

## ГЛИКОПОЛИМЕРЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПРИЗНАК *ARTHROBACTER CRYSTALLOPOIETES*

© 2022 г. Н. В. Потехина<sup>а, \*</sup>, Е. В. Арискина<sup>б</sup>, А. С. Шашков<sup>с</sup>, Е. М. Тульская<sup>а</sup>, Л. И. Евтушенко<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

<sup>б</sup>ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пушкино, 142290, Россия

<sup>с</sup>Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991, Россия

\*E-mail: potekhina56@mail.ru

Поступила в редакцию 26.11.2021 г.

После доработки 18.01.2022 г.

Принята к публикации 21.01.2022 г.

Изучен состав и структура гликополимеров клеточной стенки *Arthrobacter crystallopoietes* ВКМ Ac-1107<sup>T</sup> (семейство *Micrococcaceae*, филум *Actinobacteria*), отнесенного ранее к группе “*Arthrobacter globiformis*” на основе высокого сходства последовательностей генов 16S рНК и традиционных хемотаксономических признаков. С использованием химических и ЯМР-спектроскопических методов идентифицированы тейхоевая кислота – 1,3-поли(глицерофосфат), замещенный остатками β-глюкозы, и дигликозил-1-фосфатный полимер с повторяющимся звеном -6)-α-D-GalpNAc-(1 → 6)-α-D-GlcpNAc-(1-*P*-. Результаты филогеномного (таксогеномного) анализа – определения средней идентичности аминокислот (AAI) и сходства консервативных белков (POCP) – свидетельствуют о принадлежности *A. crystallopoietes* к новому роду. При этом состав и структура гликополимеров клеточной стенки могут рассматриваться как важный диагностический признак этого рода, который будет описан в будущем на основе *A. crystallopoietes*.

**Ключевые слова:** *Arthrobacter crystallopoietes*, гликополимеры клеточной стенки, тейхоевые кислоты, систематика, таксогеномика

**DOI:** 10.31857/S002636562230005X

Изучение полимеров клеточных стенок микроорганизмов важно для ряда областей фундаментальной и прикладной науки, в том числе, систематики микроорганизмов. Хотя в последние годы развитие систематики прокариот основывается преимущественно на данных филогеномики (таксогеномики), сведения о фенотипических характеристиках, в частности, хемотаксономических, отражающих химический состав клеток и клеточных стенок, являются по-прежнему акту-

альными (Chun et al., 2018; Nouioui et al., 2018; Salam et al., 2020).

Основным гликополимером клеточных стенок грамположительных бактерий является, как известно, пептидогликан, характеризующийся высокой степенью структурного разнообразия (Schleifer, Kandler, 1972; Schumann, 2011). Типы и вариации структур пептидогликана служат важными диагностическими признаками таксонов разного ранга (Schumann et al., 2009; Schumann, 2011). Помимо пептидогликана клеточные стенки грамположительных бактерий обычно содержат вторичные гликополимеры (secondary cell wall glycopolymers; Kohler et al., 2009). К ним относятся ковалентно связанные с пептидогликаном тейхоевые кислоты и поли(гликозилфосфаты), а также не содержащие фосфата (бесфосфатные) гликополимеры – нейтральные и кислые, в том числе тейхурононовые, тейхулозоновые и связанные с мембраной липотейхоевые кислоты (Kohler et al., 2009; Potekhina et al., 2011; Шашков с соавт., 2020а, б; Потехина с соавт., 2021).

Вторичные гликополимеры бактерий в сравнении с пептидогликанами являются менее изу-

**Принятые сокращения:** HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy) – протон-детектированная гетероядерная одноквантовая корреляция; ROESY (Rotating-frame nuclear Overhauser Effect correlation Spectroscopy) – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; COSY (Correlation Spectroscopy) – корреляционная спектроскопия; TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) – тотальная корреляционная спектроскопия; НМВС (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) – гетероядерная корреляция через несколько связей; δ<sub>C</sub>, δ<sub>H</sub>, δ<sub>P</sub> – значения химических сдвигов атомов <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H и <sup>31</sup>P соответственно; AAI (Average Amino Acid Identity) – средняя идентичность аминокислот между штаммами; POCP (Percentage Of Conserved Proteins) – сходство консервативных белков.

ченными в таксономическом аспекте. Однако имеющиеся в литературе сведения указывают на то, что набор, структуры и отдельные структурные компоненты гликополимеров могут быть специфичными для видов, родов и высших таксонов актинобактерий (Takeuchi, Yokota, 1989; Schumann et al., 2009; Potekhina et al., 2011; Evtushenko, Ariskina, 2015; Goodfellow, Jones, 2015; Nouioui et al., 2018; Шашков с соавт. 2020б; Потехина с соавт. 2021).

Вид *A. crystallopoietes* входит в состав ревизованного в 2016 г. рода *Arthrobacter*, но занимает обособленное от *A. globiformis* и других видов группы “*A. globiformis*” (*A. humicola*, *A. oryzae* и *A. pascens*) положение на филогенетических дендрограммах, построенных на основе последовательностей генов 16S рРНК с использованием разных методов (Busse et al., 2012; Busse, 2016). *A. crystallopoietes*, однако, был условно отнесен к группе “*A. globiformis*” с учетом его высокого сходства с *A. globiformis* по последовательностям генов 16S рРНК (97.6%), а также сходства с *A. globiformis* и другими видами группы “*A. globiformis*” по ключевым хемотаксономическим признакам — пептидогликану типа А3α, преобладающему менахинону МК-9(Н2) и составу полярных липидов (Busse et al., 2012; Busse, 2016).

Филогенетическая обособленность вида *A. crystallopoietes*, наряду с его отличиями от видов группы “*A. globiformis*” по составу межпептидного мостика пептидогликана (количеству остатков аланина), стали основанием для предположения о принадлежности *A. crystallopoietes* к отдельной группе родового ранга, отличной от “*A. globiformis*” (Busse, 2016).

Кроме того, согласно ранним работам (Садиков с соавт. 1983; Takeuchi, Yokota, 1989), *A. crystallopoietes* отличается от представителей группы “*A. globiformis*” (*A. globiformis* и *A. pascens*) по составу гликополимеров клеточной стенки. Клеточная стенка *A. crystallopoietes* содержит тейхоевую кислоту и гликозилфосфатный полимер, в то время как *A. globiformis* и *A. pascens* характеризуются наличием бесфосфатных гликополимеров. Однако точные химические структуры вышеупомянутых полимеров не установлены. Нет также информации о наличии или отсутствии в клеточной стенке *A. crystallopoietes* нейтральных полисахаридов, характерных для *A. globiformis*, *A. pascens*, *A. citreus*, *A. ramosus* и некоторых других видов *Arthrobacter* (Садиков с соавт. 1983; Takuchi, Yokota, 1989; Zhou et al., 2009; Busse, 2016; Busse, Moore, 2018; Потехина с соавт. 2021). Кроме того, выводы о наличии или отсутствии в клеточной стенке гликополимеров того или иного типа, основанные на результатах исследований с использованием только деструктивных химических методов (анализ продуктов кислотной деградации клеточных

стенок и выделенных из них препаратов углеводов-содержащих полимеров), могут быть ошибочными. Для подтверждения или установления структуры полимеров требуется использование методов ЯМР-спектроскопии (Fiedler, Schäffler, 1987; Takeuchi, Yokota, 1989; Шашков с соавт. 2020а, б).

Следует также отметить, что с накоплением данных о полных геномах и развитием филогеномики (таксогеномики) стало очевидно, что результатов сравнительного изучения генов 16S рРНК часто недостаточно для разграничения родов (Konstantinidis, Tiedje, 2005; Qin et al., 2014). Для установления родовой принадлежности прокариотных микроорганизмов и определения структуры таксонов выше видового ранга лучшее разрешение обеспечивают методы сравнительной геномики, в их числе определение средней идентичности аминокислот (AAI) и сходства консервативных белков (РОСР) (Konstantinidis, Tiedje, 2005; Kim et al., 2021) и РОСР (Qin et al., 2014).

Целью настоящей работы было определение состава и структур вторичных гликополимеров клеточной стенки типового штамма вида *A. crystallopoietes*, сопровождаемое уточнением таксономического статуса этого вида на основе таксогеномного анализа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изученный штамм *A. crystallopoietes* ВКМ Ас-1107<sup>T</sup> (=DSM 20117<sup>T</sup>) получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) (<https://www.vkm.ru>).

Культуру выращивали аэробно при 28°C в колбах на качалке до середины логарифмической фазы роста на пептонно-дрожжевой среде (Potekhina et al., 2011). Клеточные стенки получали методом дифференциального центрифугирования после разрушения клеток на ультразвуковом дезинтеграторе UP100H (“Hielscher”, Германия). Выделение гликополимеров из клеточных стенок проводили трихлоруксусной кислотой, как описано в работе (Potekhina et al., 2011). Для изучения качественного состава клеточной стенки и препаратов гликополимеров проводили кислотный гидролиз 2 М HCl, 3 ч, 100°C; продукты гидролиза анализировали методом электрофореза и хроматографии на бумаге как описано ранее (Potekhina et al., 2011).

Полную структуру полимеров, включающую состав мономеров, положение фосфодиэфирных связей в цепи, а также положение и конфигурацию гликозидных связей устанавливали методом ЯМР-спектроскопии. ЯМР-спектры препаратов снимали в растворах 99.96%-ной дейтерированной воды при температурах, обеспечивающих минимальное перекрытие остаточного сигнала дейтерированной воды с сигналами полимеров,

на спектрометре Avance 600 ("Bruker", Германия). Для отсчета химических сдвигов использовали внутренние стандарты натриевой соли 3-(триметилсилил)-2,2,3,3-тетрадейтеропропионовой кислоты TSP ( $\delta_H$  0.0 и  $\delta_C$  -1.6) и внешний стандарт – 80%-ную фосфорную кислоту ( $\delta_P$  0.0) при 313 К. Двумерные ЯМР-эксперименты выполняли с использованием стандартного математического обеспечения ("Bruker Optik GmbH", Германия). Время смешивания 150 мс и время спин-лока 250 мс были выбраны для экспериментов по двумерной спектроскопии  $^1H$ ,  $^1H$  ROESY и TOCSY соответственно. Двумерные  $^1H$ ,  $^{13}C$  HSQC, HMBC и  $^1H$ ,  $^{31}P$  HMBC-эксперименты были оптимизированы для константы спин-спинового взаимодействия  $J_{H,C}$  8 Гц.

Филогеномный (таксогеномный) анализ проводили на основе 24 геномных последовательностей, доступных в базах данных GenBank и GOLD: *Acaricomes phytoseiuili* DSM 14247<sup>T</sup> AQXM00000000, *Arthrobacter agilis* DSM 20550<sup>T</sup> VHIM00000000, *A. citreus* DSM 20133<sup>T</sup> VTFV00000000, *A. crystallopoietes* DSM 20117<sup>T</sup> CP018863, *A. globiformis* NBRC 12137<sup>T</sup>, BAEG00000000, *A. koreensis* DSM 16760<sup>T</sup> WACG00000000, *A. luteolus* DSM 13067<sup>T</sup> WB-JQ00000000, *A. oryzae* DSM 25586<sup>T</sup> RBIR00000000, *A. pascens* DSM 545<sup>T</sup> JAFHKT00000000, *A. pigmenti* DSM 16403<sup>T</sup> JAATJL00000000, *A. psychrolactophilus* B7<sup>T</sup> QJVC00000000, *A. woluwensis* DSM 10495<sup>T</sup> FNSN00000000, *Citricoccus muralis* DSM 14442<sup>T</sup> QREN00000000, *Glutamicibacter protophormiae* DSM 20168<sup>T</sup> JAGIOJ00000000, *Haematococcus sanguinis* DSM 21259<sup>T</sup> JIAG00000000, *Micrococcus luteus* NCTC 2665<sup>T</sup> LS483396, *Paenarthrobacter aureus* NBRC 12136<sup>T</sup> BJMD00000000, *Paeniglutamicibacter sulfureus* DSM 20167<sup>T</sup> Gold Id:Ga0480495, *Pseudarthrobacter polychromogenes* CGMCC 1.1927<sup>T</sup> BMKU00000000, *Pseudoglutamicibacter cumminsii* DSM 10493<sup>T</sup> JAFB-CO00000000, *Psychromicrobium silvestre* DSM 102047<sup>T</sup> JACBYQ00000000, *Sinomonas atrocyanea* KCTC 3377<sup>T</sup> CP014518, *Specibacter cremeus* C1-50<sup>T</sup> RWKQ00000000.

Показатели AAI рассчитывали по аминокислотным последовательностям аннотированных полных геномов на портале <http://enve-omics.ce.gatech.edu/> с использованием калькулятора AAI (Rodriguez-R, Konstantinidis, 2016). Значения РОСР рассчитывали с использованием скрипта runPOCP.sh (Pantiukh, Grouzdev, 2017) на основе ранее описанного подхода (Qin et al., 2014).

Дендрограмма, отражающая сходство геномов по 90 коровым генам (длина белковых последовательностей – 31358 аминокислот) была построена по методу максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) с применением программ web-сервера M1CR0B1AL1Z3R (<https://microbializer.tau.ac.il/index.html>; Avram et al., 2019). В каче-

стве внешней группы использовали штамм *Microbacterium lacticum* DSM 20427.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В кислотных гидролизатах (2 М HCl, 3 ч, 100°C) клеточной стенки *A. crystallopoietes* ВКМ Ас-1107<sup>T</sup> и выделенных из нее методом экстракции трихлоруксусной кислотой препаратов гликополимеров были идентифицированы продукты деградации, характерные для тейхоевых кислот (моно- и бисфосфаты глицерина), а также глюкоза, глюкозамин и галактозамин. Анализ препарата гликополимеров с помощью электрофореза выявил две фракции с подвижностью  $m_{GROF}$  0.68 и  $m_{GROF}$  0.9, что указывало на наличие не менее двух фосфатсодержащих полимеров.

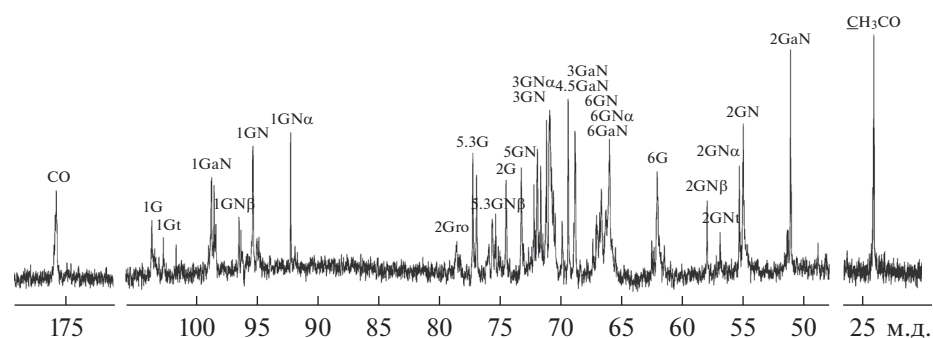
Спектр ЯМР  $^{13}C$  (рис. 1) препарата гликополимеров содержал сигналы разной интенсивности, что характерно для полимера с нерегулярной структурой или смеси полимеров. Часть сигналов (табл. 1), судя по величине химических сдвигов  $\delta_C$  92.1 м.д. (остаток GN $\alpha$ ) и 96.4 м.д. (остаток GN $\beta$ ), принадлежала остаткам сахаров со свободной гидроксильной группой при C-1. Четыре сигнала с  $\delta_C$  98.7 м.д. (остаток GaN), 98.4 м.д. (остаток GaN'), 98.2 м.д. (остаток GaN'') и 103.6 м.д. (остаток G) были характерны для аномерных атомов углерода при гликозидных связях, и один сигнал с  $\delta_C$  95.1 м.д. принадлежал аномерному атому углерода при фосфодиэфирной связи (табл. 1).

Расшифровать сигналы в одномерных спектрах и сделать выводы о структуре полимеров удалось на основе двумерных гомоядерных  $^1H$ ,  $^1H$  COSY, TOCSY и ROESY, а также гетероядерных  $^1H$ ,  $^{13}C$  HSQC и HMBC и  $^1H$ ,  $^{31}P$  HMBC-экспериментов (спектры не приводятся).

Анализ спектров  $^1H$ ,  $^1H$  COSY, TOCSY и ROESY показал наличие в полимере замещенных по гидроксилу при C-6 остатков 2-ацетида-2-дезоксид- $\alpha$ -галактопиранозы ( $\alpha$ -GalpNAc, остаток GaN), 2-ацетида-2-дезоксид- $\alpha$ -глюкопиранозы ( $\alpha$ -GlcNAc, остаток GN $\alpha$ ) и 2-ацетида-2-дезоксид- $\beta$ -глюкопиранозы ( $\beta$ -GlcNAc, остаток GN $\beta$ ), а также незамещенных остатков  $\beta$ -глюкопиранозы ( $\beta$ -Glc, остаток G) и тризамещенных остатков глицерина (остаток Gro).

Спектр  $^1H$ ,  $^{31}P$  HMBC показал, что остатки фосфорной кислоты локализованы по гидроксилу при C-1 (остаток GN $\alpha$ ) и C-6 (остаток GaN), что характерно для полимерной цепи, построенной из дигликозилфосфатных звеньев (Полимер I), а также по гидроксилу при C-1,3 остатков глицерина, составляющих цепь тейхоевой кислоты (Полимер II).

Анализ двумерного  $^1H$ ,  $^{13}C$  HSQC спектра позволил идентифицировать все сигналы в одномер-



**Рис. 1.** Спектр <sup>13</sup>C ЯМР гликополимеров клеточной стенки *Arthrobacter crystallopoietes* ВКМ Ас-1107<sup>T</sup>. Арабские цифры – номера атомов в остатках G (β-Glcp), GaN (α-GalpNAc), GN (α-GlcpNAc), GNα (концевой остаток α-GlcpNAc), GNβ (концевой остаток β-GlcpNAc) и Gro (остаток глицерина); t (terminal) – концевой остаток.

**Таблица 1.** Химические сдвиги в спектрах <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР гликополимеров клеточной стенки *Arthrobacter crystallopoietes* ВКМ Ас-1107<sup>T</sup> и фрагментов Полимера I

Остаток	Химические сдвиги ЯМР <sup>13</sup> C (δ <sub>C</sub> TSP –1.6) и <sup>1</sup> H (δ <sub>H</sub> TSP 0.0)					
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3 (H-3e,3a)	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6 (H-6a,6b)
Полимер I						
-6)-α-D-GalpNAc-(1→ (GaN)	98.7 4.90	51.1** 4.21	68.8 3.96	69.4 4.05	70.9 4.14	65.8* 4.04, 4.00
→6)-α-D-GlcpNAc-(1-P- (GN)	95.1* 5.47	55.0** 3.96	72.0 3.79	70.6 3.93	73.2 3.99	66.7 4.08, 3.69
Дисахариды Полимера I						
α-GalpNAc-(1→ (GaN')	98.4 4.95	51.1 4.18	68.9 3.96	69.7 4.01	72.2 4.00	62.4 3.77, 3.75
→6)-α-D-GlcpNAc (GNα)	92.1 5.20	55.3 3.88	72.0 3.76	71.0 3.60	71.6 3.98	66.8 4.02, 3.67
α-D-GalpNAc-(1→ (GaN'')	98.2 4.95	51.0 4.21	69.0 3.96	69.7 4.01	72.2 4.00	62.4 3.77, 3.75
→6)-β-D-GlcpNAc (GNβ)	96.4 4.72	57.9 3.68	75.2 3.53	70.7 3.59	75.6 3.59	66.7 3.97, 3.74
Полимер II						
-1)-snGro-(3-P- (Gro) 2) ↑	65.9*** 4.21, 4.18	78.2 4.21	66.2*** 4.12, 4.11			
β-D-Glcp-(1 (G)	103.6 4.63	74.4 3.32	76.9 3.52	70.9 3.40	77.2 3.47	61.5 3.92, 3.77

\* CH<sub>3</sub>CON при δ<sub>C</sub> 23.3, 23.4 и 176.8 м.д., 175.9 и δ<sub>H</sub> 2.07 м.д.;

\*\* <sup>31</sup>P при δ<sub>P</sub> –1.4 м.д.;

\*\*\* <sup>31</sup>P при δ<sub>P</sub> +0.5 м.д.

ном спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  (табл. 1). Из анализа химических сдвигов следует, что остатки  $\text{GN}\alpha$  и  $\text{GN}\beta$  замещены по гидроксилу при C-6 (слабополюсный сдвиг 66.7 и 66.8 м.д.; 61–62 м.д. в соответствующих незамещенных остатках), а остаток глицерина дополнительно замещен по гидроксилу при C-2 (78.2 м.д.).

Окончательное заключение о строении цепей полимеров следовало из анализа спектров  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  ROESY и  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (табл. 1). В спектре  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  ROESY наблюдалась корреляция аномерных протонов остатков  $\text{GaN}$  и протонов при C-6 остатков  $\text{GN}$  (4.90/4.08; 3.69), что свидетельствовало о пространственной близости этих атомов и наличии 1→6 связи между остатками. Корреляционный пик H-1 (G)/H-2 (Gro) (4.63/4.21) типичен для 1→2 связи между этими остатками. Спектр  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC содержал корреляционные пики для атомов остатков, соединенных гликозидной связью: H-6,6' ( $\text{GN}\alpha$ )/C-1 ( $\text{GaN}'$ ) (4.02; 3.67/98.4) и ( $\text{GN}\beta$ )/C-1 ( $\text{GaN}''$ ) (3.97; 3.74/98.2) и H-2 (Gro)/C-1 (G) (4.21/103.6). Эти пики соответствуют структуре повторяющихся звеньев двух полимеров: -6)- $\alpha$ -GalpNAc-(1→6)- $\alpha$ -GlcPNAc-(1-P- (Полимер I) и -1)-[ $\beta$ -GlcP-(1→2)]-snGro-(3-P- (Полимер II).

Таким образом, с использованием ЯМР-спектроскопических методов нами впервые установлены полные структуры углеводсодержащих полимеров клеточной стенки *A. crystallopoietes*. Идентифицированные полимеры представляют собой тейхоевую кислоту – 1,3-поли(глицерофосфат), замещенный остатками  $\beta$ -глюкозы, и дигликозил-1-фосфатный полимер с повторяющимся звеном -6)- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1→6)- $\alpha$ -D-GlcPNAc-(1-P-. Бесфосфатные гликополимеры, свойственные другим изученным видам группы “*A. globiformis*” и *Arthrobacter sensu lato* (Садиков с соавт., 1983; Takeuchi, Yokota, 1989), у *A. crystallopoietes* обнаружены не были.

Для уточнения таксономического статуса *A. crystallopoietes* нами были определены значения ААИ и РОСР (табл. 2). Дендрограмма (рис. 2) отражает сходство исследованных штаммов по показателям РОСР (90 коровых генов, длина белковых последовательностей 31358 аминокислот). Как видно, *A. crystallopoietes* образует общую группу с *A. citreus*, но оба вида обособлены друг от друга, а также от *A. globiformis*, и других видов *Micrococccaceae*, о чем свидетельствуют значения РОСР и ААИ на родовом уровне (табл. 2).

Значение РОСР для *A. crystallopoietes* и *A. citreus* (59.4%), а также для *A. crystallopoietes* по отношению к видам группы “*A. globiformis*” (*A. globiformis*, *A. pascens* и *A. oryzae*) (61.5%, 61.8% и 58.4% соответственно) близки или ниже, чем между типовыми видами родов *Micrococccaceae* (например, *A. globiformis* и *Paenarthrobacter aureescens* – 69.4%, *Acaricomys phytoseiuli* и *Psychromicrobium silvestre* – 63.5%, *Glutamici-*

*bacter protophormiae* и *Paeniglutamibacter sulfureus* – 63.0%, *Micrococcus luteus* и *Citricoccus muralis* – 62.9%).

Значения ААИ между *A. crystallopoietes* и каждым из видов группы “*A. globiformis*” – *A. globiformis* (64.6%), *A. pascens* (65.0%), *A. oryzae* (64.2%), а также между *A. crystallopoietes* и *A. citreus* (65.6%), были также близки или ниже значений для видов разных родов этой группы (табл. 2). Так, показатели ААИ составили соответственно 77.4%, 74.6%, 65.5% и 65.3% для *A. globiformis* и *Pseudarthrobacter polychromogenes*, *Paenarthrobacter aureescens*, *Specibacter cremeus* и *Sinomonas atrocyanea*. Определенные значения ААИ соответствуют междуродовым для некоторых других групп бактерий (Nicholson et al., 2020; Ramírez-Durán et al., 2021).

Таким образом, результаты таксогеномного анализа показывают, что *A. crystallopoietes* обособляется на родовом уровне от видов группы “*A. globiformis*” и *Arthrobacter sensu lato* в целом, а также от других представителей семейства *Micrococccaceae*. При этом *A. crystallopoietes*, в отличие от других видов рода *Arthrobacter*, имеющих пептидогликан типа А3 $\alpha$  и бесфосфатные (нейтральные) гликополимеры клеточной стенки (Садиков с соавт., 1983; Takeuchi, Yokota, 1989), характеризуется наличием фосфатсодержащих полимеров – тейхоевой кислоты [1,3-поли(глицерофосфата), замещенного остатками  $\beta$ -глюкозы] и поли(дигликозил-1-фосфата).

Полученные данные свидетельствуют о том, что состав и структура гликополимеров клеточной стенки может рассматриваться как важный диагностический признак нового рода, который будет описан в будущем на основе *A. crystallopoietes*.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1051), а также в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300094-7.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

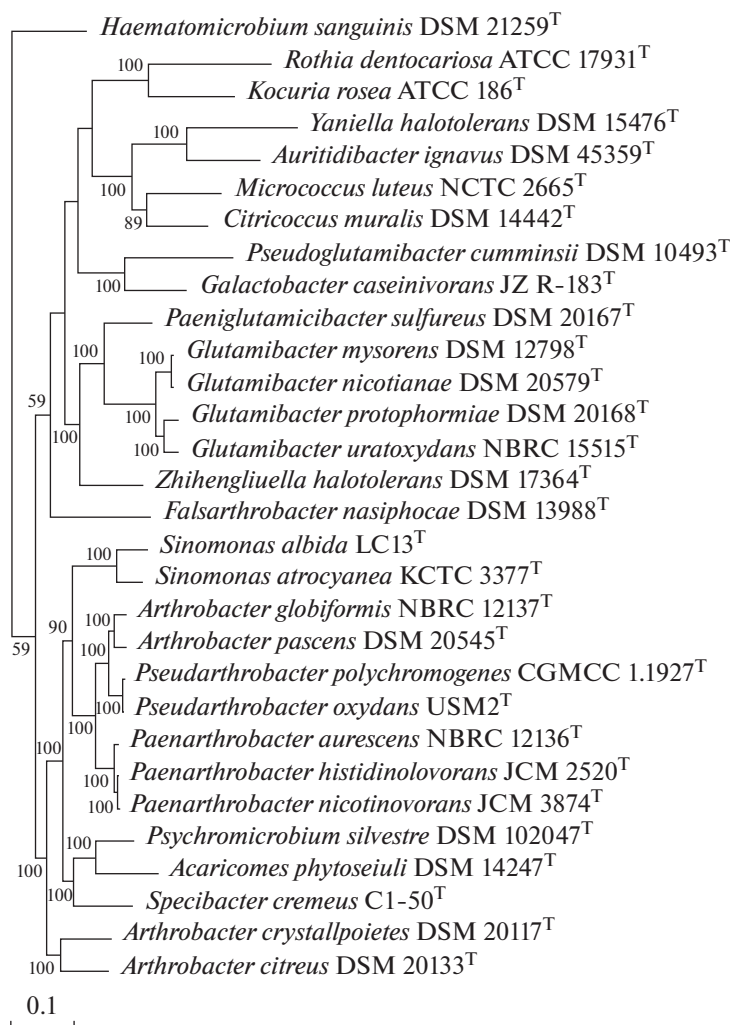
Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Потехина Н.В., Шапков А.С., Тульская Е.М., Арискина Е.В., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. Галактофуранан клеточной стенки актинобактерий рода *Paenarthrobacter* //

Таблица 2. Сходство (%) средней идентичности аминокислот (АА1) и консервативных белков (РОСР) 23 видов актинобактерий

№	Виды	Справа от диагонали – АА1; слева от диагонали – РОСР																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	*	61.5	61.8	58.4	59.4	60.1	60.2	56.3	57.3	52.5	50.8	46.8	54.3	52.2	47.9	46.2	59.0	62.9	60.0	39.9	49.4	57.3	53.8
2	<i>Arthrobacter globiformis</i>	64.6	*	79.9	70.0	55.5	55.6	55.3	56.9	56.2	56.9	56.5	48.6	47.9	48.0	48.9	43.9	69.4	54.7	72.1	37.8	53.4	61.0	56.6
3	<i>Arthrobacter pascens</i>	65.0	84.1	*	68.4	55.8	55.5	55.5	56.8	56.9	56.6	56.3	49.3	48.2	48.5	49.1	44.8	69.1	55.5	72.2	38.4	53.1	60.7	56.2
4	<i>Arthrobacter oryzae</i>	64.2	77.3	77.4	*	59.0	58.9	58.0	59.1	55.9	58.1	57.5	52.0	47.6	48.9	51.4	46.7	65.8	55.2	68.4	39.5	56.7	64.8	59.3
5	<i>Arthrobacter citreus</i>	65.6	62.9	63.0	63.2	*	89.4	83.4	63.7	59.5	57.1	55.7	54.8	55.1	54.2	55.2	52.3	60.2	57.5	58.6	45.0	55.5	55.9	55.5
6	<i>Arthrobacter koreensis</i>	65.8	63.0	63.1	63.1	91.9	*	83.2	64.3	59.8	57.6	55.3	55.4	55.6	54.4	55.9	53.3	59.2	58.1	58.9	46.4	55.5	55.8	54.6
7	<i>Arthrobacter luteolus</i>	65.7	62.4	62.9	63.0	83.2	82.9	*	61.1	58.5	56.2	54.8	52.4	55.1	53.7	53.2	50.4	59.2	57.2	58.1	44.1	53.8	55.1	55.0
8	<i>Arthrobacter agilis</i>	65.1	63.7	63.7	63.7	66.3	66.1	65.7	*	65.9	58.2	53.2	55.2	52.6	50.0	56.7	52.2	59.7	52.8	61.1	43.9	55.3	54.1	52.5
9	<i>Arthrobacter pigmenti</i>	65.1	62.9	63.2	62.8	65.0	65.0	64.9	68.9	*	55.0	51.3	50.4	48.9	47.7	53.4	46.9	58.8	52.0	58.5	39.5	53.5	51.7	53.6
10	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	61.2	63.9	63.6	63.4	61.5	61.3	61.0	61.1	60.0	*	57.2	53.6	48.1	52.3	53.4	47.6	63.1	53.6	60.1	40.4	57.8	52.9	60.7
11	<i>Arthrobacter woluwensis</i>	61.2	66.0	66.1	65.9	61.3	60.9	60.4	61.2	60.2	61.5	*	54.5	48.0	50.0	54.3	47.6	61.7	51.0	57.2	42.8	58.5	55.1	55.0
12	<i>Acaricomes phytoseiuli</i>	61.3	63.2	62.6	63.2	61.6	61.6	61.2	61.6	60.8	62.0	61.4	*	47.4	46.7	58.2	52.0	52.4	45.8	52.5	47.9	63.5	47.9	50.3
13	<i>Citricoccus muralis</i>	58.0	56.7	56.2	56.3	57.7	57.9	57.4	57.4	56.0	55.2	55.6	55.7	*	52.1	47.8	62.8	50.0	54.3	49.3	46.3	45.9	48.6	46.4
14	<i>Glutamicibacter protophormiae</i>	58.1	56.6	56.7	56.9	57.8	57.5	57.6	57.0	55.9	56.7	56.6	56.2	55.4	*	47.2	50.1	52.3	63.0	49.8	45.1	46.8	48.6	49.8
15	<i>Haematomicrobium sanguinis</i>	59.4	58.8	58.9	58.7	59.7	59.6	59.3	59.3	58.8	57.3	58.0	59.9	54.8	55.0	*	51.4	53.1	47.5	51.5	44.8	57.2	47.4	49.7
16	<i>Micrococcus luteus</i>	57.1	56.5	56.6	56.8	57.3	57.6	57.4	57.3	56.1	55.3	56.1	56.4	63.3	55.8	55.9	*	46.2	48.7	46.3	51.1	48.0	44.6	44.9
17	<i>Paenarthrobacter aureus</i>	64.2	74.6	75.4	73.5	63.2	63.1	62.9	63.7	62.9	63.9	66.2	62.5	56.1	57.0	58.7	56.0	*	55.6	71.2	39.8	57.6	60.3	58.4
18	<i>Paeniglutamicibacter sulfureus</i>	62.2	59.5	60.1	60.0	60.5	60.6	60.5	59.7	58.9	59.1	58.8	58.2	57.3	63.4	56.7	56.6	60.4	*	54.8	43.7	48.1	53.7	53.4
19	<i>Pseudarthrobacter polychromogenes</i>	64.9	77.4	77.8	76.0	63.8	64.3	63.3	64.2	63.3	64.1	65.9	62.6	56.9	56.7	58.7	56.4	74.6	60.4	*	39.3	54.5	60.5	55.0
20	<i>Pseudoglutamicibacter cummingsii</i>	55.2	54.1	54.2	54.3	55.1	55.4	55.0	54.2	53.5	53.4	54.2	54.2	54.8	55.1	53.2	55.0	54.3	55.9	54.2	*	42.9	39.2	39.7
21	<i>Psychromicrobium silvestre</i>	62.0	64.5	64.3	64.3	61.9	61.9	61.3	62.4	61.6	63.6	62.2	68.7	55.2	56.0	59.3	55.9	64.1	58.1	64.0	54.1	*	52.3	56.4
22	<i>Sinomonas atrocyanea</i>	62.0	65.3	64.9	65.7	61.7	61.7	61.2	61.7	60.6	60.8	63.9	61.7	57.0	56.6	58.2	57.1	64.7	59.4	65.2	55.0	62.5	*	56.6
23	<i>Specibacter cremeus</i>	63.2	65.5	65.1	65.3	62.3	62.3	61.9	62.4	61.8	70.4	62.8	63.1	56.2	57.3	58.6	56.8	64.7	60.1	64.8	54.5	65.1	63.4	*



**Рис. 2.** Дендрограмма, построенная на основе конкатенированных последовательностей 90 консервативных белков (31358 аминокислот) по методу максимального правдоподобия (Maximum-Likelihood) с использованием ресурсов web-сервера M1CR0B1AL1Z3R (<https://microbializer.tau.ac.il/index.html>; Avram et al., 2019). В качестве внешней группы использовали штамм *Microbacterium lacticum* DSM 20427. Цифрами у оснований ветвлений показаны величины статистической достоверности (bootstrap) > 50% (100 повторов). Масштаб соответствует одной замене на каждые 100 нуклеотидов.

Микробиология. 2021. Т. 90. С. 122–128. (Potekhina N.V., Shashkov A.S., Ariskina E.V., Tul'skaya E.M., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. Cell wall galactofuranan of the *Paenarthrobacter actinobacteria* // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 106–111).  
<https://doi.org/10.1134/S0026261720060156>

Садиков Б.М., Потехина Н.В., Кузнецов В.Д., Наумова И.Б. Обнаружение тейхоевых кислот в клетках бактерий рода *Arthrobacter* // ДАН СССР. 1983. Т. 271. С. 459–461. (Sadikov B.M., Potekhina N.V., Kuznetsov V.D., Naumova I.B. Detection of teichoic acids in cells of bacteria of the genus *Arthrobacter* // Doklady Akademii Nauk SSSR. 1983. V. 271. P. 459–461).

Шашков А.С., Тульская Е.М., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И., Потехина Н.В. Гликозил-1-фосфатные полимеры и тейхулозоновая кислота из клеточной стенки *Glutamibacter protophormiae* VKM Ac-2104<sup>T</sup> // Биохимия. 2020а. Т. 85. С. 736–742. (Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Do-

rofeeva L.V., Evtushenko L.I., Potekhina N.V. Two glycosyl 1-phosphate polymers and teichulosonic acid from *Glutamibacter protophormiae* VKM Ac-2104<sup>T</sup> cell wall // Biochemistry (Moscow). 2020а. V. 85. P. 629–635).

Шашков А.С., Тульская Е.М., Стрешинская Г.М., Дмитренко А.С., Потехина Н.В., Сенченкова С.Н., Пискункова Н.Ф., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. Рамноманнаны и тейхуроносовая кислота из клеточной стенки *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603<sup>T</sup> // Биохимия. 2020б. Т. 85. С. 428–437. (Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Streshinskaya G.M., Dmitrenko A.S., Potekhina N.V., Senchenkova S.N., Piskunkova N.F., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I., Rhamnomannans and teichuronic acid from cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603<sup>T</sup> // Biochemistry (Moscow). 2020б. V. 85. P. 369–377).

Avram O., Rapoport D., Portugez S., Pupko T. M1CR0B1AL1Z3R—a user-friendly web server for the analysis of large-scale microbial genomics data // Nucleic Acids

- Res. 2019. V. 47. P. W88–W92.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz423>
- Busse H.J. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 9–37.
- Busse H.-J., Moore E.R.B. Reclassification of *Arthrobacter nasiphocae* (Collins et al. 2002) as *Falsarthrobacter nasiphocae* gen. nov., comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 1361–1364.
- Busse H.-J., Wieser M., Buczolitz S. Genus III. *Arthrobacter* Cohn and Dimmick 1947, 301<sup>AL</sup> emend Koch, Schumann and Stackebrandt 1995, 838 // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. / Eds. Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M., Suzuki K.-i., Ludwig W. and Whitman W.B. New York e.a.: Springer, 2012. V. 5. Part A. P. 578–624.
- 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.
- Evtushenko L.I., Ariskina E.V. *Nocardioideaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. Whitman W.B. 2015. P. 1–18.  
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00042>
- Fiedler F., Schäffler M.J. Teichoic acids in cell wall of strains of “*nicotiana*” group of *Arthrobacter*: a chemotaxonomic marker // System. Appl. Microbiol. 1987. V. 9. P. 16–21.
- Goodfellow M., Jones A.L. *Corynebacteriales* ord. nov. // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. Whitman W.B. 2015. P. 1–14.  
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.obm00009>
- Kim D., Park S., Chun J. Introducing EzAAI: a pipeline for high throughput calculations of prokaryotic average amino acid identity // J. Microbiol. 2021. V. 59. P. 476–480.
- Kohler T., Xia G., Kulauzovic E., Peschel A. Teichoic acids, lipoteichoic acids, and related cell wall glycopolymers of Gram-positive bacteria // Microbial Glycobiology: Structures, Relevance and Applications / Eds. Moran A., Holst O., Brennan P., von Itzstein M. Amsterdam: Elsevier, 2009. P. 75–91.
- Konstantinidis K.T., Tiedje J.M. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 6258–6264.
- Nicholson A.C., Gulvik C.A., Whitney A.M., Humrighouse B.W., Bell M.E., Holmes B., Steigerwalt A.G., Villarma A., Sheth M., Batra D., Rowe L.A., Burroughs M., Pryor J.C., Bernardet J.F., Hugo C., Kämpfer P., Newman J.D., McQuiston J.R. Division of the genus *Chryseobacterium*: Observation of discontinuities in amino acid identity values, a possible consequence of major extinction events, guides transfer of nine species to the genus *Epilithonimonas*, eleven species to the genus *Kaistella*, and three species to the genus *Halpernia* gen. nov., with description of *Kaistella daneshvariae* sp. nov. and *Epilithonimonas vandammei* sp. nov. derived from clinical specimens // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 4432–4450.
- Nouioui I., Carro L., Garcia-Lopez M., Meier-Kolthoff J.P., Woyke T., Kyrpides N.C., Pukall R., Klenk H.P., Goodfellow M., Goker M. // Genomebased taxonomic classification of the phylum Actinobacteria / Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 2007.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02.007>
- Pantiukh, K., Grouzdev D. POCP-matrix calculation for a number of genomes // Figshare. 2017.  
<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.4577953.v1>
- Potekhina N.V., Streshinskaya G.M., Tul'skaya E.M., Shashkov A.S. Cell wall teichoic acids in the taxonomy and characterization of Gram-positive bacteria // Taxonomy of Prokaryotes, Methods in Microbiology / Eds. Rainey F.A., Oren A. London: Academic Press, 2011. V. 38. Ch. 6. P. 132–164.
- Qin Q.L., Xie B.B., Zhang X.Y., Chen X.L., Zhou B.C., Zhou J., Oren A., Zhang Y.Z. A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights // J. Bacteriol. 2014. V. 196. P. 2210–2215.
- Ramírez-Durán N., de la Haba R.R., Vera-Gargallo B., Sánchez-Porro C., Alonso-Carmona S., Sandoval-Trujillo H., Ventosa A. // Taxogenomic and comparative genomic analysis of the genus *Saccharomonospora* focused on the identification of biosynthetic clusters PKS and NRPS / Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 603791.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.603791>
- Rodriguez-R L.M., Konstantinidis K.T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes // Peer J. Preprints. 2016. 4:e1900v1.  
<https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1900v1>
- Salam N., Jiao J.Y., Zhang X.T., Li W.J. Update on the classification of higher ranks in the phylum *Actinobacteria* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 1331–355.
- Schleifer K.H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications // Bacteriol. Rev. 1972. V. 36. P. 407–477.
- Schumann P. Peptidoglycan Structure // Taxonomy of Prokaryotes, Methods in Microbiology / Eds. Rainey F.A., Oren A. London: Academic Press, 2011, V. 38, Ch. 6. P. 101–129.
- Schumann P., Kämpfer P., Busse H.-J., Evtushenko L.I. Proposed minimal standards for describing new genera and species of the suborder *Micrococccineae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 1823–1849.
- Takeuchi M., Yokota A. Cell-wall polysaccharides in coryneform bacteria // J. Gen. Appl. Microbiol. 1989. V. 35. P. 233–252.
- Zhou Y., Wei W., Wang X., Lai R. Proposal of *Sinomonas flava* gen. nov., sp. nov., and description of *Sinomonas atrocyanea* comb. nov. to accommodate *Arthrobacter atrocyaneus* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 259–263.



## Cell Wall Glycopolymers as a Diagnostic Trait of *Arthrobacter crystallopoietes*

N. V. Potekhina<sup>1, \*</sup>, E. V. Ariskina<sup>2</sup>, A. S. Shashkov<sup>3</sup>, T. M. Tul'skaya<sup>1</sup>, and L. I. Evtushenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

<sup>2</sup>All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

<sup>3</sup>Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: potekhina56@mail.ru

Received November 26, 2021; revised January 18, 2022; accepted January 21, 2022

**Abstract**—The composition and structure of the cell wall glycopolymers from *Arthrobacter crystallopoietes* VKM Ac-1107<sup>T</sup> (family *Micrococcaceae*, phylum *Actinobacteria*), previously assigned to the “*A. globiformis*” group based on the high similarity of 16S rRNA gene sequences and traditional chemotaxonomic markers were studied. Teichoic acid – 1,3-poly (glycerol phosphate) substituted with  $\beta$ -glucose residues, and diglycosyl 1-phosphate polymer with -6)- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1  $\rightarrow$  6)- $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1-*P*- repeating unit were identified by chemical and NMR spectroscopy methods. The results of phylogenomic (taxogenomic) analysis, *viz.* determination of the average amino acid identity (AAI) and the similarity of conserved proteins (ПОСР), indicate that *A. crystallopoietes* belongs to a new genus and the composition of the cell wall glycopolymers may serve as a diagnostic characteristic of this genus, which will be described on the basis of *A. crystallopoietes*.

**Keywords:** *Arthrobacter crystallopoietes*, cell wall glycopolymers, teichoic acids, systematics, taxogenomics