Аннотация Из выделений мейбомиевых желез человека был выделен штамм (83-4T), имеющий форму палочки, окрашенный по Граму, каталазо- и оксидазоположительный, который образовывал желтые колонии. Согласно филогенетическому анализу, основанному на последовательностях генов 16S рРНК, штамм 83-4T относится к роду Lysobacter. Содержание ДНК G?C составило 67,1 мол.%. Кольцевой геном составил 2,6 Мб, в котором содержалось 2431 последовательность кодирования РНК, 75 псевдогенов, 46 тРНК, 3 рРНК и 4 некодируемых РНК. В эту работу в равной степени внесли вклад кластер бактериоцина и арил. Hua Bai и Huibin Lv. Регистрационный номер последовательности гена 16S рРНК штамма 83-4T в GenBank/EMBL/DDBJ — MG822667. Номер доступа GenBank для последовательности всего генома штамма 83-4T — CP029556. В геноме также были обнаружены полиеновые кластеры. Среднее значение идентичности нуклеотидов составило 79,6% между изолятом 83-4T и близкородственным типовым штаммом Lysobacter tolerans UM1T. Оценочное значение гибридизации ДНК-ДНК между штаммом 83-4T и L. tolerans UM1T составило 41,6%. Дифосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерин были основными полярными липидами. Iso-C15:0, soC11:0 3-OH, iso-C11:0 и суммарный признак 9 (isoC17:1x9c) были основными жирными кислотами. Убихинон (Q8) был единственным дыхательным хиноном. Таким образом, на основании данных филогенетического анализа, хемотаксономического и биохимического анализов сделан вывод, что штамм 83-4T представляет собой новый вид рода Lysobacter с названием Lysobacter oculi sp. nov. Типовой штамм - 83-4T (= CGMCC 1.13464T= NRBC113451T)

Род Lysobacter, принадлежащий к семейству Lysobacteraceae в пределах порядка Lysobacterales гаммапротеобактерий, был впервые предложен Кристенсеном и Куком (1978). В настоящее время род содержит 48 видов с валидно опубликованными названиями (http://www.bacterio.net/lysobacter.html). Виды рода были выделены из различных источников окружающей среды, включая почву, ил и водные среды обитания. Типичные хемотаксономические особенности рода Lysobacter включают: Q-8 как основной дыхательный хинон; изоразветвленные жирные кислоты являются основными жирными кислотами; дифосфатидилглицерин (DPG), фосфатидилэтаноламин (PE) и фосфатидилглицерин (PG) в качестве основных полярных липидов и высокое содержание G?C в диапазоне от 61,7 до 70,7 моль% (Christensen и Cook 1978; Luo и др. 2012; Weon и др. 2006). Представители рода Lysobacter могут быть использованы в качестве агентов биологического контроля из-за их способности лизировать различные микроорганизмы (Ahmed и др. 2003; Christensen и Cook 1978; Hashizume и др. 2004; Ryazanova и др. 2005), что указывает на важность выделения новых изолятов для будущих сельскохозяйственных применений. В этом исследовании мы охарактеризовали новую бактерию рода Lysobacter, обозначенную 83-4T, которая была выделена из секрета мейбомиевых желез во время исследования состава глазного микробиома у пациентов с дисфункцией мейбомиевых желез.

Материалы и методы

Это исследование было одобрено Комитетом по исследованиям на людях и этике Третьей больницы Пекинского университета под номером D2018086. От каждого участника было получено подписанное информированное согласие

Изоляция штаммов и культивирование штаммов

Офтальмолог собирал секрет мейбомиевых желез стерильными транспортными тампонами в стерильной среде. Стерильные тампоны, которые каждый раз подвергались воздействию воздуха операционной в течение 10 с, использовались в качестве пустых контролей. Образцы высевали на пластину с кровяным агаром (10 г/л триптона, 3 г/л говяжьего порошка, 5 г/л NaCl, 50 мл/л дефибринированной овечьей крови и 15 г/л агара) при температуре 37 °C в течение 72 ч. После инкубации выделяли и очищали колонию желтого цвета. Очищенный штамм выращивали на среде триптического соевого бульона (TSB) и поддерживали в виде клеточных суспензий в 20% глицерине (об./об.) при -80 °C.

Условия роста, фенотипический, биохимический анализ и анализ устойчивости к антибиотикам Для определения температурного диапазона роста штамм 83-4T и референтный штамм L. tolerans UM1T (Margesin et al. 2018) (полученный из Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ) культивировали на триптическом соевом агаре (TSA) и

поддерживали при 4, 15, 20, 30, 37, 42 и 45 °C в течение 48 часов.Рост при pH 4–12 (с интервалом в 1 единицу pH) оценивали с использованием соответствующих буферов. Буфер 0,1 М лимонной кислоты/0,1 М цитрата натрия использовался для pH 4,0–5,0; буфер 0,1 М KH2PO4/0,1 М NaOH использовался для pH 6,0–8,0; буфер 0,1 М NaHCO3/0,1 М Na2CO3 использовался для pH 9,0–10,0; буфер 0,05 М Na2HPO4/0,1 М NaOH использовался для pH 11,0 и буфер 0,2 MKCl/0,2 М NaOH использовался для pH 12,0. Устойчивость к NaCl определялась путем выращивания штамма 83-4T и L. tolerans UM1T на TSA в течение 48 ч при различных концентрациях NaCl (0–10%, с интервалом 0,5%). Для определения активности оксидазы использовали 1% (w/v) N,N,N9,N9,-тетраметил 1,4фенилендиаминовый реагент (bioMe´rieux). Активность каталазы проверяли по образованию пузырьков после нанесения 3% (v/v) раствора перекиси водорода. Другие физиологические и биохимические свойства исследовали с помощью наборов API (система API 20NE и API ZYM) в соответствии с инструкциями производителя (bioMe´rieux). Морфологическое исследование бактериальных клеток проводили с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400, а окрашивание по Граму проводили, как описано Magee et al. (1975). Тесты на чувствительность к антибиотикам определяли методом диффузии в агар (Bauer et al. 1966) с использованием дисков из фильтровальной бумаги (диаметром 5 мм) на TSA с различным количеством антибиотиков. Тестируемыми антибиотиками были ампициллин (100 мг/л), спектиномицин(100 мг/л), стрептомицин (10 мг/л), тетрациклин (10 мг/л), гентамицин (50 мг/л), эритромицин (20 мг/л), канамицин (50 мг/л) и хлорамфеникол (34 мг/л)

Анализ хемотаксономических характеристик Для анализа метиловых эфиров жирных кислот и хинонов штамм 83-4T и близкородственный типовой штамм L. tolerans UM1T культивировали на TSA при 30 °C в течение 36 ч. Метиловые эфиры жирных кислот анализировали с использованием стандартной (MIDI) системы идентификации микроорганизмов Sherlock (версия 6.0), а пики идентифицировали на системе Agilent 6890 NNetworkGC с использованием таблицы наименований пиков TSBA6. Хиноны экстрагировали и очищали из 200 мг сухой клеточной массы по методу Коллинза (1985) и анализировали с помощью ВЭЖХ (Wu et al. 1989). Полярные липиды экстрагировали с использованием системы хлороформ/метанол, описанной Минникиным и др. (1984). Для идентификации полярных липидов использовали двумерную тонкослойную хроматографию (ТСХ). ТСХ проводили на тонкослойных пластинах Merck Silica gel 60 F254 с алюминиевой подложкой, используя хлороформ/метанол/воду (65:25:4, об./об.) для первого измерения и хлороформ/метанол/уксусную кислоту/воду (80:12:15:4, об./об.) для второго измерения. Идентификацию отдельных липидных пятен проводили путем распыления 5% молибдофосфорной кислоты с последующим нагреванием при 100 C в течение 5–8 мин.

Последовательность и анализ 16S рРНК Ген 16S рРНК амплифицировали с помощью ПЦР колоний с универсальными праймерами 27F (50-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-30) и 1492R (50-GGTTACC TTGTTACGACTT-30). Продукты ПЦР клонировали в вектор pMD19-T и секвенировали в Пекинском институте геномики (BGI, Пекин, Китай). Сходства последовательностей генов 16S рРНК анализировались с использованием программы BLASTN (Altschul et al. 1990) и сервера EzBioCloud (Yoon et al. 2017a). Для филогенетического анализа последовательность 16S рРНК штамма 83-4T была выровнена с последовательностями близкородственных таксонов с использованием CLUSTAL\_W (Thompson et al. 1994). Для реконструкции филогенетического дерева с использованием MEGA версии 7.0 были выбраны три метода, включая метод присоединения соседей (Saitou and Nei 1987), метод максимального правдоподобия (Felsenstein 1981) и метод максимальной экономии (Fitch 1971) (Kumar et al. 2016). Дерево максимального правдоподобия было рассчитано с использованием 2-параметрической модели Кимуры (K2 ? G ? I) (Kimura 1980). Эволюционные расстояния в дереве соседей-соединений были рассчитаны с использованием 2-параметрической модели Кимуры (Kimura 1980). Топология дерева была оценена с помощью 1000 бутстреп-репликаций (Felsenstein 1985).

Секвенирование и анализ генома Штамм 83-4T культивировали в триптическом соевом бульоне при 30 °C в течение 36 часов. Анализ секвенирования всего генома был

выполнен GENEWIZ. Геномную ДНК извлекали с помощью набора TIANamp Genomic DNA Kit (TIANGEN). Набор Qubit dsDNA HSAssay Kit и Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) использовали для оценки концентрации ДНК в растворе. Для сборки всего генома геномная ДНК была случайным образом фрагментирована до \* 10 Кб с помощью ультразвука

(Covaris g-TUBE) с последующей подготовкой шаблонов SMRTbell с помощью набора DNA Template Prep Kit. Секвенирование отдельных молекул в реальном времени (SMRT) было выполнено на платформе PacBio Sequal. Кроме того, библиотеки секвенирования следующего поколения были созданы в соответствии с протоколом производителя (VAHTS Universal DNA Library Prep Kit for Illumina) и секвенированы на платформе Illumina HiSeq. Полные данные о последовательности генома были размещены в GenBank/EMBL/DDBJ. Среднее значение нуклеотидной идентичности (ANI) между штаммом 83-4T и

L. tolerans UM1T было рассчитано с помощью калькулятора ANI

(https://www.ezbiocloud.net/tools/ani) (Yoon et al. 2017b). Оценочное значение гибридизации ДНК–ДНК (DDH) было рассчитано с помощью Genome-to-GenomeDistanceCalculator 2.1, доступного на сервере DSMZ (http://ggdc.dsmz.de/distcalc2. php) (Meier-Kolthoff et al. 2013). Последовательность генома L. tolerans UM1T (регистрационный номер: GCF\_900155935.1) была получена из базы данных NCBI. Содержание ДНК G?C штамма 83-4T было определено в соответствии с геномной последовательностью ДНК.

Результаты и обсуждение

Согласно анализу сервера EzBioCloud, последовательность гена 16S рРНК штамма 83-4T показала максимальное сходство 97,4% с таковой Lysobacter tolerans UM1T. Кроме того, ген 16S рРНК штамма 83-4T разделял 95,8–96,6% сходства с несколькими типовыми штаммами в роде Luteimonas. Среди этого рода близкородственный Luteimonas rhizosphaerae разделял 96,6% сходства со штаммом 83-4T. Отношения между 83-4T и представителями рода Lysobacter и Luteimonas были подтверждены топологией филогенетических деревьев. Филогенетическое дерево проиллюстрировало, что штамм 83-4T тесно связан с L. tolerans UM1T (рис. 1, дополнительные рисунки S1 и S2). Филогенетический анализ показал, что штамм 83-4T группируется в пределах рода Lysobacter.

Как показано в Таблице 2, преобладающими клеточными жирными кислотами штамма 83-4T были изо-C15:0 (22,4%), изо-C11:0 3-OH (15,1%), изо-C11:0 (11,5%) и суммарный признак 9 (изо-C17:1x9c; 27,6%), в то время как у L. tolerans UM1T были изо-C17:0 (28,5%), C11:0 2-OH (12,2%), изо-C16:0 (7,5%) и суммарный признак 9 (изо-C17:1x9c; 43,2%). Убихинон-8 был единственным хиноном, обнаруженным в штамме 83-4T и L. tolerans UM1T. Основными полярными липидами, присутствующими в штамме 83-4T, были DPG, PG и PE (Дополнительный рис. S4). Хемотаксономические особенности штамма 83-4T, включая присутствие Q-8 в качестве хинона, DPG, PG и PE в качестве основных полярных липидов и изо-C15:0, изо-C11:0 3-OH, изо-C11:0 и изо-C17:1x9c в качестве основных клеточных жирных кислот, которые согласуются с характеристиками рода Lysobacter (Christensen и Cook 1978; Luo и др. 2012; Weon и др. 2006). Помимо постоянных характеристик с L. tolerans UM1T, таких как температурный диапазон и толерантность к NaCl для роста, цвет колонии, активность оксидазы и каталазы, существуют также различные характеристики между 83-4T и родственным штаммом типа L. tolerans UM1T. Например, диапазон pH для роста штамма 83-4T был низким по сравнению с L. tolerans UM1T. Штамм 83-4T оказался отрицательным в ферментном анализе на трипсин иположительным в ферментном анализе на кислую фосфатазу. Штамм L. tolerans UM1T, напротив, оказался положительным в анализе на трипсин и слабоположительным в анализе на кислую фосфатазу. Штамм 83-4T был устойчив к хлорамфениколу, тогда как L. tolerans UM1T был чувствителен к хлорамфениколу. Штамм 83-4T мог гидролизовать желатин в отличие от штамма L. tolerans UM1T. Размер клеток предлагаемого нового штамма(2,7 × 1,3 мкм) был намного больше, чем у типового штамма (1,1 × 0,4 мкм) (таблица 1). Штамм 83-4T и L толерантный UM1T имели значение ДНК-родственности41,6%, что четко отличает их от разных видов.Кроме того, основные клеточные жирные кислоты штамма83-4T отличались от жирных кислот референтного штамма(Таблица 2).На основании отдельных биохимических, физиологических и хемотаксономических анализов штамм 83-4Tследует классифицировать как новый вид Lysobacter,здесь обозначенный как Lysobacteroculisp.nov.

Описание Lysobacteroculisp.nov.Lysobacteroculi(o’cu.li.L.gen.n.oculi,oftheeye). Грам-отрицательная, неподвижная, палочковидная бактерия с размером клеток 2,791,3 мкм. Колонии круглые, гладкие и желтые. Рост наблюдается при 15–37 °C (оптимум 30 °C), при pH 6–9 (оптимум pH 7) и в присутствии 0–2% NaCl. Оксидаза и каталаза положительные. Клетки способны гидролизовать желатин, но не эскулин и мочевину. Тесты на восстановление нитрата, ферментацию глюкозы и продукцию индола отрицательные. Основные полярные липиды — DPG, PG и PE. Преобладающие жирные кислоты - изо-C15:0, изо-C11:03-OH, изо-C11:0 и суммарный признак 9. Содержание G?Cтипового штамма составляет 67,1 моль%, а размер полного генома типового штамма составляет 2,6 Мб. Убихинон (Q-8) был идентифицирован как единственный дыхательный хинон. Номер доступа в GenBank для гена 16SrRNA и последовательности генома штамма 83-4T - MG822667 и CP029556 соответственно. Типовой штамм - 83-4T (= CGMCC 1.13464T = NRBC 113451T), выделенный из секретов мейбомиевых желез человека в Третьей больнице Пекинского университета в Пекине, Китай



