продукты ПЦР были секвенированы Solgent. Идентификация филогенетических соседей была выполнена с использованием сервера EzTaxon-e (Kim et al., 2012). Программное обеспечение Seq-Man версии 4.1 (DNASTAR) было использовано для компиляции почти полной (1453 п.н.) последовательности гена 16S рРНК штамма THG-PC7T. Множественные выравнивания были выполнены с использованием программы CLUSTAL X (Thompson et al., 1997), а пробелы были отредактированы с использованием программы BioEdit (Hall, 1999). Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием двухпараметрической модели Кимуры (Kimura, 1983). Филогенетические деревья (рис. 1 и рис. S1, доступные в онлайн-дополнительных материалах) были реконструированы в соответствии с методами присоединения соседей (Saitou & Nei, 1987), максимальной экономии (Fitch, 1971) и максимального правдоподобия (Felsenstein, 1981) с использованием MEGA версии 6 (Tamura et al., 2013). Для оценки филогенетических деревьев были проведены бутстреп-анализы с 1000 повторений образцов.

Последовательность гена 16S рРНК нового штамма, определенная в этом исследовании, представляла собой непрерывный участок длиной 1453 п.н. Согласно серверу EzTaxon-e, штамм THG-PC7T имел наибольшее сходство последовательностей с L. ximonensis KCTC 22336T (98,7 %), за ним следовал L. niastensis KACC 11588T (95,7 %). Кроме того, они также показали низкое сходство последовательностей (,96 %) с другими видами семейства Xanthomonada

ceae. Филогенетическое дерево показало, что штамм THG-PC7T кластеризован в пределах рода Lysobacter. Штамм THG-PC7T был расположен в кладе с L. ximonensis KCTC 22336T. Эта клада также была восстановлена ​​в деревьях, сгенерированных алгоритмами максимальной экономии и максимального правдоподобия с высокими значениями бутстрепа. Эти результаты показывают, что штамм THG-PC7T четко сгруппирован в пределах рода Lysobacter.

После культивирования в течение 2 дней на R2A при 28 8C была исследована морфология клеток нового штамма. Взвешенные клетки помещали на никелевые сетки, покрытые углеродом и формваром, на 30 с, и сетки плавали на одной капле 0,1% (w/v) водного раствора уранилацетата, промокали досуха и затем просматривали (11 0006) с помощью просвечивающего электронного микроскопа (JEM1010; JEOL) в стандартных рабочих условиях (рис. S2). Окрашивание по Граму определяли с помощью набора для окрашивания по Граму (bioMe´rieux) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки выращивали в бульоне R2A в течение 24 ч при 28 8C, а затем тестировали на скользящую подвижность методом висячей капли (Skerman, 1967). Рост при различных температурах (4, 10, 15, 18, 25, 28, 30, 35, 37, 40 и 42 8C) оценивали после 7 дней инкубации на агаре R2A. Рост в различных средах, таких как питательный агар (NA; Difco), триптон-соевый агар (TSA, Oxoid), агар Лурия-Бертани (LB; Oxoid), агар R2A, морской агар (MB; Difco) и агар Макконки (Oxoid), тестировали при 28 8C в течение 7 дней. Рост при различных условиях pH (pH 4,0–10,0, с интервалом в 0,5 единицы pH) определяли после 4 дней инкубации при 28 8C в бульоне R2A. Для корректировки значений pH использовались следующие буферы: лимонная кислота/цитрат натрия (pH 4,0–6,0), Na2HPO4/NaH2PO4 (pH 6,0–8,0), Na2CO3/NaHCO3 (pH 8,0–10,0) и Na2HPO4/NaOH (pH 10,0) (Gomori, 1955). pH среды подтверждался после автоклавирования. Устойчивость к солености оценивалась в бульоне R2A, дополненном 0–5,0 % (w/v) NaCl (с интервалами 0,5 %) после 4 дней инкубации при 28 8C. Условия роста, такие как pH и соленость, оценивались путем мониторинга оптической плотности при 600 нм. Анаэробный рост был протестирован в бутылочках с сывороткой, содержащих бульон R2A с добавлением тиогликолята (0,1 %, вес/объем), в котором воздух был заменен газом N2. Производство пигментов типа флексирубина определялось по обратимому изменению цвета на красный, фиолетовый или коричневый, когда желтые или оранжевые колонии были покрыты водным раствором КОН (20 % вес/объем) (Fautz & Reichenbach, 1980).

Активность каталазы определялась по образованию пузырьков из 3 % (об./об.) раствора H2O2, смешанного со свежевыращенными клетками. Активность оксидазы проверялась с использованием 1 % (м/о) реагента N,N,N,N-тетраметил-пфенилендиамина (Sigma) в соответствии с инструкциями производителя. Восстановление нитрата проверялось в нитратном бульоне, содержащем 0,2 % (м/о) KNO3 (Skerman, 1967). Продукция индола анализировалась с использованием реагента Ковача в 1 % триптоновом бульоне (Skerman, 1967). Активность уреазы оценивалась в среде Кристенсена (Christensen, 1946). Гидролиз следующих субстратов был протестирован с использованием агара R2A в базальной среде и был оценен после 4 дней инкубации при 28 8C: казеин [2 % (w/v) обезжиренное молоко, Oxoid], 1 % (w/v) крахмал (Difco), 0,1 % (w/v) эскулин [0,02 % (w/v) цитрат железа, Difco], Твин 80 [0,01 % (w/v) CaCl2.2H2O] и 1 % (v/v) Твин 80,

(Sigma), Твин 20 [0,01 % (w/v) CaCl2.2H2O и 1 % (v/v) Твин 20 (Sigma), 1 % (w/v) хитин (Sigma), 0,5 % (w/v) L-тирозин (Sigma), 12 % (w/v) желатин (Sigma), 0,1 % (w/v) карбоксиметилцеллюлоза (CMC,Sigma) и ДНК [Агар ДНКазы (Scharlau) Активность ДНКазы выявлялась путем затопления пластин 1M HCl]. Ассимиляция источников углерода и активность ферментов определялись с использованием коммерческих наборов в соответствии с инструкциями производителя. Дифференциальные фенотипические характеристики штамма THG-PC7T и его ближайших соседей показаны в Таблице 1.

Для анализа жирных кислот штаммы культивировали на агаре R2A при 28 8C в течение 48 ч. Использовались клетки в экспоненциальной фазе роста. Жирные кислоты были извлечены, метилированы и омылены, как описано в системе идентификации микроорганизмов Sherlock (MIDI), и были проанализированы с помощью капиллярной ГХ (Hewlet Packard 6890) с использованием пакета программного обеспечения Microbial Identification с системой Sherlock MIDI 6.1 и базой данных аэробных бактерий Sherlock (TSBA 6.1, Sasser 1990) (таблица 2). Для анализа хинона и полярных липидов использовались лиофилизированные клетки штамма THG-PC7T и L. ximonensis KCTC22336T. Дыхательные хиноны были извлечены из 300 мг лиофилизированных клеток с помощью хлороформа/метанола (2 : 1, об./об.), разделены с помощью гексана и элюированы гексаном/диэтиловым эфиром (90 : 10, об./об.), затем элюент выпаривался с помощью роторного испарителя и растворялся в ацетоне в соответствии с методом Коллинза (1985). Очистка убихинона была определена с помощью обращенно-фазовой системы ВЭЖХ (система Alliance 2690, Waters) [длина волны 270 нм; растворитель, MeOH/2-пропанол (7 : 5, об./об.); скорость потока, 1,0 мл мин21]. Полярные липиды штамма THG-PC7T и эталонного штамма L. ximonensis KCTC 22336T были извлечены и проанализированы с помощью двумерной ТСХ (рис. S3). Отдельно каждый образец наносили на угол двумерного тонкослойного хроматографа с использованием пластин TLC Kiesel gel 60 F254 (10610 см, Merck) и проявляли в первом измерении смесью хлороформ/метанол/вода (65 : 25 : 4, по объему), а во втором измерении — смесью хлороформ/уксусная кислота/метанол/вода (80 : 15 : 12 : 4, по объему). Пластины TLC опрыскивали следующими реагентами: 5% (об./об.) молибдатнофосфорной кислоты (для тотальных липидов, Sigma), 0,2% (м/о) нингидрина (для аминолипидов, Sigma) и 2,5% (об./об.) α-нафтол-серной кислоты (для гликолипидов, Sigma). Распыление сопровождалось нагреванием при 1208C в течение 10 мин. Пластины ТСХ также распылялисьреагентом молибденовый синий (Sigma) для обнаружения фосфолипидов. Для этого реагента не требовалось нагревания (Minnikinetal., 1984). Для определения содержания ДНК+С геномная ДНК была извлечена, очищена методом Мура и Доуэна(1995) и ферментативно разложена на нуклеозиды (нуклеазаP1 и щелочная фосфатаза; Sigma). Полученная смесь нуклеозидов была разделена с использованием системыобращенно-фазовой ВЭЖХ (система Alliance 2690, Waters), как описано ранее (Mesbahetal., 1989) с колонкойобращенно-фазовойSunFireTMC18 (4,66250 мм65 мм), при скорости потока1,0 мл/мин21 и смеси растворителей 200 мМ(NH4)H2PO4/ацетонитрил (97:3, об./об.) в качестве подвижной фазы,и детектированием при длине волны 270 нм. ГеномнаяДНК штамма Escherichia coli B (Sigma-Aldrich D4889)использовалась в качестве стандарта.Гибридизация ДНК–ДНК проводилась флуориметрически, в соответствии с методом, разработанным Ezaki et al.(1989) с модификациями (Stabili et al., 2008), с использованием ДНК-зондов, меченых фотобиотином, и лунок для микроразведения.Эксперименты по гибридизации ДНК–ДНК проводились дляштамма THG-PC7T и его близкородственного референтного штаммаL. ximonensis KCTC 22336T. Оптимальная температура ренатурации (43 8C) была рассчитана как [(0,51x G+Ccontent)+47]– 36 (Gillis et al., 1970), где 368C — поправка на присутствие 50 % формамида (McConaughyet al., 1969). Гибридизация была проведена с пятью повторениями для каждого образца. Самые высокие и самые низкие значения,полученные для каждого образца, были исключены, а средние значенияостальных трех значений были преобразованы в процентныезначения родства ДНК–ДНК.Содержание ДНК+C штамма THG-PC7T составило 62,5 мол.%.Значение родства ДНК–ДНК между штаммом THG-PC7Tи L. ximonensis KCTC 22336T составило 22,5¡0,5 % соответственно. Значения ДНК-ДНК-родственности были значительно ниже порогового значения 70 %, рекомендуемого для распознавания отдельных видов (Wayne et al., 1987).а основании результатов ДНК-ДНК-родственностиочевидно, что новый штамм должен принадлежать к родуLysobacter.Описание Lysobacter novalis sp. nov.Lysobacternovalis (no.va’lis. L. gen. n. novalis из залежи)Клетки по Граму отрицательные, аэробные, скользящие и палочковидные. Размер клеток составляет приблизительно 1,0–1,5 мм в длину|0,50,8 мм в ширину. Колонии на агаре R2A желтые, круглые,гладкие, выпуклые и имеют диаметр 1–2 мм. Клетки растутпри 18–37 uC (оптимум 25–35 uC), при pH 6,0–7,5 (оптимумpH7,0) и при 0–1,0 % (w/v) NaCl (оптимум 0 % NaCl).Каталаза-положительные и оксидаза-отрицательные. Присутствуют пигменты типа флексирубина. Рост происходит на R2A, TSA и NA,но не на LB, MA и агаре Макконки. Положительны длягидролиза Твина 20, Твина 80, L-тирозина, казеина иКМЦ, но отрицательны для гидролиза крахмала, хитина, ДНК,мочевины, желатина и эскулина. Тесты на восстановление нитрата ивыработку индола отрицательны. Следующие соединенияиспользуются в качестве единственного источника углерода: D-глюкоза, D-манноза,N-ацетилглюкозамин и мальтоза; но не L-арабиноза,D-маннит, глюконат, капрат, адипат, малат, цитрати фенилацетат. Отрицательно для подкисления глюкозыи ферментации гидролиза аргинина. Положительно дляследующих ферментативных активностей: щелочная фосфатаза, эстераза,эстераза липаза, липаза, лейцинариламидаза, валинариламидаза,цистинариламидаза, трипсин, a-химотрипсин, кислая фосфатаза, нафтол-AS-BI-фосфогидролаза, b-галактозидаза,a-глюкозидаза и N-ацетил-b-глюкозаминидаза. Отрицательнодля следующих ферментных активностей: a-галактозидаза, bглюкуронидаза, b-глюкозидаза, a-маннозидаза и aфукозидаза. Основным изопреноидным хиноном является убихинон-8.Преобладающими полярными липидами являются дифосфатидилглицерин,фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин инеопознанный аминофосфолипид. Основными клеточными жирнымикислотами (w10 %) являются изо-C15:0, изо-C16:0, антеизо-C15 : 0 иизо-C17 : 1v9c.Типовой штамм THG-PC7T (5KACC 18276T5CCTCC AB2014319T) был выделен из залежной почвы сельскохозяйственных угодий вЙонгине, Южная Корея. Содержание ДНК G+C в штамме типа составляет 62,5 моль%

