

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ANCYLOBACTER CRIMEENSIS SP. NOV. – НОВЫЙ ВИД АЭРОБНЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ФИЛЛОСФЕРЫ ДУБА

© 2023 г. А. А. Белова^{а, *}, Е. Н. Капаруллина^а, Н. В. Агафонова^а, Д. С. Груздев^б, Д. С. Копицын^с,
А. В. Мачулин^а, Н. В. Доронина^а

^аФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук, Пушкино, 142290 Россия

^бSciBear OU, Таллинн, 10115 Эстония

^сФГАУ ВО РГУ нефти и газа (НИУ) им. И.М. Губкина, Москва, 119991 Россия

*e-mail: alina.belova2023@gmail.com

Поступила в редакцию 29.03.2023 г.

После доработки 20.04.2023 г.

Принята к публикации 22.04.2023 г.

Из филлосферы дуба пушистого (*Quercus pubescens* Willd.) на среде с метанолом выделен новый факультативный метилотроф – штамм 6х-1^Т. Изолят представлен аэробными грамотрицательными неспорообразующими неподвижными короткими овоидными палочками, размножается бинарным делением. Оптимально растет при 25–29°C и pH 7.0–7.5, рост ингибируется при 1.5% NaCl. В жирнокислотном составе клеток преобладают C_{18:1ω7c} и C_{19:0cyclo} кислоты. Доминирующими фосфолипидами являются фосфатидилэтаноламин, фосфатидилмонометилэтаноламин и дифосфатидилглицерин. Основной убихинон – Q₁₀. Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма 6х-1^Т имеет наибольший уровень сходства с таковыми у представителей рода *Ancylobacter* (97.0–97.4%). Анализ геномов штамма 6х-1^Т и ближайших представителей рода *Ancylobacter* показал, что уровни ANI (80.7–83.5%), dDDH (22.4–23.3%), AAI (72.0–78.0%) и ROCP (62.0–69.0%) ниже рекомендованных пороговых значений для разделения видов прокариот. Размер генома штамма 6х-1^Т составляет 4.29 млн п.о., содержание (Г + Ц) в ДНК – 67.3%. На основании результатов филогенетического, филогеномного, фенотипического и хемотаксономического анализов штамм 6х-1^Т (=VKM B-3256^Т=CCUG 72401^Т=KCTC 92567^Т) представляет новый вид рода *Ancylobacter*, для которого предложено название *Ancylobacter crimeensis* sp. nov.

Ключевые слова: *Ancylobacter crimeensis* sp. nov., факультативный метилотроф, новый вид, метанол

DOI: 10.31857/S0026365623600128, **EDN:** YGLVXG

Род *Ancylobacter*, входящий в семейство *Xanthobacteraceae* порядка *Hyphomicrobiales* класса *Alphaproteobacteria*, предложен в 1983 г. Raj и соавт. (Raj et al., 1983). В настоящее время, согласно LPSN [https://lpsn.dsmz.de/genus/ancylobacter], этот род насчитывает 12 видов, имена которых были валидированы: *A. aquaticus* (Ørskov 1928; Raj 1983), *A. rudongensis* (Xin et al., 2004), *A. polymorphus* и *A. vacuolatus* (Xin et al., 2006), *A. oerskovii* (Lang et al., 2008), *A. dichloromethanicus* (Firsova et al., 2009), *A. defluvii* (Порошина и соавт., 2013), *A. sonchi* (Агафонова et al., 2017), *A. pratisalsi* (Suarez et al., 2017), *A. lacus* и *A. plantiphilus* (Чемодурова и соавт., 2020), *A. gelatini* (Wang et al., 2022). Представители рода *Ancylobacter* имеют высокий уровень сходства между собой и родами *Starkeya*, *Angulomicrobium* и *Methylophobdus* по генам 16S рРНК, физиолого-биохимическим и хемотаксономиче-

ским свойствам. На основании этих признаков, а также анализа геномных данных недавно была проведена реклассификация родов *Starkeya*, *Angulomicrobium* и *Methylophobdus*, представители которых отнесены к роду *Ancylobacter* (Doronina et al., 2023).

Представители рода *Ancylobacter* представлены аэробными аспорогенными грамотрицательными палочковидными/плеоморфными или бобовидными клетками, размножаются бинарным делением. Основными жирными кислотами являются C_{18:1ω7c}, C_{19:0cyclo}, C_{16:0} и/или C_{18:0}, доминирующий убихинон – Q₁₀, содержание Г + Ц в ДНК – 67.0–69.7%. Все представители рода – факультативные метилотрофы, использующие наряду с C₁-соединениями широкий спектр полиуглеродных субстратов в качестве источника углерода и энергии,

хемоорганотрофы, большинство H_2 -литотрофы (Staley et al., 2015). Представители данного рода широко распространены в различных природных эконизах (активные илы, водная среда, донные отложения, почвы), играют важную экологическую роль, участвуя в процессах биоремедиации различных соединений: дихлорметана (Firsova et al., 2009), сульфонилмочевины и мышьяка (Lu et al., 2011), галогенированных алифатических соединений в водных отложениях (van den Wijngaard et al., 1992, 1993), некоторые виды являются фитосимбионтами и положительно влияют на рост и развитие растений (Banik et al., 2016; Agafonova et al., 2017; Nie et al., 2022).

Целью настоящей работы являлась физиолого-биохимическая и таксономическая характеристика нового метилотрофного изолята — штамма 6х-1^T, выделенного из филлосферы дуба пушистого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Штамм 6х-1^T изолирован с поверхности листьев дуба пушистого (*Quercus pubescens* Willd.), отобранных вблизи поселка городского типа Никита, Крым, Россия (44°30'40" с.ш., 34°14'05" в.д.).

Накопительную и чистую культуру выделяли на среде “К” с 0.5% (об./об.) метанола, как описано ранее (Чемодурова и соавт., 2020). Чистоту выделенной культуры контролировали световой микроскопией и по гомогенности колоний на агаризованных средах с метанолом и R2A (Reasoner’s 2A agar). В качестве референтных культур использовали *Ancylobacter aquaticus* DSM 101^T, *A. rudongensis* DSM 17131^T, *A. vacuolatus* DSM 1277^T, *A. polymorphus* DSM 2457^T, *A. dichloromethanicus* DM16^T (BKM B-2484^T), *A. lacus* F30L^T (BKM B-3280^T), *A. defluvii* SK15^T (BKM B-2789^T), *A. planthiphilus* 1TC^T (BKM B-3219^T), *A. sonchi* Osot^T (BKM B-3145^T).

Микроскопия. Морфологию клеток исследовали с помощью фазово-контрастной микроскопии с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ci (“Nikon”, Япония), оснащенного камерой ProgRes SpeedXT core5 (“Jenoptik”, Германия). Электронную микроскопию осуществляли на сканирующем электронном микроскопе JSM-6510LV (“JEOL”, Япония), как описано ранее (Чемодурова и соавт., 2020).

Физиолого-биохимическая и хемотаксономическая характеристика. Температурный диапазон роста определяли, выращивая культуру на жидкой среде “К” с метанолом и среде R2A при температуре от 4 до 42°C. Рост при различных значе-

ниях pH исследовали на среде “К” в диапазоне pH 5.0–10.0.

Способность штамма 6х-1^T использовать различные органические соединения (углеводы, органические кислоты, аминокислоты, метилированные амины) в качестве источника углерода и энергии проводили на минеральной среде “К”, в которую вместо метанола вносили 0.3% (в./об.) испытуемого вещества, инокулировали аликвотой культуры из логарифмической фазы роста на среде с метанолом (10% посевного) и инкубировали 14 сут при оптимальной температуре. Спирты вносили в количестве 0.2–0.5% (об./об.), контролем служила среда без источника углерода. Способность к росту на тиоцианате и тиосульфате оценивали, как описано ранее (Doronina et al., 2023). Для определения спектра используемых субстратов и выявления некоторых биохимических свойств исследуемого штамма использовали также API тесты (API 20E, API 20NE; “Bio-Merieux”, Франция), следуя инструкции фирмы-производителя. Рост в атмосфере метана, дихлорметана или $H_2/CO_2/O_2$ анализировали, как описано ранее (Kaparullina et al., 2017).

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 исследуемой культуры, выращенной на агаризованной среде.

Устойчивость к антибиотикам определяли с помощью дисков (“Bioanalyse”, Турция), пропитанных антибиотиками на агаризованной среде “К” с 0.5% (об./об.) метанола.

Способность к синтезу индолпроизводных определяли, как описано ранее (Gordon, Weber, 1951). Фосфатсольюбилизирующую активность определяли в модифицированной среде “К” с нерастворимым $Ca_3(PO_4)_2$ (5 г/л) в качестве единственного источника фосфора по ранее описанной методике (Агафонова и соавт., 2013). Способность к синтезу сидерофоров проводили, используя универсальную методику с реактивом храмазуолом S (CAS-реактив) (Schwyn et al., 1987).

Фосфолипидный состав клеток анализировали двумерной тонкослойной хроматографией (Doronina et al., 2012). Для определения жирнокислотного состава клетки выращивали на агаризованной среде R2A в течение 48 ч, анализ проводили с помощью ГХ-МС (Thermo Scientific Trace GC Ultra DSQ II, колонка HP-5MS, EI70 eV), как описано ранее (Härtig, 2008; Slobodkina et al., 2020).

Протеомный MALDI-TOF/MS анализ проводили с использованием времяпролетного Autoflex speed масс-спектрометра с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (“Bruker Daltonik GmbH”, Германия) как описано ранее (Doronina et al., 2023).

Секвенирование гена 16S рРНК и филогенетический анализ, основанный на сравнении генов 16S рРНК и НАД⁺-зависимых формиадегидрогеназ (НАД⁺-ФДГ). ДНК выделяли с использованием набора ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kit (“Zymo Research”, США) согласно инструкции производителя. Ген 16S рРНК амплифицировали методом ПЦР с использованием универсальных праймеров для прокариот 27f и 1492r (Lane, 1991), секвенирование ПЦР – фрагментов проводили, как описано ранее (Doronina et al., 2023).

Поиск аминокислотных последовательностей НАД⁺-ФДГ штамма 6х-1^T и референтных штаммов проводили в геномах, доступных в базах данных NCBI GenBank [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/] и JGI [https://img.jgi.doe.gov/]. Филогенетический анализ, основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, а также аминокислотных последовательностей НАД⁺-ФДГ, осуществляли с помощью пакетов программ BLAST [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/], ClustalW (Thompson et al., 1997) и MEGA5 (методы “maximum likelihood”, “neighbor-joining” и “maximum parsimony”) (Tamura et al., 2011), надежность построенных деревьев проверена значением “bootstrap” для 1000 деревьев.

Секвенирование генома, филогеномный анализ, расчет геномных индексов. ДНК штамма 6х-1^T для секвенирования генома выделяли с использованием набора QIAamp DNA minikit (“Qiagen”). Геном секвенировали с использованием платформы DNBSEQ-G400 (“MGI Tech”, China) (в формате парных чтений 2 × 150 п.о.). Чтения низкого качества обрабатывали с помощью программы Trimmomatic v.0.39 (Bolger et al., 2014), сборку генома проводили с использованием программы SPAdes v.3.15.0 (Bankevich et al., 2012). На конечном этапе получено 26 контигов общим размером 4296055 п.о. (значение N50 – 389515 п.о.). Аннотация генома выполнена с использованием NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP; v.4.7) (Tatusova et al., 2016). Последовательность генома штамма 6х-1^T депонирована в базе данных DDBJ/ENA/GenBank под номером JALKCH000000000.

Таксономическую принадлежность штамма 6х-1^T определяли согласно таксономии GTDB с использованием программы GTDB-Tk v. 1.5.0 (Chaumeil et al., 2020). Филогеномный анализ, основанный на анализе 120 консервативных мар-

керных однокопийных белков, осуществляли с помощью программы IQ-TREE 2 (Nguyen et al., 2015) с быстрым выбором модели посредством ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017), “bootstrap” оценивали с помощью UFBoot2 (Hoang et al., 2018), как описано ранее (Doronina et al., 2023).

Средние значения идентичности нуклеотидов (ANI) и ДНК–ДНК гибридизации *in silico* (dDDH) рассчитывали с помощью сервисов [https://ani.jgi.doe.gov/html/calc.php?] (Varghese et al., 2015) и GGDC 2.1 [https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php] (Meier-Kolthoff et al., 2013) соответственно. Значения средней аминокислотной идентичности (AAI) и попарный процент консервативных белков (POCP) рассчитывали с использованием репсупа get_homologues [https://github.com/ead-csic-compbio/get_homologues].

Поиск генов и их аннотацию проводили с помощью сервиса RAST [https://rast.nmpdr.org/] с последующей проверкой аннотации в результате сравнения последовательностей предсказанных белков с базами данных NCBI (Aziz et al., 2008).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология изолята. Штамм 6х-1^T был представлен аэробными грамотрицательными неподвижными короткими овоидными палочками (0.5–0.6 × 1.0–1.2 мкм) (рис. 1а, 1б), которые не образовывали капсул, спор и простек и размножались бинарным делением. На 3 сут роста на агаризованной среде “К” с 0.5% метанола при 29°C колонии были точечные (<1 мм) кремовые, круглые, матовые, с выпуклым профилем, ровным краем, однородной структурой и гладкой поверхностью.

Физиолого-биохимическая и хемотаксономическая характеристика. Исследуемый штамм рос на жидкой среде “К” с 0.5% метанола без агрегации клеток, пигмент не образовывал. Строгий аэроб, уреазо-, каталазо- и оксидазоположительный. Рос на метаноле (удельная скорость роста при оптимальных условиях – 0.09 ч⁻¹), метиламине, этаноле, арабинозе, ксилозе, раффинозе, фруктозе, сукцинате, манните, сорбите, тиоцианате, тиосульфате, а также в газовой смеси H₂/O₂/CO₂. Слабо рос на глюкозе, лактозе, мальтозе, сахарозе, малате, пирувате натрия, формиае натрия, серине, инозите. Рост не наблюдался в атмосфере метана, на диметиламине, формальдегиде, диметилсульфоксиде, глицерине и α-кетоглутарате. Обладал активностью β-гликозидазы, триптофандеаминазы и β-галактозидазы. Желатин не разжижал, крахмал не гидролизировал, H₂S не продуцировал.

Рос в диапазоне температур 17–37°C и pH 6.0–8.5. Оптимальный рост наблюдался при 25–29°C и pH 7.0–7.5 на среде с 0.5% метанола и

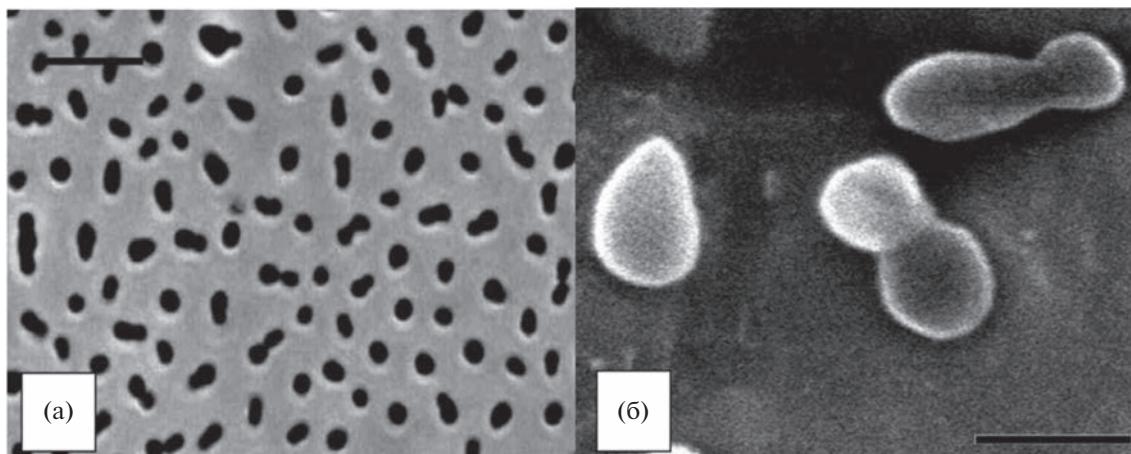


Рис. 1. Морфология клеток штамма 6x-1^T: (а) — фазовый контраст, длина масштабной метки 10 мкм; (б) — сканирующая электронная микроскопия, длина масштабной метки 1 мкм.

0.5% NaCl. Ингибировался 1.5% NaCl. Обладал устойчивостью к действию новобиоцина, налидиксовой кислоты, пенициллина, линкомицина, эритромицина и хлорамфеникола; был чувствителен к тетрациклину, стрептомицину, неомицину, канамицину и гентамицину.

В жирнокислотном составе клеток штамма 6x-1^T преобладали C_{18:1}ω7c (87.4%), C_{19:0}cyclo (7.3%) и C_{16:0} (3.4%) кислоты. В целом профили жирных кислот, полученные в настоящем исследовании, согласуются с опубликованными ранее данными для представителей рода *Ancylobacter* (табл. 1) (Doronina et al., 2023).

Основной убихинон — Q₁₀. В фосфолипидном составе клеток доминировали фосфатидилэтаноламин, фосфатидилмонометилэтаноламин и дифосфатидилглицерин, что согласуется с доминирующими фосфолипидами большинства представителей рода *Ancylobacter*.

Филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей генов 16S рРНК и НАД⁺—ФДГ. На филогенетическом дереве, основанном на сравнении генов 16S рРНК штамм 6x-1^T кластеризовался с представителями рода *Ancylobacter* (рис. 2). Сравнение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК выявило наибольший уровень сходства с *A. lacus* F30L^T (97.4%), *A. plantiphilus* 1TC^T (97.2%) и *A. polymorphus* DSM 2457^T (97.0%), что ниже рекомендованного порогового значения (98.65%) для таксономического разделения прокариот на уровне вида (Kim et al., 2014).

Для филогенетического анализа метилотрофных бактерий рода *Ancylobacter* ранее нами предложено использовать также аминокислотные последовательности белка НАД⁺—ФДГ (Чемодуро-

ва и соавт., 2023). Отмечено, что штамм 6x-1^T кластеризовался с известными представителями рода *Ancylobacter*, филогенетическое положение исследуемого штамма представлено на рис. 3. Было показано, что наибольшее сходство по белку НАД⁺—ФДГ штамм 6x-1^T имел с *A. sonchi* Osot^T (97.8%), *A. polymorphus* DSM 2457^T (97.5%), *A. defluvii* SK15^T (96.5%) и *A. lacus* F30L^T (95.8%).

MALDI-TOF/MS анализ выявил высокое разрешение метода для предварительной идентификации представителей рода *Ancylobacter* на видовом уровне. Установлено, что штамм 6x-1^T четко обособлялся от других представителей данного рода (рис. 4), что согласовывалось с результатами филогенетического анализа.

Характеристика генома, филогеномный анализ, расчет геномных индексов. Геном штамма 6x-1^T имел длину 4.29 млн п.о., содержание (Г + Ц) в ДНК — 67.3% (табл. 1), в геноме было предсказано 3908 генов: 3801 белок-кодирующих, 3 гена рРНК, 47 тРНК и 53 псевдогена.

Геномный анализ выявил, что штамм 6x-1^T и ближайшие представители рода *Ancylobacter* имели уровень средней нуклеотидной идентичности (ANI) 80.7–83.5%. Расчет уровня ДНК—ДНК гибридизации *in silico* (dDDH) продемонстрировал, что штамм 6x-1^T имел 23.3% сходства с *A. lacus* F30L^T, 22.7% с *A. sonchi* Osot^T, 22.4% с *A. defluvii* SK15^T. Эти рассчитанные геномные индексы были ниже рекомендованных пороговых значений (ANI = 95–96%, dDDH = 70%) для разграничения видов прокариот. Значения средней аминокислотной идентичности (AAI) варьировали в пределах 72.0–78.0%, а значения попарного процента консервативных белков (POCP) в пределах 62.0–69.0% с ближайшими представителями рода

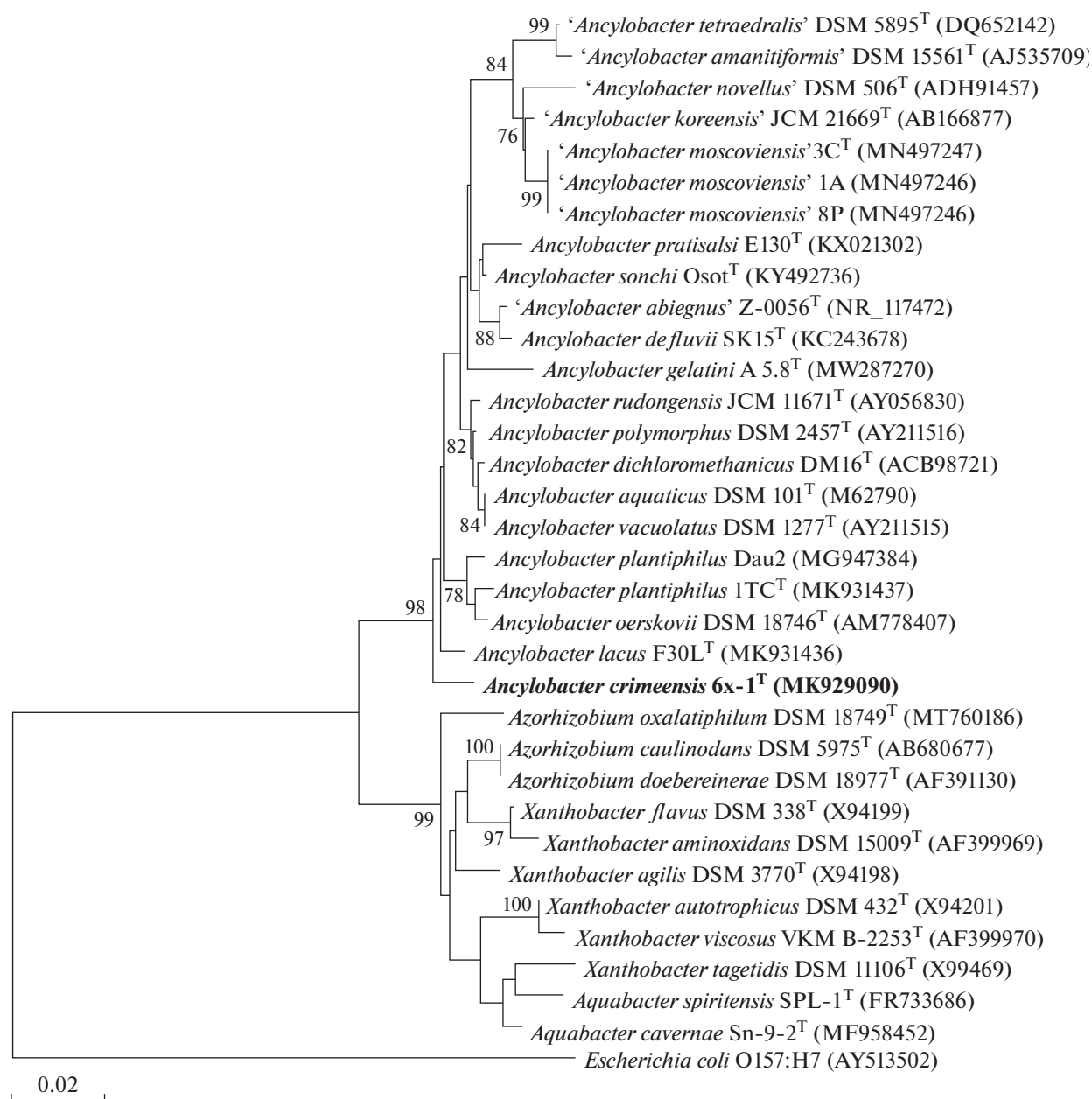


Рис. 2. Филогенетическое дерево, показывающее положение штамма 6x-1^T на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Показаны значения Bootstar >50%. Корень определен включением последовательности *Escherichia coli* O157:H7 (AY513502) в качестве внешней группы.

Ancylobacter. В соответствии с таксономическими стандартами (Konstantinidis et al., 2017; Chun et al., 2018), такие показатели геномного анализа указывают на принадлежность исследуемого штамма к новому виду. Полученные данные согласовывались с положением штамма 6x-1^T на филогенетическом дереве, основанном на анализе 120 конкатенированных последовательностей консерватив-

ных маркерных генов, где он кластеризовался с другими представителями рода *Ancylobacter* (рис. 5), но был достаточно удален от известных видов.

Как и другие известные представители рода *Ancylobacter*, штамм 6x-1^T являлся факультативным метилотрофом, который использовал метанол и метиламин, а также ряд полиуглеродных соединений в качестве источников углерода и

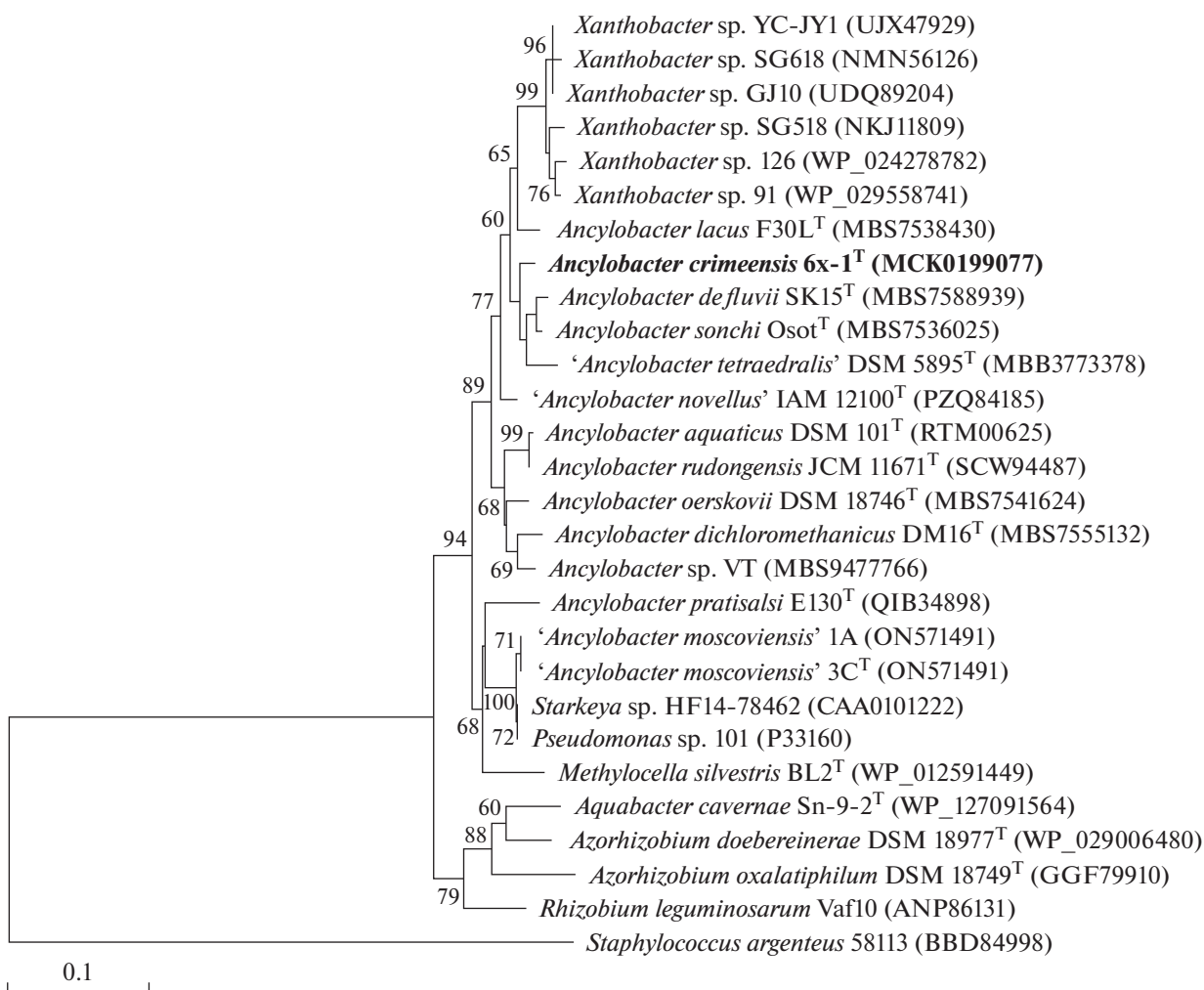


Рис. 3. Филогенетическая диаграмма, показывающая филогенетическое положение штамма 6x-1^T на основании сравнения аминокислотных последовательностей белка НАД⁺—ФДГ. Масштаб соответствует 10 аминокислотным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Показаны значения Bootstar >50%. Корень определен включением последовательности *Staphylococcus argenteus* 58113 в качестве внешней группы.

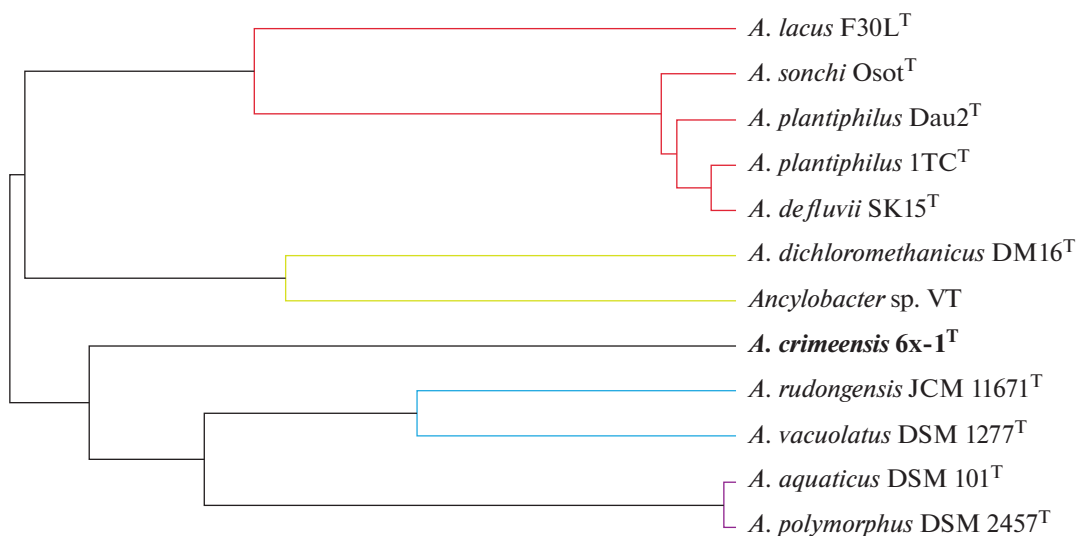


Рис. 4. Дендрогамма суммарных масс-спектров бактерий рода *Ancylobacter*, построенная с использованием программы BioTyper 2.0 ("Bruker Daltonics").

Таблица 1. Характеристика штамма 6х-1^T и ближайших представителей рода *Ancylobacter*

Характеристика	1	2	3	4
Морфология клеток	Палочковидные	Грушевидные	Палочковидные	Палочковидные
Размер клеток, мкм	0.5–0.6 × 1.0–1.2	1.0–1.5 × 2.0–2.2	0.4–0.5 × 0.6–1.0	0.6–0.7 × 0.8–1.0
Оптimum температуры, °C	25–29	25–29	22–29	29
Оптimum pH	7.0–7.5	7.0–7.5	7.5–8.0	7.0
Рост при 3% NaCl	–	–	–	+
Ассимиляция арабинозы	–	+	+	+
Ассимиляция глюкозата	–	–	+	+
Ассимиляция малата	–	+	–	+
Нитратредукция	–	–	–	+
Ростовые субстраты:				
формат	+/-	–	+/-	–
сахароза	+/-	+/-	+	–
мальтоза	+/-	+	–	–
малат	+/-	+/-	–	+
сукцинат	+	+	+	Н.о.
тиоцианат	+	Н.о.	+	+
тиосульфат	+	–	–	+/-
Доминирующие жирные кислоты	C _{18:1} ω7c, C _{19:0} cyclo, C _{16:0}	C _{18:1} ω7c, C _{16:0} , C _{18:0}	C _{18:1} ω7c, C _{16:0} , C _{19:0} cyclo, C _{18:0}	C _{18:1} ω7c, C _{16:0} , C _{19:0} cyclo, C _{18:0}
Доминирующие фосфолипиды	PE, PME, DPG	PE, PC, PG, DPG	PE, PG, PC, DPG	PE, PC, DPG
Г + Ц, %	67.3	69.7	67.6	67.2
Размер генома, млн п.о.	4.29	4.63	5.80	5.28
Номер генома в GenBank	JANSCQH0000000000	GANBGE0000000000	JANBGF0000000000	JANBGD0000000000

Штаммы: 1, 6х-1^T; 2, *A. latus* F30L^T (Чемодурова и соавт., 2020); 3, *A. sonchi* Osot^T (Agaonova et al., 2017); 4, *A. defluvii* SK15^T (Poroshina et al., 2013; Suarez et al., 2017). “+/-” – слабый рост; н.о. – не определяли, PE – фосфатидилэтанолламин, PME – фосфатидилмоноэтанолламин, DPG – фосфатидилглицерин, PC – фосфатидилхолин, PG – фосфатидилглицерин.

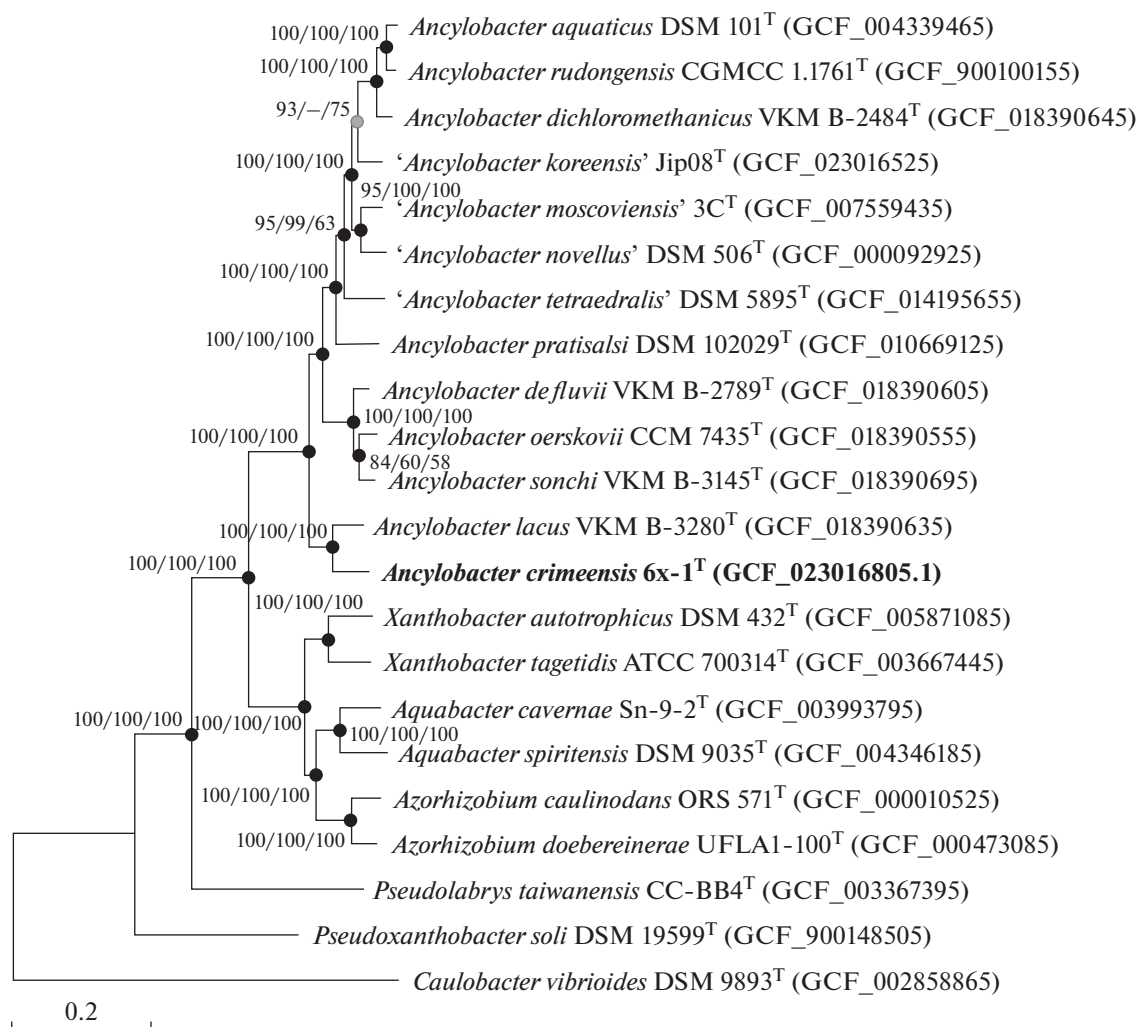


Рис. 5. Филогенетическое дерево, основанное на последовательностях 120 однокопийных маркерных белков, штамма 6x-1^T и других представителей семейства Xanthobacteraceae. Дерево реконструировано методом maximum likelihood с помощью эволюционной модели LG + F + I + G4. Достоверность ветвления (bootstrap, узлах ветвей >50%) указана на основании 1000 альтернативных деревьев, в точках ветвления указаны: черные — для ML/NJ/MP методов, серые — ML/MP соответственно. Масштабная линейка представляет собой 0.2 аминокислотных замены на позицию. Корень определен включением последовательности *Caulobacter vibrioides* CB51^T (GCF_002858865) в качестве внешней группы.

энергии. Метанол окислял до формальдегида двумя метанолдегидрогеназами (МДГ): идентифицирован полный оперон, кодирующий классическую Ca^{2+} -зависимую МДГ (*mxaHFJGIRSACKLDE*, MWN34_13685–13625), и 2 копии гена *хоxF* (MWN34_17935, MWN34_05090), кодирующие лантаноид-содержащую МДГ. Выявлены гены, кодирующие ферменты окисления формальдегида (*fae*, MWN34_05280) и формиата (MWN34_11060–11080, MWN34_09715–09730), в т.ч. НАД⁺-ФДГ (MWN34_19435). Штамм 6x-1^T реализовывал рибулозобисфосфатный (РБФ) путь C_1 -метаболизма. В геноме обнаружены гены, кодирующие ферменты цикла Кальвин–Бенсон–Бассем: фосфорибулокиназа (MWN34_05225), рибулоз-

обисфосфаткарбоксилаза (*cbbLM*, MWN34_05240–MWN34_05245), фосфоглицераткиназа (MWN34_15400), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (MWN34_15390), триозофосфатизомерза (MWN34_12060), фруктозобисфосфатацетилтрансфераза (MWN34_15405), фруктозо-1,6-бисфосфатаза (MWN34_01135), транскетолаза (MWN34_15385, MWN34_05230), рибулозобисфосфат-3-эпимераза (MWN34_05255), рибулозо-5-фосфатизомераза (MWN34_04520).

Обнаружены кластеры генов прямого окисления метиламина (*mauBDEACJGL*, MWN34_13425–13460), а также гены, кодирующие ферменты N-метилглутаматного пути: N-метилглутаматдегидрогеназа (*mgdABCD*, MWN34_15720–15735), N-ме-

тилглутаматсинтаза (*mgsABC*, MWN34_17350–17360) и γ -глутамилметиламидсинтетаза (*gmaS*, MWN34_17345).

Экологическая роль. Изучение физиологических свойств и анализ генома штамма 6х-1^T, свидетельствует о том, что новый метилотроф, вероятно, являлся фитосимбионтом, как и некоторые другие представители рода *Ancylobacter* (Agafonova et al., 2017; Чемодурова и соавт., 2020). Штамм синтезировал индолпроизводные (фитогормоны ауксины) (11 ± 0.2 мкг/мл) при добавлении в среду предшественника – триптофана. На среде с CAS-агаром была выявлена способность штамма к синтезу сидерофоров, а в геноме обнаружены гены, участвующие в биосинтезе сидерофора – фускахелина. Впервые данный вид сидерофоров охарактеризован у умеренного термофила *Thermobifida fusca* (Dimise et al., 2008), а среди известных представителей рода *Ancylobacter* данный сидерофор ранее описан только у *A. pratensis* E130^T (Nie et al., 2022), при этом выявлено, что наличие генов биосинтеза фускахелина положительно влияло на способность штамма E130^T стимулировать рост растений. Подобно *A. pratensis* E130^T, у штамма 6х-1^T гены биосинтеза фускахелина также расположены единым кластером (MWN34_01655, MWN34_09905–09940).

Вместе с тем, исследуемый штамм обладал фосфатсольюбилизирующей активностью: на минеральной агаризованной среде с метанолом и трикальцийфосфатом (в качестве единственного источника фосфора) вокруг колоний образовывались зоны просветления (гало). Анализ генома также выявил наличие генов синтеза экзополифосфатазы (MWN34_00825), неорганической дифосфатазы (MWN34_15200), пирофосфатазы (MWN34_06990), щелочной (MWN34_08415) и кислой фосфатаз (MWN34_06380) и *phn* оперон (*phnDEC/FGHIJKLMN*, MWN34_00030–00040, MWN34_06895–06935), кодирующий С-Р-лиазный комплекс, известный широким спектром разлагаемых фосфонатов.

Дифференцирующая характеристика штамма 6х-1^T и ближайших представителей рода *Ancylobacter* представлена в табл. 1. Таким образом, по совокупности полученных данных – результатов физиолого-биохимического, филогенетического и филогеномного анализов, расчета геномных индексов (dDDH, ANI, AAI, POCP), использования МАЛДИ-МС анализа, выявлено, что штамм 6х-1^T является представителем нового вида рода *Ancylobacter*, для которого предложено название *Ancylobacter crimeensis* sp. nov.

Диагноз нового вида – *Ancylobacter crimeensis* sp. nov.

Ancylobacter crimeensis (cri.me.en'sis N.L., adj. *crimeensis*, pertaining to Crimea, относящийся к Крыму).

Аэробные грамотрицательные неспорообразующие неподвижные короткие овоидные палочки ($0.5–0.6 \times 1.0–1.2$ мкм), размножаются бинарным делением. На минеральной среде с метанолом на 3–5 сут роста колонии точечные (<1 мм) кремовые, круглые, матовые, с выпуклым профилем, ровным краем, однородной структурой и гладкой поверхностью. Каталазо-, оксидазо- и уреазоположительны. Оптимально растет при 25–29°C и pH 7.0–7.5 в присутствии в среде 0.5% метанола и 0.5% NaCl, рост ингибируется при 1.5% NaCl. Растет на метаноле, метиламине, этаноле, арабинозе, ксилозе, раффинозе, фруктозе, сукцинате, манните и сорбите, тиоцианате, тиосульфате, а также в газовой смеси H₂/O₂/CO₂. Слабо растет на глюкозе, лактозе, мальтозе, сахарозе, малате, пировате натрия, формиате натрия, серине, инозите. Рост не обнаружен в атмосфере метана, на диметиламине, формальдегиде, диметилсульфоксиде, глицерине и α -кетоглутарате. Растет на R2A, TSA и LB агаре. Обладает активностью β -глюкозидазы, триптофандеаминазы и β -галактозидазы. Не продуцирует H₂S. Синтезирует индолы. Желатин не разжижает. Не образует ацетоин. Крахмал не гидролизует. Устойчив к действию новобиоцина, налидиксовой кислоты, пенициллина, линкомицина, эритромицина и хлорамфеникола, но чувствителен к тетрациклину, стрептомицину, неомицину, канамицину и гентамицину. Основными фосфолипидами являются фосфатидилэтаноламин, фосфатидилмонометилэтаноламин и дифосфатидилглицерин. В жирнокислотном составе клеток преобладают C_{18:1 ω 7c} (87.4%), C_{19:0cyclo} (7.3%) и C_{16:0} (3.4%) кислоты. Основной убихинон – Q₁₀. Размер генома 4.29 млн п.о., содержание Г + Ц в ДНК 67.3%.

Типовой штамм 6х-1^T (=BKM B-3256^T=CCUG 72401^T=KCTC 92567^T) изолирован из филлосферы дуба пушистого (*Quercus pubescens* Willd.). Образец отобран вблизи пгт Никита, Республика Крым, Россия. Последовательность гена 16S рРНК штамма 6х-1^T депонирована в базе данных GenBank под номером MK929090. Геном штамма 6х-1^T депонирован в GenBank под номером JALKCH0000000000.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.Э. Трубицыну (ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино) за помощь в анализе геномных данных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2021-1051). Анализ жирных кислот выполнен Д.С. Копицыным в РГУ нефти и газа (НИУ) им. И.М. Губкина за счет гранта Российского научного фонда № 22-73-10224.

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.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А.Б., Е.Н.К., Н.В.А. — экспериментальные процедуры, филогенетический, биоинформационный анализ; Д.С.Г. — секвенирование генома, биоинформационный анализ; Д.С.К. — анализ жирных кислот; А.В.М. — световая и сканирующая микроскопия; Н.В.Д. — выделение чистой культуры, руководство работой; все авторы участвовали в написании и утверждении рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Агафонова Н.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Фосфатсольubilizing активность аэробных метиловых бактерий // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 28–32.
- Agafonova N.V., Kaparullina E.N., Doronina N.V., Trotsenko Y.A. Phosphatesolubilizing activity of aerobic methylotrophic bacteria // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 864–867.
- Порошина М.Н., Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Ковалевская Н.П., Троценко Ю.А. Галофильные и галотолерантные аэробные метиловых бактерии 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 methylotrophic bacteria from the technogenic Solikamsk biotopes // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 490–498.
- Чемодурова А.А., Капаруллина Е.Н., Мачулин А.В., Spröer C., Lang E., Доронина Н.В. *Ancylobacter lacus* sp. nov. и *Ancylobacter plantiphilus* sp. nov. — новые аэробные факультативно-метилотрофные бактерии, использующие метанол // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 42–51.
- Chemodurova A.A., Kaparullina E.N., Machulin A.V., Spröer C., Lang E., Doronina N.V. *Ancylobacter lacus* sp. nov. and *Ancylobacter plantiphilus* sp. nov. — novel aerobic facultative methylotrophic bacteria // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 35–43.
- Чемодурова А.А., Решетников А.С., Агафонова Н.В., Доронина Н.В. Гены, кодирующие НАД⁺-зависимые форматдегидрогеназы, в таксономии аэробных метилотрофных бактерий рода *Ancylobacter* // Микробиология. 2023. Т. 92. С. 98–102.
- Chemodurova A.A., Reshetnikov A.S., Agafonova N.V., Doronina N.V. Genes of NAD⁺-dependent formate dehydrogenases in taxonomy of aerobic methylotrophic bacteria of the genus *Ancylobacter* // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 834–838.
- Agafonova N., Kaparullina E., Trotsenko Y., Doronina N. *Ancylobacter sonchi* sp. nov., a novel methylotrophic bacterium from roots of *Sonchus arvensis* L. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 4552–4558.
- Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., De Jongh M., Disz T., Edwards R.A., Zagnitko O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology // BMC Genomics. 2008. V. 9. P. 1–15.
- Banik A., Mukhopadhyaya S.K., Dangar T.K. Characterization of N₂-fixing plant growth promoting endophytic and epiphytic bacterial community of Indian cultivated and wild rice (*Oryza* spp.) genotypes // Planta. 2016. V. 243. P. 799–812.
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A., Dvorkin M., Kulikov A., Lesin V., Nikolenko S., Pham S., Prjibelski A., Pyshkin A., Sirotkin A., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M., Pevzner P. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // J. Comput. Biol. 2012. V. 19. P. 455–477.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2114–2120.
- Chaumeil P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // Bioinformatics. 2020. V. 36. P. 1925–1927.
- Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., daCosta 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.
- Dimise E.J., Widboom P.F., Bruner S.D. Structure elucidation and biosynthesis of fuscachelins, peptide siderophores from the moderate thermophile *Thermobifida fusca* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 15311–15316.
- Doronina N.V., Chemodurova A.A., Grouzdev D.S., Koziaeva V.V., Shi W., Wu L., Kaparullina E.N. *Ancylobacter moscoviensis* sp. nov., facultatively methylotrophic bacteria from activated sludge and the reclassification of *Starkeya novella* (Starkey 1934) Kelly et al. 2000 as *Ancylobacter novellus* comb. nov., *Starkeya koreensis* Im et al. 2006 as *Ancylobacter koreensis* comb. nov., *Angulomicrobium tetradrale* Vasil'eva et al. 1986 as *Ancylobacter tetradralis* comb. nov., *Angulomicrobium ammanitiforme* Fritz et al. 2004 as *Ancylobacter ammanitiformis* comb. nov. // Antonie van Leeuwenhoek. 2023. V. 116. P. 153–170.
- Doronina N.V., Gogleva A.A., Trotsenko Y.A. *Methylophilus glucosoxydans* sp. nov., a restricted facultative methylotroph 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 methylotrophic 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.
- Härtig C. Rapid identification of fatty acid methyl esters using a multidimensional gas chromatography–mass spectrometry database // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1177. P. 159–169.
- Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 518–522.
- Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermin L.S. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates // Nature Methods. 2017. V. 14. P. 587–589.
- Kaparullina E.N., Trotsenko Yu.A., Doronina N.V. *Methylobacillus methanolivorans* sp. nov., a novel non-pigmented obligately methylotrophic bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 425–431.
- Kim M., Oh H.-S., Park S.-C., Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 346–351.
- Konstantinidis K.T., Roselló-Móra R., Amann R. Uncultivated microbes in need of their own taxonomy // ISME J. 2017. V. 11. P. 2399–2406.
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic acid Techniques in Bacterial Systematics / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. Chichester: John Wiley and Sons, 1991. P. 115–175.
- 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.
- Lu P., Jin L., Liang B., Zhang J., Li S., Feng Z., Huang X. Study of biochemical pathway and enzyme involved in met-sulfuronmethyl degradation by *Ancylobacter* sp. XJ-412-1 isolated from soil // Curr. Microbiol. 2011. V. 62. P. 1718–1725.
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.-P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // BMC Bioinform. 2013. V. 14. Art. 60.
- Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32. P. 268–274.
- Nie W., Zheng X., Wang S., Ahmad I., Zhu B. Genome resource of *Ancylobacter pratensis* E130T: a novel plant-growth-promoting bacterium isolated from the rhizosphere // Phytopathol. 2022. V. 112. P. 729–731.
- 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. Evol. Microbiol. 1983. V. 33. P. 397–398.
- Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores // Anal. Biochem. 1987. V. 160. P. 47–56.
- Slobodkina G.B., Merkel A.Y., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Pelomicrobium methylotrophicum* gen. nov., sp. nov. a moderately thermophilic, facultatively anaerobic, lithoautotrophic and methylotrophic bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // Extremophiles. 2020. V. 24. P. 177–185.
- Staley J.T., Jenkins C., Konopka A.E. *Ancylobacter* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Eds. Trujillo M.E., Dedysch S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A., Whitman W.B., 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00811>
- 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.
- Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. P. 6614–6624.
- 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 // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 4876–4882.
- van den Wijngaard A.J., Prins J., Smal A.J., Janssen D.B. Degradation of 2-chloroethylvinylether by *Ancylobacter aquaticus* AD25 and AD27 // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. P. 2777–2783.
- van den Wijngaard A.J., van der Kamp K.W., van der Ploeg J., Pries F., Kazemier B., Janssen D.B. Degradation of 1,2-dichloroethane by *Ancylobacter aquaticus* and other facultative methylotrophs // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. P. 976–983.
- Varghese N.J., Mukherjee S., Ivanova N., Konstantinidis K.T., Mavrommatis K., Kyrpides N.C., Pati A. Microbial species delineation using whole genome sequences // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. P. 6761–6771.
- 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.
- Xin Y.H., Zhou Y.G., Zhou H.L., Chen W.X. *Ancylobacter rundogensis* sp. nov., isolated from roots of *Spartina anglica* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 385–388.
- Wang P., Sheng H., Hong Yi, Debnath S.Ch., Cen Yan, Li K., Chen G., Xu J., Wu F., Guo Zh., Zheng D. *Ancylobacter gelatini* sp. nov., isolated from beach sediment of Zhairuo Island, China // Arch. Microbiol. 2022. V. 204. Art. 430.

***Ancylobacter crimeensis* sp. nov., a New Species of Aerobic Methylophilic Bacteria Isolated from Oak Phyllosphere**

**A. A. Belova¹*, E. N. Kaparullina¹, N. V. Agafonova¹, D. S. Grouzdev², D. S. Kopitsyn³,
A. V. Machulin¹, and N. V. Doronina¹**

¹*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences",*

Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

²*SciBear OU, Tallinn, 10115 Estonia*

³*Gubkin University, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: alina.belova2023@gmail.com

Received March 29, 2023; revised April 20, 2023; accepted April 22, 2023

Abstract—A new facultative methylotroph, strain 6x-1^T, was isolated from the phyllosphere of oak (*Quercus pubescens* Willd.) on the medium with methanol. Cells were aerobic, gram-negative, not-spore-forming, non-motile short ovoids rods reproducing by binary fission. Growth optimum was at 25–29°C and pH 7.0–7.5; growth was inhibited by 1.5% NaCl. Predominant fatty acids were C_{18:1}ω7c and C_{19:0}cyclo. Predominant phospholipids were phosphatidylethanolamine, phosphatidylmonomethylethanolamine, and diphosphatidylglycerol. The major ubiquinone was Q₁₀. The 16S rRNA gene sequence of strain 6x-1^T exhibited the highest similarity to those of members of the genus *Ancylobacter* (97.0–97.4%). Genome analysis of strain 6x-1^T and most closely related *Ancylobacter* strains revealed that the values of ANI (80.7–83.5%), dDDH (22.4–23.3%), AAI (72.0–78.0%), and POCP (62.0–69.0%) were below the recommended threshold values for prokaryotic species. Genome size of strain 6x-1^T was 4.29 × 10⁶ Mb, and G + C content was 67.3%. According to the results of phylogenetic, phylogenomic, phenotypic, and chemotaxonomic analysis, strain 6x-1^T (=VKM B-3256^T = CCUG 72401^T) represents a new species of genus *Ancylobacter*, for which the name *Ancylobacter crimeensis* sp. nov. is proposed.

Keywords: *Ancylobacter crimeensis* sp. nov., facultative methylotroph, new species, methanol