

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

***ANCYLOBACTER LACUS* SP. NOV.
И *ANCYLOBACTER PLANTIPHILUS* SP. NOV. – НОВЫЕ АЭРОБНЫЕ
ФАКУЛЬТАТИВНО-МЕТИЛОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ**

© 2020 г. А. А. Чемодурова^а, Е. Н. Капарулина^а,
А. В. Мачулин^а, К. Шпроер^б, Э. Ланг^б, Н. В. Доронина^{а, *}
^аФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, Пушкино, 142290 Россия

^бLeibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, 38124 Germany

*e-mail: doronina@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 03.06.2019 г.

После доработки 02.07.2019 г.

Принята к публикации 25.09.2019 г.

Новые аэробные факультативно-метилотрофные бактерии выделены из воды пресного озера (штамм F30L^T), ризосферных почв клевера белого *Trifolium repens* L. (штамм 1TC^T) и моркови дикой *Daucus carota* L. (штамм Dau2). Изоляты представлены грамотрицательными аспорогенными неподвижными плеоморфными/палочковидными клетками, размножающимися бинарным делением, являются факультативными метилотрофами, поскольку наряду с метанолом используют широкий спектр полиуглеродных соединений. Оптимально растут при 25–29°C, pH 7.0–7.5, 0.5% (об./об.) CH₃OH, 0.05% (в./об.) NaCl. Штаммы реализуют рибулозобисфосфатный путь C₁-метаболизма. Доминирующими фосфолипидами являются фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилглицерин и дифосфатидилглицерин. В жирнокислотном составе клеток преобладают C_{18:1} ω7c, C_{19:0} ω8c суцло, C_{16:0} и C_{18:0} кислоты. Основной убихинон Q-10. На основании секвенирования генов 16S рРНК штамм F30L^T имеет наибольший уровень сходства с *Ancylobacter dichloromethanicus* DM16^T (97.8%), тогда как штаммы 1TC^T и Dau2 близки *A. oerskovii* DSM 18746^T (98.6%). Сходство нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК между штаммами 1TC^T и Dau2 составило 99.4%. ДНК–ДНК гибридизация штамма F30L^T с *A. dichloromethanicus* DM16^T выявила только 22% гомологии, штамма 1TC^T с *A. oerskovii* DSM 18746^T 27%, тогда как штаммы 1TC^T и Dau2 между собой имели 77% гомологии. Основываясь на полученных данных, штамм F30L^T идентифицирован как новый вид рода *Ancylobacter* – *Ancylobacter lacus* sp. nov. (VKM B-3280^T = DSM 106439^T). Штаммы 1TC^T и Dau2 (=VKM B-3227 = CCUG71988) отнесены к новому виду *Ancylobacter plantiphilus* sp. nov. с типовым штаммом 1TC^T (=VKM B-3219^T = DSM 106438^T).

Ключевые слова: *Ancylobacter lacus* sp. nov., *Ancylobacter plantiphilus* sp. nov., метилотрофные бактерии, новые виды

DOI: 10.31857/S002636562001005X

Аэробные метилотрофные бактерии (метилотрофы) используют метанол, метиламин и другие окисленные и замещенные производные метана, но не метан, в качестве источников углерода и энергии. В настоящее время описано более 50 родов метилотрофов, относящихся к *Alpha*-, *Beta*- и *Gamma*proteobacteria, *Verrucomicrobia*, *Firmibacteria*, *Actinobacteria* и *Flavobacteria* (Троценко и соавт., 2010). Помимо таксономического разнообразия они проявляют паразитическое экофизиологическое и цитобиохимическое разнообразие.

Из воды пресного озера г. Пушкино (Московская область, Россия), ризосферных почв клевера

белого (*Trifolium repens* L.) г. Москва (Россия) и моркови дикой (*Daucus carota* L.) г. Пушкино (Московская область, Россия) нами на среде с метанолом выделены новые факультативно-метилотрофные штаммы – F30L^T, 1TC^T и Dau2 соответственно. Секвенирование генов 16S рРНК выявило принадлежность новых изолятов к роду *Ancylobacter*.

Род *Ancylobacter* входит в семейство *Xanthobacteraceae*, пор. *Rhizobiales*, кл. *Alphaproteobacteria*. Представители рода *Ancylobacter* – факультативно-метилотрофные аэробные бактерии, представлены плеоморфными/палочковидными или

бобовидными клетками с грамтрицательным типом клеточной стенки. В настоящее время род включает 9 валидно описанных видов, согласно LPSN (www.bacterio.net): *Ancylobacter aquaticus* (Ørskov, 1928; Raj, 1983), *A. rudongensis* (Xin et al., 2004), *A. polymorphus* (Xin et al., 2006), *A. vacuolatus* (Xin et al., 2006), *A. oerskovii* (Lang et al., 2008), *A. dichloromethanicus* (Firsova et al., 2009), *A. defluvii* (Poroshina et al., 2013), *A. sonchi* (Agafonova et al., 2017) и *A. pratensis* (Suarez et al., 2017). Представители этих видов были выделены из различных источников, таких как водная среда, донные осадки, почва, ризосфера растений.

Цель данной работы – физиолого-биохимическая и таксономическая характеристика новых изолятов F30L^T, 1ТС^T и Dau2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования и условия культивирования. Штамм F30L выделен из воды небольшого пресного озера г. Пушкино, Московская область, Россия (54°49'13.8" с.ш., 37°34'42.5" в.д.). Штамм 1ТС^T выделен из ризосферной почвы клевера белого (*Trifolium repens* L.) г. Москва, Россия, а штамм Dau2 выделен из ризосферной почвы моркови дикой (*Daucus carota*) г. Пушкино, Московская область (Россия). Образцы проб природной воды, ризосферных почв помещали в колбы Эрленмейера (750 мл) с 200 мл среды “К” и 0.5% (об./об.) метанола. Среда “К” содержала (г/л): KH_2PO_4 – 2.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2.0; NaCl – 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.002; pH 7.4. После трех пассажей в течение 2 сут на качалке (180 об./мин) при 29°C суспензию накопительных культур мезофильных высеивали истощающим посевом на агаризованную (“Difco”, США, 2%) среду “К” с метанолом. Реизолированные колонии пересеивали на скошенный агар. Чистоту выделенных культур контролировали световой и электронной микроскопией, а также по однородности колоний на агаризованной среде с метанолом и R2A.

Изучение культуральных и физиолого-биохимических свойств изолятов. При описании колоний, изучении морфологии и подвижности клеток исследуемые штаммы выращивали на агаризованной среде “К”. Образование индола из триптофана (1 г/л) определяли коллометрически на модифицированной среде “К”, где $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ был заменен на 1 г/л KNO_3 , используя реактив Сальковского (Gordon, Weber, 1951). Калибровочную кривую строили со стандартными растворами индолуксусной кислоты. Гидролиз крахмала оценивали по реакции с раствором Люголя после выращивания культуры на агаризованной среде “К” с добавлением 0.2% (в./об.) растворимого крахмала. Наличие оксидазы определяли, используя 1% (в./об.) раствор тетраметил-*p*-фенилендиамин

дигидрохлорида. Активность каталазы выявляли, нанося 3%-ный раствор перекиси водорода на штрих исследуемых культур, выращенных на агаризованной среде.

Температурный диапазон роста определяли, выращивая культуры в жидкой среде “К” с метанолом в герметично закрытых флаконах на качалке (120 об./мин) при температуре 4–42°C, а также на среде R2A. Рост изолятов при различных значениях pH исследовали на среде “К” в диапазоне pH 5.0–10.0. Значения pH устанавливали добавлением 5 М NaOH и 5 н NaCl.

При изучении способности изолятов использовать различные органические соединения в качестве источника углерода и энергии в минеральную среду вместо метанола вносили 0.3% (в./об.) испытуемого вещества, инокулировали аликвотой культуры из логарифмической фазы роста и инкубировали 14 сут при оптимальной температуре. Все летучие вещества вносили в количестве 0.5% по объему.

Для определения спектра используемых субстратов и выявления некоторых биохимических свойств исследуемых штаммов использовали также API тесты (API 20E, API 20NE; “BioMerieux”, Франция), следуя инструкции производителя. Рост в атмосфере метана, дихлорметана или $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{O}_2$ анализировали, как описано ранее (Kaparullina et al., 2017).

При исследовании способности культур использовать различные источники азота в среду “К” вместо сульфата аммония вносили эквивалентные по азоту количества тестируемых веществ.

Устойчивость к антибиотикам определяли с помощью дисков (“Bioanalyse”, Турция), пропитанных следующими антибиотиками (мкг/диск): линкомицин (10), эритромицин (15), пенициллин (10), оксациллин (5), налидиксовая кислота (30), гентамицин (10), хлорамфеникол (30), канамицин (30), стрептомицин (10), новобиоцин (30), тетрациклин (30) и неомицин (30).

Микроскопия. Изучение морфологии и подвижности клеток в режиме фазового контраста проводили с помощью оптического микроскопа Nikon Eclipse Ci (“Nikon”, Япония), оснащенного камерой ProgRes SpeedXT core5 (“Jenoptik”, Германия). Электронно-микроскопический анализ проводили на сканирующем электронном микроскопе JSM-6510LV (“Jeol”, Япония). Образцы фиксировали в 1.5%-ом растворе глутарового альдегида в 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2) при 4°C в течение 1 ч, затем трижды отмывали в том же буфере. Далее образцы дополнительно фиксировали в 1%-ом растворе OsO_4 в 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2) в течение 3 ч при 20°C. После обезвоживания в серии спиртов возрастающей концентрации (начиная с 50 до 100% в течение

20 мин на каждом этапе) клетки дополнительно пропитывали в *трет*-бутиловом спирте (*tert*-Butanol, “Sigma-Aldrich”) в двух сменах по 20 мин при 26°C. Далее образцы замораживали в *трет*-бутиловом спирте и проводили процедуру замораживания–высушивания в установке JFD-320 (“Jeol”, Япония) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. На поверхность высушенных образцов наносили золото в напылительной установке JFC 1100 (“Jeol”, Япония).

Хемотаксономический анализ. Убихиноны экстрагировали из лиофильно-высушенных клеток, очищали по методу Коллинса (Collins, 1985) и анализировали на масс-спектрометре Finnigan MAT 8430 MS (Германия).

Жирнокислотный состав клеток, выращенных на среде R2A в течение 48 ч, определяли известным методом (Doronina et al., 2012). Фосфолипидный состав клеток, выращенных на среде “К” с метанолом, анализировали двумерной тонкослойной хроматографией (Doronina et al., 2012).

Энзимологический анализ проводили в бесклеточном экстракте, как описано ранее (Trotsenko et al., 1986; Доронина и соавт., 2018). Активность ферментов выражали в наномолях потребленного субстрата или образованного продукта за 1 мин в пересчете на 1 мг белка. Количественное определение белка проводили методом Лоури (Lowry et al., 1951).

Выделение и анализ ДНК. ДНК выделяли с использованием набора ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (“Zymo Research”, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Г + Ц состав ДНК определяли тепловой денатурацией на спектрофотометре “Beckman DU-8B” (США) при скорости нагрева 0.5°C/мин и рассчитывали, используя уравнение: $\text{мол. Г + Ц} = (T_{\text{пл}} \times 2.08) - 106.4$. В качестве стандарта использовали ДНК *Escherichia coli* K-12. ДНК–ДНК гибридизацию проводили, как описано ранее (Lang et al., 2008).

Ген 16S рРНК амплифицировали ПЦР, используя универсальные для прокариот праймеры 27f и 1492r (Lane, 1991).

Филогенетический анализ. Предварительный филогенетический скрининг сходства последовательностей генов 16S рРНК проводили по базе данных GeneBank [NCBI] с помощью пакета программ BLAST [http://ncbi.nlm.nih.gov]. Для более точного определения филогенетического положения изолятов нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК выравнивали с последовательностями референтных штаммов ближайших прокариот с помощью программы CLUSTAL W (Thompson et al., 1997). Филогенетический анализ выполнен при помощи программы MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Филогенетические деревья (филограммы) строили методом присоединения соседей

(“neighbor-joining”) (Saitou, Nei, 1987). Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью “bootstrap-анализа” 1000 альтернативных филограмм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология. Исследуемые в работе изоляты представлены граммотрицательными клетками. Клетки штамма F30L^T имели грушевидную форму (рис. 1а, 1в), клетки штаммов 1ТС^T и Dau2 были представлены короткими овоидными палочками (рис. 1б, 1г). Для клеток штамма 1ТС^T характерно наличие капсулы. Все штаммы на 3 сут роста на агаризованной среде “К” с 0.5% метанола при 29°C образовывали точечные колонии с ровным краем, гладкой поверхностью, однородной структурой, белые (штамм F30L^T), светло-бежевые (штаммы 1ТС^T и Dau2). Спор и простек не образовывали, размножались бинарным делением.

Культуральные, физиолого-биохимические и хемотаксономические свойства. Изучаемые штаммы росли в жидкой среде “К” с метанолом без агрегации клеток, пигмент не образовывали. Изоляты оксидазо-, каталазо- и уреазоположительные, желатин не разжижали. На тестовых средах все штаммы гидролизовали эскулин и обладали β-галактозидазой, но не образовывали сероводород. Все исследуемые в работе штаммы росли на глюкозе, лактозе, фруктозе, мальтозе, манните, инозите, метаноле и этаноле, но не росли на α-кетоглутарате. В отличие от штамма F30L^T, штаммы Dau2 и 1ТС^T росли на арабинозе, метиламине, диметиламине, формальдегиде, диметилсульфоксиде и глицерине. Штамм F30L^T слабо рос на ксилозе, фруктозе, малате, ацетамиде, N-ацетил-D-глюкозамине. Штамм Dau2 не рос на сахарозе и серине, а рост на малате, сукцинате натрия, N-ацетил-D-глюкозамине и аланине отсутствовал у штамма 1ТС^T. Слабый рост на сукцинате натрия, формальдегиде и диметилсульфоксиде выявлен у штамма Dau2. Штамм 1ТС^T слабо рос на формиате натрия, серине, ацетамиде, формальдегиде и диметилсульфоксиде. Все изоляты оптимально росли при 25–29°C и рН 7.0–7.5, при 0.01–3% (оптимально 0.5%) (об./об.) CH₃OH, содержании NaCl 0.05% (в./об.); 2% NaCl в среде полностью ингибировало рост.

В жирнокислотном составе клеток преобладали C_{18:1} ω7c, C_{19:0} ω8c суцло, C_{16:0} и C_{18:0} кислоты (табл. 1).

Штаммы F30L^T, 1ТС^T и Dau2 синтезировали индолпроизводные на среде с триптофаном (2; 2.2 и 8 мкг/мл соответственно, при ОД₆₀₀ культуры 1.0).

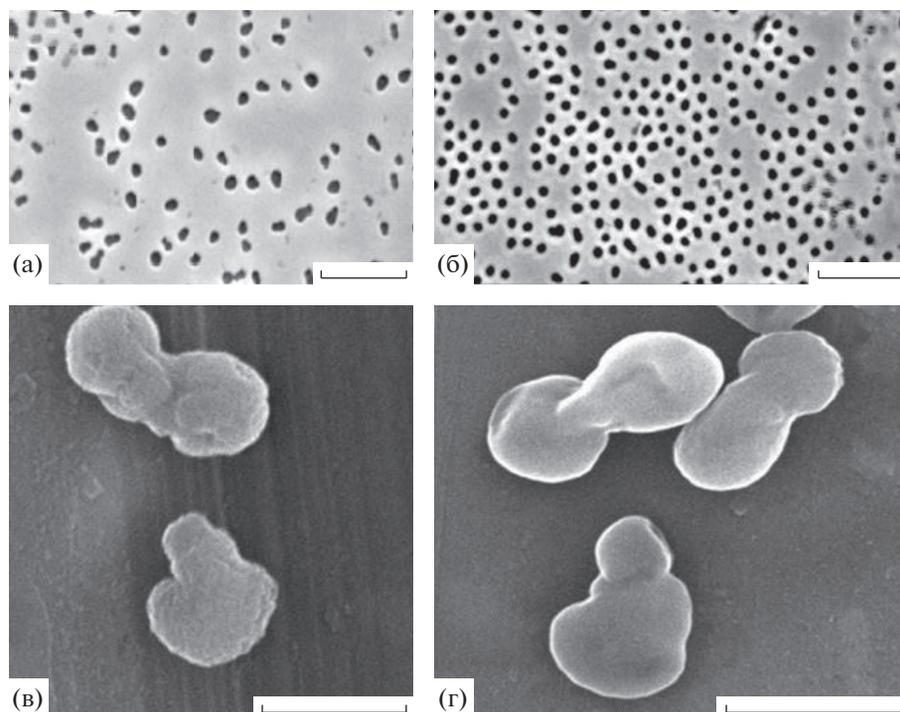


Рис. 1. Морфология клеток исследуемых штаммов. Фазовый контраст клеток штаммов: F30L^T (а), 1ТС^T (б), длина масштабной метки 10 мкм. Сканирующая электронная микроскопия клеток штаммов: F30L^T (в), 1ТС^T (г). Длина масштабной метки – 1 мкм.

Таблица 1. Состав жирных кислот клеток исследуемых штаммов и типовых видов рода *Ancylobacter* (% от общего содержания)

Штаммы: 1 – F30L^T; 2 – 1ТС^T; 3 – Dau2; 4 – *A. sonchi* VKM В-3145^T (Agafonova et al., 2017); 5 – *A. dichloromethanicus* VKM В-2484^T (Firsova et al., 2009); 6 – *A. oerskovii* DSM 18746^T (Lang et al., 2008); 7 – *A. rudongensis* DSM 17131^T (Xin et al., 2004); 8 – *A. aquaticus* DSM 101^T (Ørskov, 1928; Raj, 1983); 9 – *A. vacuolatus* DSM 1277^T (Xin et al., 2006); 10 – *A. polymorphus* DSM 2457^T (Xin et al., 2006); 11 – *A. pratalsi* E130^T (Suarez et al., 2017); 12 – *A. defluvii* DSM 29296^T (Poroshina et al., 2013)

Жирные кислоты	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Неизвестные 13.957	Сл.	Сл.	Сл.	0.8	0.4	0.3	0.2	0.5	–	0.3	–	Сл.
Сумма жирных кислот 3	0.5	0.5	0.5	0.6	0.8	0.4	1.3	1.6	0.7	0.4	3.6	0.6
16:0	2.4	5.4	3.6	6.8	3.2	4.9	4.8	5.9	4.9	6.8	12.7	4.8
17:0	–	0.4	0.1	0.7	–	0.5	0.5	1.0	1.1	0.9	–	0.5
18:1 ω7c	96.1	82.6	86.2	81.4	69.1	82.7	60.9	75.8	76.1	71.5	64.4	85.0
18:0	1.1	1.3	1.2	0.8	0.5	1.6	1.5	1.0	1.2	2.0	1.6	1.1
18:1-11 methyl ω7c	–	–	–	–	–	–	2.2	–	1.0	0.4	–	–
Сумма жирных кислот 7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.8	–	–
19:0 ω8c cyclo	–	9.9	8.4	–	26.0	9.1	27.9	13.7	14.7	16.3	7.7	8.1
20:1 ω11c	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
20:2 ω6,9c	–	–	–	–	–	0.2	0.4	–	–	0.2	–	–

Примечание. Клетки выращены на среде R2A (DSMZ среда 830) при 28°C в течение 2 дней. “–” – не обнаружено; сл. – следы. Сумма жирных кислот 3 содержит C_{16:1} ω7c и/или *iso*-C_{15:0} 2-OH; сумма жирных кислот 7 содержит C_{19:0} ω10c cyclo, C_{19:1} ω10c и/или неизвестные эквивалентной длины цепи 18.846.

Таблица 2. Дифференцирующие характеристики штаммов F30L^T, 1ТС^T и Dau2 и типовых представителей рода *Ancylobacter* Штаммы: 1 – F30L^T; 2 – 1ТС^T; 3 – Dau2; 4 – *A. sonchi* Osot^T; 5 – *A. dichloromethanicus* DM16^T; 6 – *A. aquaticus* DSM 101^T; 7 – *A. rudongensis* DSM 17131^T; 8 – *A. polytomorphus* DSM 2457^T; 9 – *A. vacuolatus* DSM 1277^T; 10 – *A. oerskovii* DSM 18746^T; 11 – *A. pratensis* E130^T; 12 – *A. defluvii* SK15^T

Характеристика	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Морфология клеток	Груше-видные	Палочко-видные	Палочко-видные	Палочко-видные	Бобо-видные	Бобо-видные	Бобо-видные	Бобо-видные	Бобо-видные	Плеоморфные	Палочко-видные	Палочко-видные
Рост при 42°C	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
Рост при 5% NaCl	–	–	–	–	+/-	–	–	+	–	Н.о.	+	+/-
Нитратредукция	–	–	–	–	–	+	–	–	+	–	+	+
Гидролиз желатины	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	Н.о.	Н.о.
Рост на дихлорметане	–	–	–	–	+	–	–	–	–	Н.о.	Н.о.	–
API 20NE:												
Нитратредукция	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	+
Уреаза	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	–	–
Гидролиз эскулина	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+
β-Галактозидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–
Ассимиляция арабинозы	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+
Ассимиляция глюконоата	–	+	+	+	+/-	–	–	–	+	+	–	+
Ассимиляция малата	+	+	+	–	–	–	–	+	–	+	–	+
Ростовые субстраты:												
Лактоза	+	+	+	+	–	Н.о.	–	–	–	Н.о.	+	–
Формиат	–	+/-	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–
Глицерин	–	+	+	+	+/-	–	+	–	–	–	Н.о.	Н.о.
Арабиноза	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	Н.о.	Н.о.
Ксилоза	+/-	+	+	+	+	+/-	+	+	–	+/-	Н.о.	Н.о.
Фруктоза	+	+	+	+	+/-	–	+	+/-	+/-	+	Н.о.	+
Сорбит	+	+	Н.о.	+	+/-	–	+	+	+	+	Н.о.	+
Источник выделения штамма	Вода озера	Ризосферная почва <i>Typhium repens</i> L.	Ризосферная почва <i>Daucus carota</i> L.	Корни <i>Sonchus arvensis</i> L.	Загрязненная почва	Почва	Ризосфера <i>Spartina anglica</i> L.	Речной ил	Почва	Почва	Ризосфера <i>Plantago winteri</i> Wit	Загрязненная соленая вода

Примечание. Все данные получены в этой работе, за исключением *A. dichloromethanicus* DM16^T; *A. oerskovii* DSM 18746^T; *A. rudongensis* DSM 17131^T; *A. aquaticus* DSM 101^T; *A. vacuolatus* DSM 1277^T; *A. polytomorphus* DSM 2457^T (Firsova et al., 2009); *A. sonchi* Osot^T (Agafonova et al., 2017); *A. pratensis* E130^T (Suarez et al., 2017). Н.о. – не определяли; “+/-” – слабый рост.

Таблица 3. Активность ферментов первичного окисления, ассимиляции C₁-соединений и азотного метаболизма у штамма 1ТС^T, выращенного на разных субстратах (нмоль/мин/мг белка)

Фермент	Кофактор	Метанол	Глюкоза
Метанолдегидрогеназа	ФМС	174	3
Формальдегиддегидрогеназа	ФМС	4	1
	НАД ⁺	60	25
Формиатдегидрогеназа	ФМС	28	0
	НАД ⁺	44	0
Рибулобисфосфаткарбоксилаза		135	0
Фосфорибулокиназа		223	230
Оксипируватредуктаза	НАДН	120	120
	НАДФН	160	157
Серин-глиоксилатаминотрансфераза	НАДН	0	0
	НАДФН	0	0
Гексулозофосфатсинтаза		0	0
Глутаматдегидрогеназа	НАДН	0	0
	НАДФН	19	20
Глутаматсинтаза	НАДН	8	5
Глутаминсинтетаза	Mg ²⁺	18	16

Характеристики новых штаммов в сравнении с типовыми видами рода *Ancylobacter* представлены в табл. 2.

Метаболическая характеристика. Для выяснения путей первичного C₁-метаболизма исследуемых штаммов определяли активности соответствующих ферментов в экстрактах клеток, выращенных на средах с метанолом или глюкозой.

Поскольку ферментные профили всех культур были сходными, в табл. 3 приведены активности ферментов только для штамма 1ТС^T. Исследуемые изоляты окисляли метанол классической метанолдегидрогеназой, проявляющей активность с феназинметосульфатом (ФМС) и активируемой цианидом или ионами аммония. Окисление формальдегида до формиата осуществлялось НАД-зависимой формальдегиддегидрогеназой, активность которой обнаружена также у клеток, выращенных на среде с глюкозой. Активность формальдегиддегидрогеназы с ФМС была очень низкой. Формиат далее подвергался превращению до СО₂ формиатдегидрогеназой, активной как с ФМС, так и с НАД⁺. Активность этого фермента отсутствовала в экстрактах клеток, выращенных на глюкозе. При исследовании путей первичной ассимиляции углерода метанола не удалось выявить активности специфических ферментов серинового и гексулозофосфатного путей C₁-ассимиляции: серин-глиоксилатаминотрансферазы и гексулозо-

фосфатсинтазы (табл. 3). В то же время обнаружена оксипируватредуктаза и фосфорибулокиназа, активность которых была одинакова в экстрактах клеток, выращенных на метаноле и глюкозе. Напротив, рибулозобисфосфаткарбоксилаза индуцировалась только при росте на C₁-субстратах. Аммоний ассимилировался восстановительным аминированием α-кетоглутарата и через глутаматный цикл.

Генотипическая характеристика. На основании секвенирования генов 16S рРНК штамм F30L^T имел наибольший уровень сходства с *Ancylobacter dichloromethanicus* DM16^T (97.8%), тогда как штаммы 1ТС^T и Dau2 близки *A. oerskovii* DSM 18746^T (98.6%) (рис. 2). Сходство нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК между штаммами 1ТС^T и Dau2 составило 99.4%. ДНК–ДНК гибридизация штамма F30L^T с *A. dichloromethanicus* DM16^T выявила только 22% гомологии, штамма 1ТС^T с *A. oerskovii* DSM 18746^T – 27%, тогда как штаммы 1ТС^T и Dau2 между собой имели 77% гомологии, что свидетельствует о принадлежности к одному виду.

Филогенетическое дерево (рис. 2) свидетельствует о существенной полифилетичности рода *Ancylobacter*, и очевидно, что после секвенирования геномов всех типовых представителей можно будет провести его ревизию.

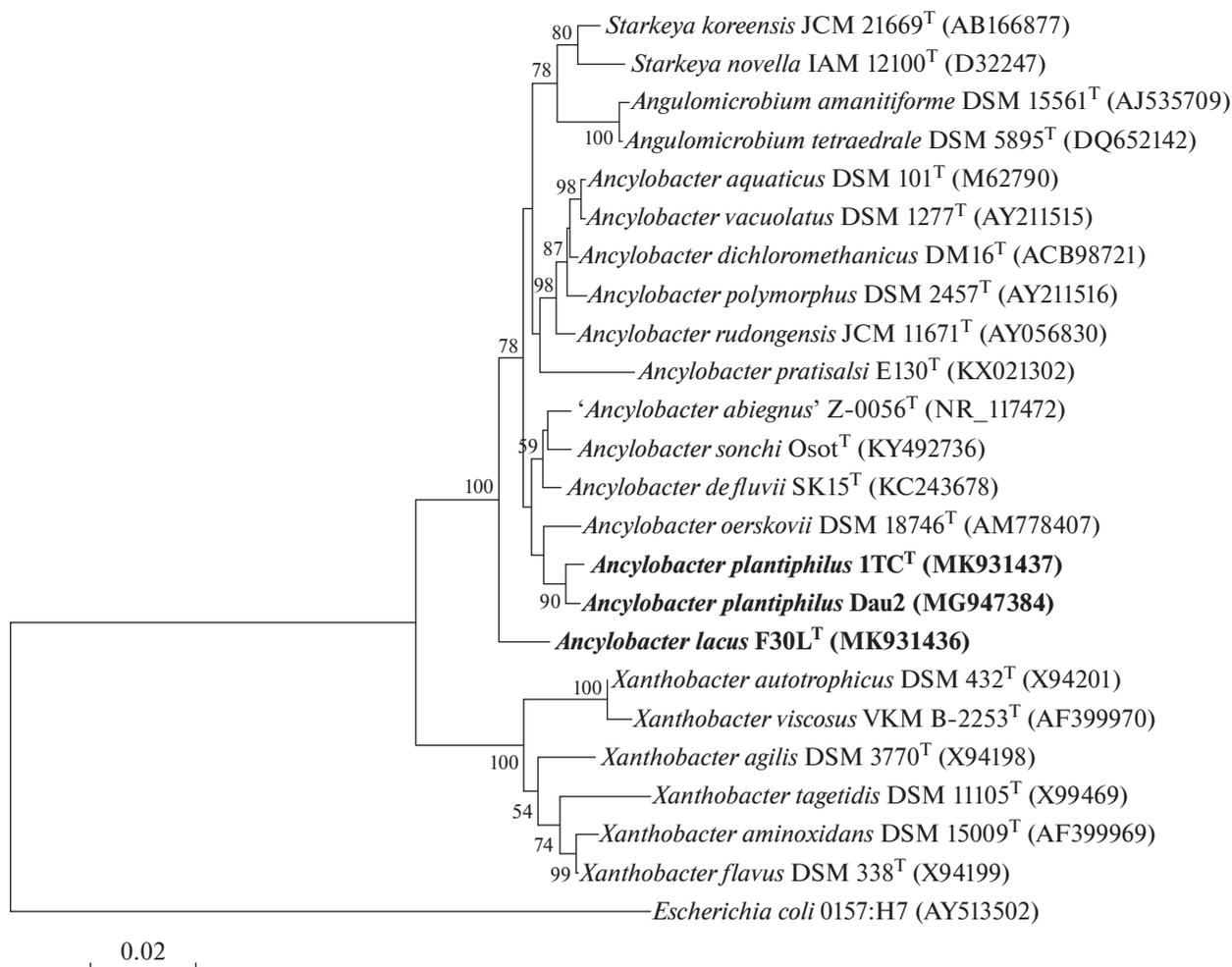


Рис. 2. Филогенетическое положение штаммов F30L^T, 1TC^T и Dau2, основанное на результатах сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод “neighbor-joining”. Корень определен включением последовательности *Escherichia coli* O157:H7 (AY513502) в качестве внешней группы.

Согласно современным рекомендациям по систематике прокариот необходимо секвенирование генома нового таксона и сравнение его идентичности нуклеотидных последовательностей (ANI) и уровня ДНК–ДНК гибридизации *in silico* с наиболее близкими представителями по данным секвенирования генов 16S рРНК. Однако геномы *A. dichloromethanicus* DM16^T и *A. oerskovii* DSM 18746^T пока не секвенированы. В то же время считается, что если уровень сходства по генам 16S рРНК с известными типовыми представителями рода менее 98.7%, то есть полное основание для отнесения исследуемого штамма к новому виду (Chun et al., 2018).

Таким образом, проведенные исследования позволяют идентифицировать штамм F30L^T как новый вид *Ancylobacter lacus* sp. nov., а исследуемые штаммы 1TC^T и Dau2 как новый вид *Ancylobacter plantiphilus* sp. nov., поскольку они отличались

от ближайших представителей — *A. dichloromethanicus* DM16^T и *A. oerskovii* DSM 18746^T соответственно, по филогенетическим (уровень сходства по 16S рРНК <98.6% и уровень ДНК–ДНК гомологии <70%) и фенотипическим характеристикам (дифференцирующие характеристики новых штаммов представлены в табл. 2). В отличие от ближайшего представителя, штамм F30L^T не рос при 5% NaCl, на дихлорметане, глюконате, формиате, глицерине и арабинозе, но рос на лактозе, образовывал уреазу и ассимилировал малат. В отличие от ближайшего представителя *A. oerskovii* DSM 18746^T, типовой штамм 1TC^T гидролизировал эскулин и обладал β-галактозидазой, рос на глицерине.

Описание *Ancylobacter lacus* sp. nov.

Ancylobacter lacus (la'cus. L. masc. gen. n. *lacus* из озера, указывающий на источник выделения этого организма).

Грамотрицательные неспорообразующие неподвижные грушевидные клетки ($1.0\text{--}1.5 \times 2.0\text{--}2.2$ мкм), размножаются бинарным делением. На минеральной агаризованной среде с метанолом колонии точечные, матовые, белые, с выпуклым профилем, гладкой поверхностью и однородной структурой. Аэроб, образует каталазу, оксидазу и уреазу. Оптимально растет при $25\text{--}29^\circ\text{C}$, pH $7.0\text{--}7.5$ и 0.5% (об./об.) CH_3OH , в присутствии $0.05\text{--}1.5\%$ NaCl. Растет на глюкозе, лактозе, мальтозе, раффинозе, фруктозе, сукцинате натрия, манните, инозите, сорбите, D,L-пролине, этаноле и метаноле. Слабо растет на ксилозе, сахарозе, малате, ацетамиде и N-ацетил-D-глюкозамине. Не обнаружен рост в атмосфере $\text{H}_2/\text{O}_2/\text{CO}_2$, на дихлорметане, глюконате, арабинозе, α -кетоглутарате, формиате натрия, серине, метиламине, диметиламине, формальдегиде, диметилсульфоксиде и глицерине. В качестве источников азота использует соли аммония и нитраты. Синтезирует индолы из триптофана на среде, содержащей нитраты в качестве источников азота. Желатин не разжижает, не выделяет сероводород. Образует ацетон. Крахмал не гидролизует. Реализует рибулозобисфосфатный путь C_1 -метаболизма. В ассимиляции NH_4^+ принимают участие глутаматдегидрогеназа и глутаматный цикл (глутаматсинтаза, глутаминсинтаза).

Клетки устойчивы к действию тетрациклина, стрептомицина, налидиксовой кислоты, пеницилина, линкомицина, хлорамфеникола. Чувствительны к новобиоцину, неомицину, эритромицину, гентамицину, канамицину. В жирнокислотном составе клеток преобладают $\text{C}_{18:1}$ $\omega 7c$ (91.6%), $\text{C}_{16:0}$ (2.4%) и $\text{C}_{18:0}$ (1.1%) кислоты. Основной убихинон — Q_{10} . В фосфолипидном составе клеток преобладают фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин и дифосфатидилглицерин. Содержание пар $\Gamma + \text{Ц}$ в ДНК штамма F30L^T составляет 67.5 мол. % ($T_{\text{пл}}$).

Типовой штамм F30L^T (VKM В-3280^T = DSM 106439^T) изолирован из воды пресного озера г. Пушино (Московская область, Россия).

Последовательность гена 16S рРНК штамма F30L^T депонирована в GenBank под номером MK931436.

Описание *Ancylobacter plantiphilus* sp. nov.

Ancylobacter plantiphilus (plan.ti.phi'lus, L.n. *planta*, a plant; Gr. *aji. philos*, loving; M. L. masc. n. *plantiphilus*, plant-loving, живущий, растущий или находящийся на растениях).

Грамотрицательные неспорообразующие неподвижные короткие овоидные палочки ($0.5\text{--}0.6 \times 1.0\text{--}1.2$ мкм), размножаются бинарным делением. На минеральной среде с метанолом колонии то-

чечные, непрозрачные, светло-бежевые, блестящие, круглые, с выпуклым профилем, гладкой поверхностью и однородной структурой. Строгий аэроб, образует каталазу, оксидазу, уреазу. Оптимально растет при $25\text{--}29^\circ\text{C}$, pH $7.0\text{--}7.5$ и 0.5% (об./об.) CH_3OH , в присутствии $0\text{--}0.5\%$ NaCl. Растет на арабинозе, глюкозе, ксилозе, лактозе, мальтозе, фруктозе, малате, манните, инозите, ацетамиде, аланине, диметилсульфоксиде, метаноле, метиламине, диметиламине, этаноле и глицерине. Не растет в атмосфере $\text{H}_2/\text{O}_2/\text{CO}_2$, на сахарозе, дихлорметане, α -кетоглутарате и серине. В качестве источников азота использует соли аммония, нитраты, метиламин. Синтезирует индолы из триптофана на среде, содержащей нитраты в качестве источников азота. Желатин не разжижает, не выделяет сероводород. Не образует ацетон. Крахмал не гидролизует. Реализует рибулозобисфосфатный путь C_1 -метаболизма. В ассимиляции NH_4^+ принимают участие глутаматдегидрогеназа и глутаматный цикл (глутаматсинтаза, глутаминсинтаза).

Клетки устойчивы к действию налидиксовой кислоты, пеницилина, линкомицина, эритромицина, хлорамфеникола. Чувствительны к тетрациклину, стрептомицину, новобиоцину, неомицину, канамицину, гентамицину. В жирнокислотном составе клеток преобладают $\text{C}_{18:1}$ $\omega 7c$ (82.6%), $\text{C}_{19:0}$ $\omega 8c$ cis (9.9%) и $\text{C}_{16:0}$ (5.4%) кислоты. Основной убихинон — Q_{10} . В фосфолипидном составе преобладают фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин и дифосфатидилглицерин. Содержание пар $\Gamma + \text{Ц}$ в ДНК штамма 1TC^T составляет 67.1 мол. % ($T_{\text{пл}}$).

Типовой штамм 1TC^T (=VKM В-3219^T = DSM 106438^T) изолирован из ризосферной почвы клевера белого (*Trifolium repens* L.), г. Москва (Россия).

Последовательность гена 16S рРНК штамма 1TC^T депонирована в GenBank под номером MK931437.

К данному виду относится также штамм Dau2, выделенный из ризосферной почвы моркови дикой (*Daucus carota* L.) (VKM В-3227 = CCUG71988).

Последовательность гена 16S рРНК штамма Dau2 депонирована в GenBank под номером MG947384.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А. Чемодурова, к.б.н. Е.Н. Капарулина — идентификация штаммов методами полифазной таксономии; к.б.н. А.А. Мачулин — проведение микроскопии; Dr. C. Spröger, Dr. E. Lang — ДНК–ДНК гибридизация и анализ жирнокислотного состава клеток; д.б.н. Н.В. Доронина — выделение чистых культур и анализ активности ферментов. Все авторы участвовали в подготовке публикации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Доронина Н.В., Торгонская М.Л., Федоров Д.Н., Троценко Ю.А.* Аэробные метиловобактерии – перспективные объекты современной биотехнологии (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. С. 111–121.
- Doronina N.V., Torgonskaya M.L., Fedorov D.N., Trotsenko Yu.A.* Aerobic methylobacteria promising objects of modern biotechnology (review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. V. 51. P. 111–121.
- Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Чемодурова А.А., Троценко Ю.А.* *Paracoccus simplex* sp. nov. – новый факультативный метилотроф, использующий метиламин // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 541–550.
- Doronina N.V., Kaparullina E.N., Chemodurova A.A., Trotsenko Yu.A.* *Paracoccus simplex* sp. nov., a new methylamine-utilizing facultative methylophilic bacterium // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 662–671.
- Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л.* Аэробные метиловобактерии. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
- Trotsenko Y.A., Doronina N.V., Torgonskaya M.L.* Aerobic methylobacteria. Pushchino: ONTI PSC RAS, 2010 325 p.
- Порошина М.Н., Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Ковалевская Н.П., Троценко Ю.А.* Галофильные и галотолерантные аэробные метиловобактерии из техногенных биотопов // Микробиология. 2013. Т. 84. С. 473–482.
- Poroshina M.N., Doronina N.V., Kaparullina E.N., Kovalevskaya N.P., Trotsenko Y.A.* Halophilic and halotolerant aerobic methylobacteria from the technogenic Solikamsk biotopes // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 490–498.
- Агафонова Н., Капаруллина Е., Троценко Ю., Доронина Н.* *Ancylobacter sonchi* sp. nov., a novel methylophilic bacterium from roots of *Sonchus arvensis* L. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 4552–4558.
- Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Rooney A.P., Yi H., Xu X.W., De Meyer S., Trujillo M.E.* Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 461–466.
- Collins M.D.* Analysis of isoprenoid quinones // Methods in Microbiology / Ed. Gottschalk G. N.Y.: Acad Press, 1985. V. 18. P. 329–366.
- Doronina N.V., Gogleva A.A., Trotsenko Y.A.* *Methylophilus glucosoxydans* sp. nov., a restricted facultative methylophilic bacterium from rice rhizosphere // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 196–201.
- Firsova J., Doronina N., Lang E., Spröer C., Vuilleumier S., Trotsenko Y.* *Ancylobacter dichloromethanicus* sp. nov. – a new aerobic facultatively methylophilic bacterium utilizing dichloromethane // Syst. Appl. Microbiol. 2009. V. 32. P. 227–232.
- Gordon S.A., Weber R.P.* Colorimetric estimation of indoleacetic acid // Plant Physiol. 1951. V. 26. P. 192–195.
- Kaparullina E.N., Trotsenko Yu.A., Doronina N.V.* *Methylobacillus methanolivorans* sp. nov., a novel non-pigmented obligately methylophilic bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 425–431.
- Lang E., Swiderski J., Stackebrandt E., Schumann P., Spröer C., Sahin N.* Description of *Ancylobacter oerskovii* sp. nov. and two additional strains of *Ancylobacter polymorphus* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 1997–2002.
- Lane D.J.* 16S/23S rRNA sequencing in nucleic acid techniques in bacterial systematics // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. Chichester: John Wiley and Sons, 1991. P. 115–175.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
- Ørskov J.* Beschreibung eines neuen Mikroben, *Microcycylus aquaticus*, mit eigentuemlicher Morphologie // Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. 1928. V. 107. P. 180–184 (in German).
- Raj H.D.* Proposal of *Ancylobacter* gen. nov. as a substitute for the bacterial genus *Microcycylus* Ørskov 1928 // Int. J. Syst. Bacteriol. 1983. V. 33. P. 397–398.
- Saitou N., Nei M.* The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 405–425.
- Suarez Ch., Ratering S., Spröer J., Schnell S.* *Ancylobacter pratensis* sp. nov. with plant growth promotion abilities from the rhizosphere of *Plantago winteri* Wirtg. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 4500–4506.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 4876–4882.
- Trotsenko Y.A., Doronina N.V., Govorukhina N.I.* Metabolism of non-motile obligately methylophilic bacteria // FEMS Microbiol. Lett. 1986. V. 3. P. 293–297.
- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.S., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P., Truper H.G.* Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics // Int. J. Syst. Bacteriol. 1987. V. 37. P. 463–464.
- Xin Y.H., Zhou Y.G., Zhou H.L., Chen W.X.* *Ancylobacter rundongensis* sp. nov., isolated from roots of *Spartina anglica* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 385–388.
- Xin Y.H., Zhou Y.G., Chen W.X.* *Ancylobacter polymorphus* sp. nov. and *Ancylobacter vacuolatus* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 1185–1188.

***Ancylobacter lacus* sp. nov. and *Ancylobacter plantiphilus* sp. nov., Novel Aerobic Facultative Methylophilic Bacteria**

A. A. Chemodurova¹, E. N. Kaparullina¹, A. V. Machulin¹, C. Spröer², E. Lang², and N. V. Doronina^{1,*}

¹*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

²*Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, 38124 Germany*

*e-mail: doronina@ibpm.pushchino.ru

Received June 3, 2019; revised July 2, 2019; accepted September 25, 2019

Abstract—Novel aerobic facultatively methylophilic bacteria were isolated from the water of a freshwater lake (strain F30L^T), soil sample of rhizosphere of white clover *Trifolium repens* L. (strain 1TC^T), and rhizosphere of carrot *Daucus carota* L. (strain Dau2). The isolates were gram-negative, non-spore-forming, nonmotile, pleomorphic/rod-shaped cells, propagating by binary fission; they were facultative methylophilic, using a broad range of polycarbon compounds, apart from methanol. Optimum growth occurred at 25–29°C and pH 7.0–7.5, 0.5 vol % CH₃OH, and 0.05 vol % NaCl. The strains employ the ribulose biphosphate pathway for C₁ assimilation. The predominant phospholipids are phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, and diphosphatidylglycerol. In the whole-cell fatty acid pattern of strains, C_{18:1 ω7c}, C_{19:0 ω8c} cyclo, C_{16:0} and C_{18:0} acids were predominant. The major ubiquinone was Q-10. According to the 16S rRNA gene sequencing, strain F30L^T exhibited high similarity to *Ancylobacter dichloromethanicus* DM16^T (97.8%), while strains 1TC^T and Dau2 were closely related to *A.oerskovii* DSM 18746^T (98.6%). The 16S rRNA gene sequence similarity between strains 1TC^T and Dau2 was 99.4%. DNA–DNA hybridization of the strain F30L^T with *A. dichloromethanicus* DM16^T revealed only 22% homology; homology for strain 1TC^T and *A.oerskovii* DSM 18746^T was 27%, while DNA–DNA homology between strains 1TC^T and Dau2 was 77%. Based on the data obtained, strain F30L^T was identified as a new species within the genus *Ancylobacter*, *Ancylobacter lacus* sp. nov. (VKM B-3280^T = DSM 106439^T). Strains 1TC^T and Dau2 (=BKM B-3227 = CCUG71988) represent a novel species of the same genus, for which the name *Ancylobacter plantiphilus* sp. nov. is proposed, with the type strain 1TC^T (=VKM B-3219^T = DSM 106438^T).

Keywords: *Ancylobacter lacus* sp. nov., *Ancylobacter plantiphilus* sp. nov., methylophilic bacteria, new species