

***PALUDISPHAERA MUCOSA* SP. NOV., НОВЫЙ ПЛАНКТОМИЦЕТ СЕМЕЙСТВА *ISOSPHAERACEAE* ИЗ БОРЕАЛЬНОГО НИЗИННОГО БОЛОТА¹**

© 2023 г. А. А. Иванова^{a, *}, Д. Г. Наумов^a, И. С. Куличевская^a,
А. А. Мещерякова^{a, b}, С. Н. Дедыш^a

^aИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, почвенный факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: ivanovastasja@gmail.com

Поступила в редакцию 16.03.2023 г.

После доработки 28.03.2023 г.

Принята к публикации 29.03.2023 г.

Планктомицеты являются типичными обитателями северных болотных экосистем. В настоящей работе новый планктомицет рода *Paludisphaera*, штамм Pla2^T, был выделен из низинного болота бореальной зоны России. Изолят был представлен розово-пигментированными, одиночными или собранными в небольшие группы неподвижными сферическими клетками, размножающимися почкованием. Штамм Pla2^T являлся хемоорганотрофным психротолерантным мезофилом с оптимумом роста при pH 5.5–6 и температуре 15–20°C. Предпочтительными ростовыми субстратами нового планктомицета являлись полисахариды ксилан, ксантановая камедь и фитагель, а также некоторые сахара. Наиболее высокое сходство последовательности гена 16S рРНК штамма Pla2^T (97.9%) наблюдалось с последовательностью планктомицета “*Paludisphaera soli*” JC670^T, выделенного из почвы высокогорья Гималаев. С другими представителями рода *Paludisphaera*, “*P. rhizosphaerae*” JC665^T и *P. borealis* PX4^T, это сходство составляло 97.0 и 93.8% соответственно. Геном штамма Pla2^T, размером 8.21 млн п.о., содержал около 6.5 тыс. белок-кодирующих генов и 3 копии оперона рРНК. Содержание пар Г + Ц в ДНК составляло 67 мол. %. Сходство нуклеотидных последовательностей генома штамма Pla2^T и ранее описанных представителей рода *Paludisphaera* составило от 79.4 до 82.6%. Эти генотипические отличия, а также ряд фенотипических особенностей позволили отнести планктомицет из низинного болота к новому виду рода *Paludisphaera*, *Paludisphaera mucosa* sp. nov. с типовым штаммом Pla2^T (=KCTC92668^T = VKM В-3698^T).

Ключевые слова: планктомицеты, филум *Planctomycetota*, семейство *Isosphaeraceae*, род *Paludisphaera*, низинные болота, деструкция полисахаридов

DOI: 10.31857/S0026365623600104, **EDN:** RKYILM

Семейство *Isosphaeraceae* было сформировано в 2016 г. на основании данных сравнительного анализа последовательностей генов 16S рРНК культивируемых представителей филума *Planctomycetota* (Kulichevskaya et al., 2016). В настоящее время это единственное семейство порядка *Isosphaerales* (класс *Planctomycetia*). В состав семейства входят планктомицеты с клетками сферической формы, которые могут быть собраны в короткие цепочки, длинные нити или образовывать бесформенные агрегаты. Клетки этих планктомицетов покрыты кратериформными структурами, расположенными по всей поверхности. Деле-

ние клеток происходит путем почкования; дочерние клетки неподвижны. Представители семейства *Isosphaeraceae* являются хемоорганотрофными аэробами, хотя некоторые из них способны расти в микроаэробных условиях. Типовым родом данного семейства является род *Isosphaera* с единственным представителем *Isosphaera pallida* IS1B^T (Giovannoni et al., 1987), выделенным из горячего источника Северной Америки. Помимо *Isosphaera*, в состав семейства *Isosphaeraceae* входят роды *Singulisphaera* (Kulichevskaya et al., 2008), *Aquisphaera* (Bondoso et al., 2011), *Paludisphaera* (Kulichevskaya et al., 2016), *Tundrisphaera* (Kulichevskaya et al., 2017) и *Tautonia* (Kovaleva et al., 2019). Еще один род, *Candidatus Nostocoida*, представлен нитчатными планктомицетами, которые

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi: 10.31857/S0026365623600104 для авторизованных пользователей.

пока не получены в чистых культурах (Liu et al., 2001; Kulichevskaya et al., 2012).

Размеры геномов представителей *Isosphaeraeae* варьируют от 5.53 млн п.о. у *Isosphaera pallida* IS1B^T до 9.74 млн п.о. у *Singulisphaera acidiphila* DSM 18658^T (Göker et al., 2011; Ivanova et al., 2017). Примечательно, что во всех полных геномах этих бактерий были выявлены плазмиды в количестве от 1 до 4 (Ivanova et al., 2017).

Одной из характерных особенностей планктомицетов семейства *Isosphaeraceae* является наличие гидролитического потенциала. Таксономически охарактеризованные представители этого семейства способны утилизировать широкий спектр полисахаридов растительного и микробного происхождения (Dedysh, Ivanova, 2019). Геномы этих бактерий содержат большое количество генов гликозил-гидролаз, многие из которых не принадлежат ни к одному из известных семейств классификации CAZy (Ivanova et al., 2017).

Планктомицеты семейства *Isosphaeraceae* населяют широкий спектр наземных и водных экосистем, богатых органическим веществом. По данным молекулярных исследований, *Isosphaeraeae* является одной из численно доминирующих групп планктомицетов в бореальных и субарктических торфяных болотах (Serkebaeva et al., 2013; Moore et al., 2015; Dedysh, Ivanova, 2019). Работы по выделению новых микроорганизмов из этих экосистем имели своим результатом описание трех новых родов семейства (Kulichevskaya et al., 2008, 2016, 2017).

Настоящая работа была посвящена изучению планктомицета, штамма Pla2^T, выделенного из низинного болота бореальной зоны России и идентифицированного по данным анализа гена 16S рРНК как представитель рода *Paludisphaera*. В настоящее время этот род включает 3 таксономически описанных представителя — *P. borealis* PX4^T (Kulichevskaya et al., 2016), выделенный из торфа верхового болота, “*P. soli*” JC670^T из почвы высокогорья Гималаев (Kaushik et al., 2020) и “*P. rhizosphaerae*” JC665^T из почвы ризосферы (Lhingjakim et al., 2022).

Целью настоящего исследования явилось изучение совокупности морфологических, экофизиологических и геномных характеристик нового штамма Pla2^T, отличающих его от ранее описанных представителей рода *Paludisphaera*, и установление его таксономического статуса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Источник выделения и условия культивирования. Штамм Pla2^T был выделен из образца торфяной почвы (рН 7.1), отобранной в августе 2019 г. с глубины 5–10 см профиля низинного болота Ча-

розерское (Вологодская обл., 60°30'42" N, 38°38'59" E). Растительное сообщество места отбора образца было представлено ассоциацией *Carex lasiocarpa* и *Campylopus stellatum*. Электропроводность воды в этом низинном болоте варьировала в диапазоне 236–279 мкСм/см. Содержание общего органического углерода в отобранном образце торфа составляло 66.2%, общего азота — 2.4%. Более подробная характеристика места отбора образца приведена в ранее опубликованном исследовании (Dedysh et al., 2020).

Отобранный образец торфа был использован для получения накопительной культуры микроорганизмов, участвующих в гидролизе одного из ключевых биополимеров болотных экосистем — ксилана. Для этого в стеклянные флаконы объемом 160 мл, содержащие 2 г измельченного стерильными ножницами торфа и 0.1% березового ксилана (“Sigma-Aldrich”), было добавлено 30 мл нативной болотной воды. Инкубацию накопительной культуры проводили при комнатной температуре (20–22°C) в течение 8 нед. Изолят, штамм Pla2^T, был получен путем посева аликвоты (0.2 мл) накопительной культуры на среду M31 следующего состава (г/л дистиллированной воды): КН₂РО₄ — 0.1, N-ацетилглюкозамин — 0.5, пептон — 0.1, дрожжевой экстракт — 0.1, раствор солей Хатнера — 20 мл; раствор витаминов № 6 (Staley et al., 1992) — 1 мл; рН 7.0. В качестве желирующего агента использовали 1% раствор полисахарида микробного происхождения фитагеля (PhytaGel, “Fluka”). Очистку изолята проводили путем его рассева на аналогичную среду с добавлением ампициллина (200 мг/л). Посевы инкубировали при 22°C в течение трех недель.

Идентификация изолята. Выделение тотальной ДНК из клеток штамма Pla2^T производили с использованием набора FastDNA SPIN kit for soil (“Biol 101”, США) в соответствии с рекомендацией производителя. Полученную ДНК использовали в качестве матрицы в ПЦР-амплификации генов 16S рРНК со стандартными бактериальными праймерами 9F/1492R (Lane, 1991). Очистку ПЦР-продукта осуществляли с использованием набора Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System (“Promega”, США). Секвенирование проводили на базе ЦКП “Биоинженерия” ФИЦ Биотехнологии РАН. Редактирование полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit. Построение филогенетических дендрограмм производили с использованием программного пакета MEGAX (Kumar et al., 2018) методом максимального правдоподобия. Статистическую достоверность дендрограмм рассчитывали с помощью “bootstrap”-анализа путем построения 100 альтернативных деревьев. Определенная в работе последовательность гена 16S рРНК

штамма Pla2^T депонирована в GenBank под номером OQ533426.

Геномное секвенирование и аннотирование. Выделение ДНК для геномного секвенирования осуществляли по стандартному протоколу СТАВ – фенол/хлороформ. Часть полученной геномной ДНК секвенировали на ячейке R9.4 прибора MinION (“Oxford Nanopore”, Великобритания), используя Ligation Sequencing kit 1D согласно рекомендациям производителя. Другая часть геномной ДНК была секвенирована на платформе Illumina MiSeq. Подготовка библиотеки и процедура секвенирования осуществлялись коммерчески, компанией “ReaGen” (Москва, Россия). Гибридная сборка прочтений Illumina и Nanopore была выполнена с использованием программы Unicycler (Wick et al., 2017). Последовательность генома штамма Pla2^T депонирована в GenBank под номером PRJNA940391.

Аннотацию генома проводили с помощью программного пакета PROKKA (Seemann, 2014) и BLASTKoala (Kanehisa et al., 2016). Поиск генов синтеза вторичных метаболитов осуществляли в программе AntiSmash (Medema et al., 2011). Построение геномного дерева производили в программе GTDB-Tk (Chaumeil et al., 2020), путем множественного выравнивания 120 маркерных генов. В анализ были также взяты геномы других охарактеризованных представителей семейства *Isoosphaeraceae*.

Поиск генов гликозил-гидролаз и их гомологов. В работе использовали основанную на гомологии аминокислотных последовательностей каталитических доменов классификацию гликозил-гидролаз CAZy (Drula et al., 2022). Поиск потенциальных гликозил-гидролаз среди белков, закодированных в геноме штамма Pla2^T, проводили с помощью сервера dbCAN3 (<https://bcb.unl.edu/dbCAN2/index.php>), используя три алгоритма: HMMER:dbCAN, DIAMOND:CAZy и HMMER:dbCAN-sub. Все найденные хотя бы одним из алгоритмов белки, распознанные как гликозил-гидролазы семейств GH1–GH173 или как неклассифицированные гликозил-гидролазы (условное семейство GH0 или GH_NC), проверяли вручную на предмет принадлежности семействам GH1–GH180. Список обсуждаемых в работе гликозил-гидролаз штамма Pla2^T приведен во вспомогательной таблице S1. По алгоритму blastp на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) проводили скрининг пула белков, закодированных в штамме Pla2^T, с помощью 37 планктомицетных белков из 24 семейств: GH1, GH3, GH9, GH17, GH23, GH25, GH26, GH35, GH55, GH62, GH65, GH73, GH76, GH79, GH88, GH92, GH104, GH108, GH125, GH133, GH135, GH136, GH137 и GH144.

Оценка фенотипических характеристик. Определение ростовых характеристик изолята Pla2^T

проводили при культивировании в жидкой среде, указанной выше, во флаконах на шейкере (120 об./мин) в диапазоне температур от 4 до 35°C (с шагом в 5°C), значений pH от 4 до 8 (шаг 0.5) и концентрации NaCl в среде 0–3.0% (шаг 1%). Окислительное и ферментативное использование углеводов определяли с использованием набора API 20NE kit (“bioMérieux”). Энзиматическую активность проверяли с помощью набора API ZYM (“bioMérieux”). Спектр используемых источников углерода определяли на минеральной среде MM следующего состава (г/л дистиллированной воды): KH₂PO₄ – 0.1; (NH₄)₂SO₄ – 0.1; MgSO₄ · 7H₂O – 0.1; CaCl₂ · 2H₂O – 0.02; 1 мл раствора “44” (Staley et al., 1992) и 1 мл витаминов № 6 (Staley et al., 1992). Культивирование проводили в 100 мл флаконах, содержащих 10 мл среды в 3-х повторностях. В качестве источников углерода проверяли сахара (глюкоза, сахароза, ксилоза, лактоза, манноза, раффиноза, мелибиоза) и полимерные соединения (фитагель, крахмал, пектин, ксилан, ксантановая камедь, хитин и микрокристаллическая целлюлоза). Тестируемые субстраты вносили в концентрации 0.5 г/л.

Эксперимент по проверке используемых источников азота проводили на жидкой среде MM, в которой (NH₄)₂SO₄ был заменен одним из следующих соединений в концентрации 0.01%: KNO₃, NaNO₂, мочевиной, дрожжевым экстрактом, N-ацетилглюкозамином, пептоном, хлоридом аммония или одной из аминокислот – изолейцином, аланином, треонином, триптофаном, пролином, валином, фенилаланином, глутамином, лизином, аспарагином, аргинином, глицином.

Рост штамма Pla2^T оценивали путем регулярных измерений оптической плотности культуры на спектрофотометре Eppendorf Biophotometer AG 22331 (“Eppendorf”, Германия) при длине волны 600 нм. Перед измерением культуру гомогенизировали путем активного встряхивания. Чувствительность штамма Pla2^T к антибиотикам проверяли на твердой среде путем наложения на газоны культуры тест-дисков с различными антибиотиками и последующим измерением зон подавления роста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение, анализ морфологии и идентификация нового изолята. Полученный из торфа низинного болота изолят Pla2^T рос в жидкой среде M31 в виде слизевого агрегата розового цвета (рис. 1а). На твердой среде с фитагелем этот штамм формировал бледно-розовые колонии плотной консистенции, несколько погруженные в толщу среды (рис. 1б). Аналогичный эффект деградации фитагеля вокруг формирующихся колоний был ранее описан для *Paludisphaera borealis* PX4^T (Kuli-

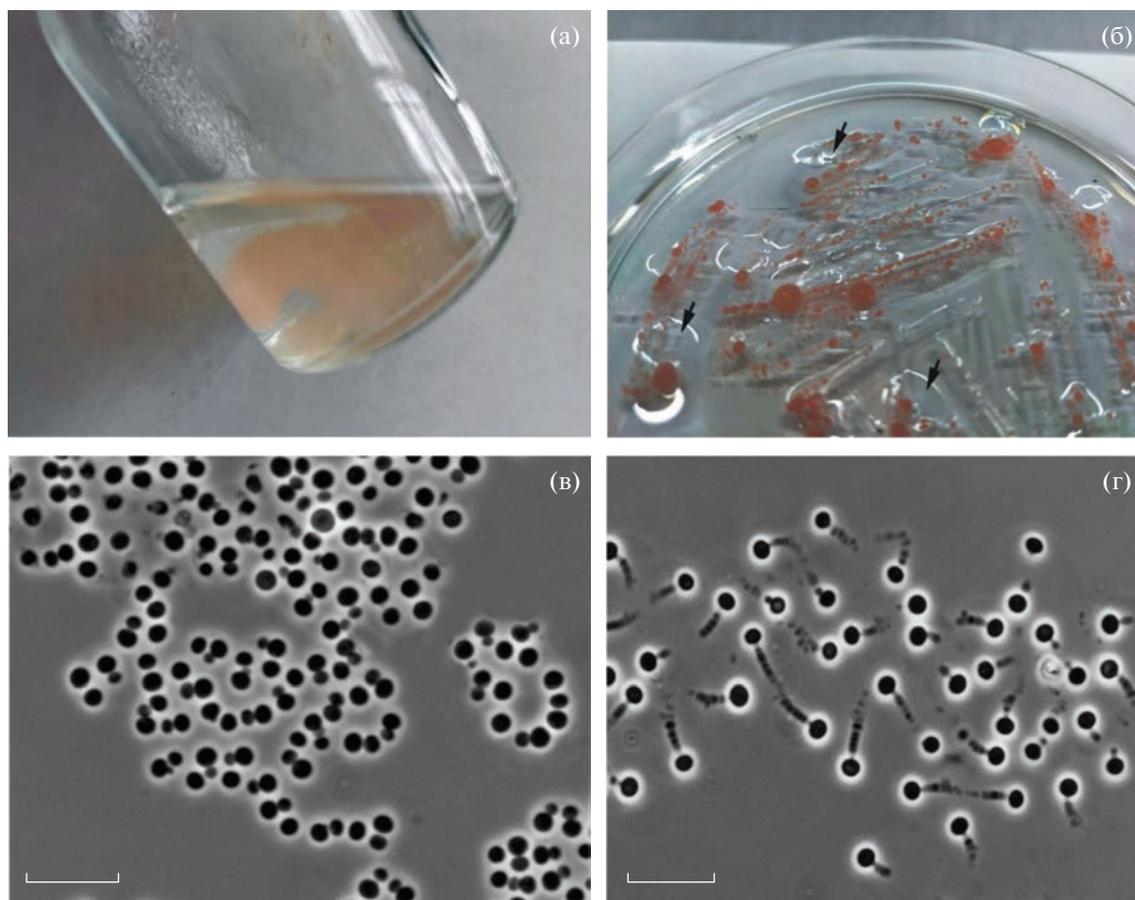


Рис. 1. Особенности роста и морфология клеток штамма Pla2^T: (а) – рост культуры в жидкой среде с формированием слизевого агрегата; (б) – рост планктомицета на твердой среде с фитагелем (колонии, погруженные в толщу среды, указаны стрелками); (в) – морфология клеток 10-суточной культуры штамма Pla2^T на твердой среде; (г) – клетки со структурами – “выростами” – в старой жидкой культуре планктомицета. Масштабные метки – 10 мкм.

chevskaya et al., 2016). Микроскопический анализ показал, что колонии образованы шаровидными неподвижными клетками размером 1.5–2.8 мкм, которые размножались почкованием (рис. 1в). В культуре редко встречались одиночные клетки, чаще они формировали плотные скопления в виде бесформенных агрегатов. В некоторых старых культурах (более 3-х нед. инкубации) можно было наблюдать образование внеклеточных аморфных структур типа “выростов”, которые, по всей видимости, служат для прикрепления клеток к различным поверхностям, однако условия их формирования определить не удалось (рис. 1г).

Определение и сравнительный анализ последовательности гена 16S рНК штамма Pla2^T позволили идентифицировать его в качестве представителя рода *Paludisphaera* (рис. 2). Ближайшим филогенетическим родственником штамма Pla2^T со сходством последовательностей гена 16S рНК в 97.9% оказался планктомицет “*Paludisphaera soli*” JC670^T, выделенный из почвы высокогорного участка западной цепи Гималаев (Kaushik et al.,

2020). С другими представителями рода *Paludisphaera* сходство составляло 97.0% в случае “*Paludisphaera rhizosphaera*” JC665^T из ризосферы растения *Erianthus ravennae* (Lhingjakim et al., 2022) и 93.8% с *Paludisphaera borealis* PX4^T, выделенной из торфа верхового болота (Kulichevskaya et al., 2016).

Физиологические характеристики. Штамм Pla2^T рос в интервале рН среды от 6 до 8 (оптимум рН 5.5–6.5) и солёности среды от 0 до 2%. Температурный диапазон роста этого планктомицета составил 4–28°C, с оптимумом при 15–20°C. Тесты на отношение к кислороду показали, что штамм Pla2^T является строго аэробным микроорганизмом. Попытки вырастить его в анаэробных условиях не увенчались успехом.

Анализ ферментативных свойств штамма Pla2^T, проведенный с использованием стандартного набора API ZYM (“bioMérieux”), показал наличие активности ряда ферментов, включая, эстеразу (С4), липазу (С8), лейцин-, валин-цистин-ариламидазы, трипсин, α-химотрипсин, кислую фосфатазу и нафтол-AS-VI-фосфогидролазу. Ак-

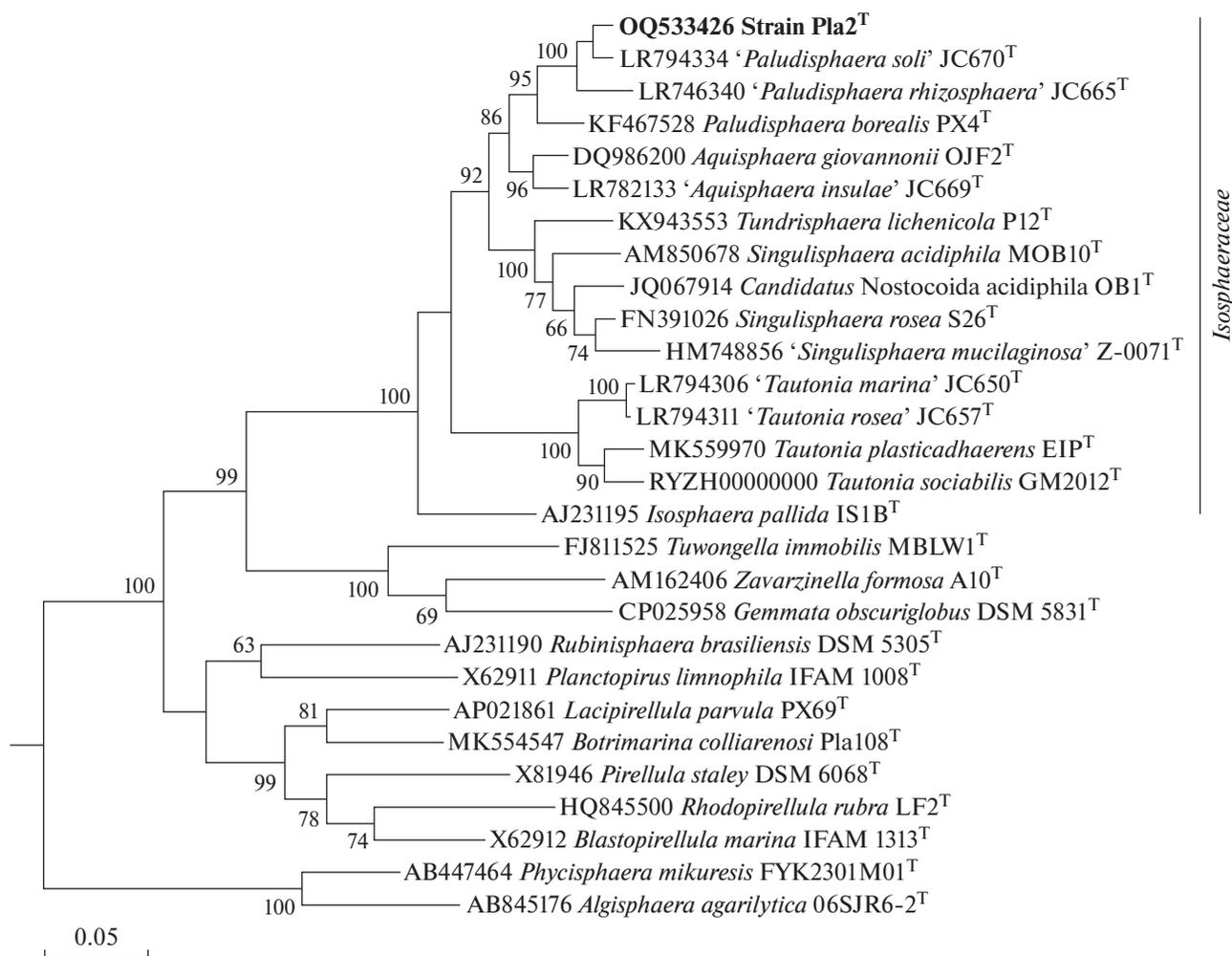


Рис. 2. Филогенетическая дендрогрaмма, построенная методом максимального подобия на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК штамма Pla2^T и других представителей филума *Planctomycetota*. В качестве внешней группы использованы нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК пяти апаммох-планктомицетов (AF375994, AF375995, AY254883, AY254882, AY257181). Показаны значения бутстрэп-анализа >60.

тивности щелочной фосфатазы, α - и β -глюкозидазы, α - и β -галактозидазы, β -глюкуронидазы, N-ацетил- β -глюкозаминидазы, α -маннозидазы и α -фукозидазы выявлены не были. По результатам тестов системы API NE новый планктомицет не способен к брожению и к восстановлению нитратов до нитритов и молекулярного азота.

Проверка спектра используемых субстратов показала, что предпочтительными источниками углерода и энергии штамма Pla2^T являются полисахариды ксилан, фитагель, ксантановая камедь. Из простых сахаров хороший рост нового изолята был зафиксирован на глюкозе, маннозе, ксилозе и мелибиозе. В качестве источников азота планктомицет мог использовать нитрат, пептон, дрожжевой экстракт, N-ацетилглюкозамин, лизин, глицин, аспарагин, аспартат, валин, пролин, триптофан, треонин, изолейцин, аргинин.

Проверка устойчивости штамма Pla2^T к ряду антибиотиков выявила устойчивость к хлорамфениколину, гентамицину, ампициллину, канамицину, имипенему, в то же время он оказался чувствительным к тетрациклину.

Геномные характеристики. По итогам секвенирования ДНК штамма Pla2^T на платформе Nanopore было получено 140874 прочтения с общей длиной 1.4 Гб. Дополнительный раунд секвенирования на платформе Illumina MiSeq сгенерировал в общей сложности 10517034 парных прочтений со средней длиной считывания 150 п.о. По итогам гибридной сборки генома удалось получить 9 контигов длиной от 15502 п.о. до 7626770 п.о. Содержание пар Г + Ц в геноме штамма Pla2^T составило 67 мол. % (табл. 1). Геномным аннотатором Prokka было предсказано около 6.5 тыс. потенциальных белок-кодирующих последовательно-

Таблица 1. Отличительные характеристики штамма Pla2^T от ранее описанных видов рода *Paludisphaera*

Характеристика	Штамм Pla2 ^T	“ <i>P. rhizosphaerae</i> ” JC665 ^T	“ <i>P. soli</i> ” JC670 ^T	<i>P. borealis</i> PX4 ^T
Размер клеток, мкм	1.5–2.8	1.8–1.7	1.6–1.7	1.5–2.5
Диапазон pH, (оптимум)	6–8 (5.5–6)	6–9 (7.0)	7.0–8.0 (7.0)	3.8–8.0 (5.0–5.5)
Диапазон T, °C, (оптимум)	4–28 (15–20)	4–34 (26–28)	4–30 (22–25)	4–37 (15–25)
Соленость, %	0–2 (0)	0–2 (0)	0–2 (0)	0–3 (0)
Источники углерода:				
сахароза	–	+	–	+
мелибиоза	+	ND	ND	–
лактоза	–	+	–	+
Источники азота:				
фенилаланин	–	+	+	–
лизин	+	+	+	–
треонин	+	+	+	–
глицин	+	+	+	–
изолейцин	+	+	+	–
глутамин	–	–	+	–
пролин	+	+	+	–
аспартат	+	–	–	–
валин	+	–	–	–
Ферментативная активность:				
щелочная фосфатаза	–	–	+	–
β-галактозидаза	–	–	–	+
N-ацетил-β-глюкозаминидаза	–	–	–	+
Размер генома, млн п.о.	8.21	8.05	7.97	7.65
Г + Ц, мол. %	67	66.4	70.4	66.3
Количество белок-кодирующих генов	6468	6364	6389	5785
Кластеры генов синтеза вторичных метаболитов, шт.	6	6	6	5
Источник выделения	Торф низинного болота	Почва ризосферы	Почва высокогорья	Торф верхового болота

стей, 3 копии оперона рРНК и 93 гена тРНК. Полученная геномная сборка не позволила точно определить количество плазмид. Однако нам удалось выявить сходство части контигов генома штамма Pla2^T с последовательностями плазмид других представителей семейства *Isosphaeraceae*. Наибольшее покрытие и сходство наблюдались с плазмидой PALBO1 из *Paludisphaera borealis* PX4^T (78.6%) и двумя плазмидами неохарактеризованного штамма SH-PL62 (84.5 и 86.9%).

ДНК–ДНК гибридизация *in silico* выявила следующие величины сходства штамма Pla2^T с тремя представителями рода *Paludisphaera*: 24.4 ± 2.3% с “*P. soli*” JC670^T, 22.0 ± 2.3% с “*P. rhizosphaerae*” JC665^T и 21.0 ± 2.3% с *P. borealis* PX4^T. Согласно калькулятору ANI (average nucleotide identity) сходство последовательности генома Pla2^T с такими у представителей рода *Paludisphaera* составило 82.6% (“*P. soli*” JC670^T), 80.8% (“*P. rhizosphaerae*” JC665^T) и 79.4% (*P. borealis* PX4^T). Согласно ныне принятым стандартам, такие величины

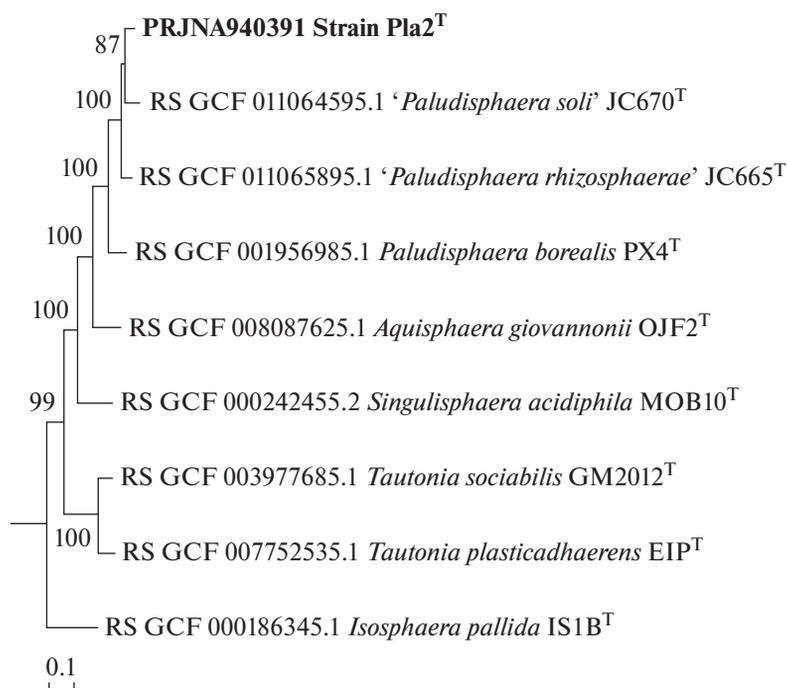


Рис. 3. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основании результатов сравнительного анализа 120 конкатенированных последовательностей консервативных маркерных белков штамма Pla2^T и других представителей семейства *Isosphaeraceae*. В качестве внешней группы использованы геномы апамттох-планктомицетов, доступные в базе данных GTDB (Parks et al., 2022).

ANI свидетельствуют о принадлежности изолята к новому виду (Chun et al., 2018). Аналогичное заключение позволил сделать и филогенетический анализ, согласно которому штамм Pla2^T образует общий кластер с другими представителями рода *Paludisphaera* в семействе *Isosphaeraceae* (рис. 3).

Гены, кодирующие основные метаболические пути хемоорганотрофных бактерий, такие как гликолиз, ЦТК, пентозо-фосфатный путь и окислительное фосфорилирование, присутствуют в геноме штамма Pla2^T. У этого планктомицета имеется геномный потенциал для синтеза всех аминокислот. Большинство генов, ответственных за хемотаксис, включая *cheB*, *cheR* и *cheW*, присутствуют в геноме Pla2^T.

Анализ генов, кодирующих синтез вторичных метаболитов. Геномы планктомицетов кодируют большое количество генных кластеров, отвечающих за синтез вторичных метаболитов. Данное свойство делает эту группу микроорганизмов потенциально интересным объектом для биотехнологии (Wiegand et al., 2018). С помощью программы Antismash в геноме штамма Pla2^T был произведен поиск таких генных кластеров. По итогам анализа в геноме было выявлено 6 кластеров, содержащих гены, потенциально кодирующие синтез вторичных метаболитов. Из них три кластера отвечали за синтез поликетидсинтаз (PKS), один кластер отвечал за синтез индола и два за

синтез терпенов. Поликетидсинтазы – ключевые ферменты синтеза биологически-активных веществ поликетидов (Donadio et al., 2007). Ближайшими гомологами PKS штамма Pla2^T были таковые у планктомицетов *P. borealis* PX4^T (100% сходства) и *I. pallida* ATCC43644^T (16% сходства), а также цианобактерии *Scytonema hofmannii* (8% сходства).

Индол повсеместно распространен в природе и представляет собой азотсодержащее гетероциклическое ароматическое соединение. У бактерий индол влияет на образование спор, вирулентность и формирование биопленок. В промышленности используется как усилитель вкуса и отдушка (Ferrer et al., 2022). Ближайшим гомологом индольного генного кластера у Pla2^T был обнаруженный у планктомицета *Aquisphaera giovannonii* OF2^T. Терпены представляют собой структурно наиболее разнообразный класс природных соединений. Их структурное многообразие привело к широкому диапазону функциональных ролей, к которым относятся витамины, каротиноиды, гормоны, ароматические вещества и защитные метаболиты (Helfrich et al., 2019). Для двух терпеновых кластеров Pla2^T гомологичным был генный кластер неохарактеризованного планктомицета семейства *Isosphaeraceae* штамма SH-PL62 со сходством 50 и 100%.

Репертуар гликозил-гидролаз, закодированных в геноме штамма Pla2^T. Поиск потенциальных гликозил-гидролаз с помощью сервера dbCAN3 и дальнейшая их верификация позволили обнаружить 108 белков, принадлежащих 40 семействам: GH2 (2 белка), GH5 (11), GH10 (3), GH13 (11), GH15 (2), GH16 (3), GH18 (2), GH20 (1), GH27 (2), GH29 (3), GH32 (3), GH33 (4), GH36 (2), GH38 (2), GH39 (4), GH43 (5), GH50 (1), GH51 (2), GH57 (4), GH77 (1), GH78 (3), GH94 (2), GH95 (1), GH97 (1), GH99 (1), GH106 (1), GH116 (1), GH127 (5), GH130 (2), GH140 (2), GH141 (2), GH146 (1), GH148 (3), GH151 (1), GH163 (2), GH165 (1), GH171 (1), GH172 (3), GH176 (1) и GH177 (6). Сравнение этого списка семейств с размещенными на сайте CAZy списками семейств, представленных у шести планктомицетов семейства *Isosphaeraceae* (*A. giovannonii* OJF2^T, *I. pallida* ATCC 43644^T, *P. borealis* PX4^T, *S. acidiphila* DSM 18658^T, *T. plasticadhaerens* EIP^T и штамма SH-PL62), выявило 24 семейства гликозил-гидролаз, представители которых не были обнаружены алгоритмами dbCAN3 у штамма Pla2^T. 37 соответствующих планктомицетных белков были использованы нами в качестве запросов для скрининга пула белков штамма Pla2^T, его результаты не позволили обнаружить близких гомологов ни в одном из случаев.

Семейства GH27 и GH36 гликозил-гидролаз находятся в близком родстве (клан GH-D) и объединяют почти исключительно ферменты, обладающие α -D-галактозидазной (КФ 3.2.1.22) активностью (Наумов, 2004, 2011). Гены белков этих двух семейств крайне редко обнаруживаются в геномах планктомицетов. Среди 101 генома, представленных в базе данных CAZy, лишь в 11 закодированы белки семейства GH27 и в 16 — GH36. В семействе *Isosphaeraceae* только у штамма *A. giovannonii* OJF2^T закодирован белок семейства GH27 (GenPept, QEN34490.1). Он на 48% и 28% идентичен с белками Pla2_02372 и Pla2_03258 штамма Pla2^T (между собой они имеют 30% идентичности). Белки Pla2_03686 и Pla2_05159 семейства GH36 из штамма Pla2^T имеют 41% и 37% идентичности на N- и C-концевом фрагментах, которые у второго разделены длинной инсерцией. Оба белка принадлежат одному подсемейству GH36A. Низкий уровень сходства аминокислотных последовательностей позволяет сделать вывод, что все пять генов α -галактозидаз попали в планктомицеты семейства *Isosphaeraceae* в результате независимых горизонтальных переносов. Накопление четырех α -галактозидазных генов у штамма Pla2^T явно имеет адаптивное значение, природа которого пока остается неясной. Проведенные нами тесты позволили подтвердить способность Pla2^T к росту на мелибиозе, анало-

гичные данные имеются в литературе для штамма *A. giovannonii* OJF2^T (Bondoso et al., 2011).

Семейство GH10 гликозил-гидролаз представлено у планктомицетов двумя четко обособленными подсемействами (Наумов, 2016; Наумов и др., 2022). Гены представителей одного из них закодированы в каждом геноме в одной копии, на филогенетическом древе они образуют компактный кластер, а в аминокислотных последовательностях отсутствуют два каталитически важных остатка Glu, что указывает на отсутствие у них какой-либо ферментативной активности. К этому подсемейству относится белок Pla2_04228 из штамма Pla2^T. Гены второго подсемейства закодированы лишь в редких штаммах планктомицетов, но обычно представлены в нескольких копиях. Сюда относятся белки Pla2_03346 и Pla2_05951 из штамма Pla2^T, имеющие 71% идентичности аминокислотных последовательностей и сохранные каталитически значимые остатки. Они, вероятно, обладают эндо- β -ксилазной активностью и частично ответственны за способность штамма Pla2^T к росту на ксилане.

Семейство GH32 гликозил-гидролаз содержит разнообразные β -фруктозидазы. Гены его белков закодированы в 43 из 101 генома планктомицетов, представленного в базе данных CAZy. Ранее нами было предложено разбиение этого семейства на несколько подсемейств (Naumoff, 2001). Белки Pla2_05839 и Pla2_05968 имеют 38% идентичности, содержат оба каталитически важных остатка и относятся к подсемейству GH32b, для бактериальных представителей которого характерно наличие эндо- β -фруктозидазных активностей (расщепление полимеров фруктозы). Белок Pla2_05993 не относится ни к одному из ранее выделенных подсемейств, но находится в близком родстве (71% идентичности) с белком из *P. borealis* PX4^T (GenPept, APW62066.1), для которого нами (Ivanova et al., 2017) на основании необычного строения предполагаемого активного центра было сделано предположение о вероятном отсутствии каталитической активности. Низкий уровень сходства трех рассмотренных белков штамма Pla2^T указывает на независимую эволюционную историю, исключаящую недавнюю дупликацию их генов.

Проведенный нами сравнительный анализ морфологических, физиолого-биохимических и генетических характеристик нового изолята Pla2^T с описанными ранее у представителей рода *Paludisphaera* позволил выявить ряд различий, приведенных в табл. 1. Новый штамм филогенетически наиболее близок к выделенному из почвы планктомицету "*Paludisphaera soli*" JC670^T, но, в отличие от последнего, имеет оптимум роста при 15–20°C и предпочитает условия с более низкими значениями pH. Также имеется ряд разли-

чий в способности к росту на разных источниках углерода и азота. Отличия в температурном и pH-диапазонах роста, а также ростовых субстратах наблюдались и с “*P. rhizosphaerae*” JC665^T. Значения ДНК–ДНК гибридизации и калькулятора ANI соответствуют стандартам таксономической классификации (Chun et al., 2018) для отнесения штамма Pla2^T к новому виду рода *Paludisphaera*.

Диагноз нового вида – *Paludisphaera mucosa* sp. nov.

Paludisphaera mucosa sp. nov. (mu.co'sa. L. fem. adj. *mucosa* слизистый). Шаровидные неподвижные клетки диаметром 1.5–2.8 мкм, одиночные или объединенные в бесформенные скопления. Колонии розово-пигментированные. В жидкой культуре растут в виде слизевого агрегата. Обязательные аэробы. Психротолерантные мезофилы и нейтрофилы с оптимумом роста при 15–20°C и pH 5.5–6. Предпочтительные ростовые субстраты – полисахариды, в том числе ксилан, фитагель и ксантановая камедь. Хороший рост наблюдается на глюкозе, ксилозе, маннозе и мелибиозе. Обнаружены активности ряда ферментов: эстеразы (C4), липазы (C8), лейцин-, валин-цистин-арил-амидазы, трипсина, α -химотрипсина, кислой фосфатазы и нафтол-AS-VI-фосфогидролазы. Активности щелочной фосфатазы, α - и β -глюкозидазы, α - и β -галактозидазы, β -глюкуронидазы, N-ацетил- β -глюкозаминидазы, α -маннозидазы и α -фукозидазы не выявлены. Типовым штаммом вида является штамм Pla2^T (=KCTC92668^T = VKM В-3698^T). Местообитания представителей вида – низинные болота.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

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

Наумов Д.Г. Филогенетический анализ α -галактозидаз семейства GH27 // Мол. биология. 2004. Т. 38. С. 463–476.

Naumoff D.G. Phylogenetic analysis of α -galactosidases of the GH27 family // Mol. Biol. (Moscow). 2004. V. 38.

P. 388–399.
<https://doi.org/10.1023/B:MBIL.0000032210.97006.de>

Наумов Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз // Биохимия. 2011. Т. 76. С. 764–780.

Naumoff D.G. Hierarchical classification of glycoside hydrolases // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 622–635.
<https://doi.org/10.1134/S0006297911060022>

Наумов Д.Г. Семейство GH10 гликозилгидролаз: структура и эволюционные связи // Мол. биология. 2016. Т. 50. С. 151–160.

Naumoff D.G. GH10 family of glycoside hydrolases: structure and evolutionary connections // Mol. Biol. (Moscow). 2016. V. 50. P. 132–140.
<https://doi.org/10.1134/S0026893315060205>

Наумов Д.Г., Куличевская И.С., Дедыш С.Н. Генетические детерминанты утилизации ксилана у планктомицета класса *Phycisphaerae*, *Humisphaera borealis* M1803^T // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 300–311.

Naumoff D.G., Kulichevskaya I.S., Dedysh S.N. Genetic determinants of xylane utilization in *Humisphaera borealis* M1803^T, a planctomycete of the class *Phycisphaerae* // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 249–258.
<https://doi.org/10.1134/S002626172230004X>

Bondoso J., Albuquerque L., Nobre M.F., Lobo-da-Cunha A., da Costa M.S., Lage O.M. *Aquisphaera giovannonii* gen. nov., sp. nov., a planctomycete isolated from a freshwater aquarium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. P. 2844–2850.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.027474-0>

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.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>

Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S. et al. 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.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>

Dedysh S.N., Beletsky A.V., Ivanova A.A., Kulichevskaya I.S., Suzina N.E., Philippov D.A. et al. Wide distribution of *Phycisphaera*-like planctomycetes from WD2101 soil group in peatlands and genome analysis of the first cultivated representative // Environ. Microbiol. 2020. V. 23. P. 1510–1526.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15360>

Dedysh S.N., Ivanova A.A. Planctomycetes in boreal and subarctic wetlands: diversity patterns and potential ecological functions // FEMS Microbiol. Ecol. 2019. V. 95. Art. fyy227.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fyy227>

Donadio S., Monciardini P., Sosio M. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics // Nat. Prod. Rep. 2007. V. 24. P. 1073–1109.
<https://doi.org/10.1039/b514050c>

Drula E., Garron M.-L., Dogan S., Lombard V., Henrissat B., Terrapon N. The carbohydrate-active enzyme database:

- functions and literature // Nucl. Acids Res. 2022. № Database issue (50). P. D571–D577.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>
- Ferrer L., Mindt M., Suarez-Diez M., Jilg T., Zagorščak M., Lee J.H. et al. Fermentative indole production via bacterial tryptophan synthase alpha subunit and plant indole-3-glycerol phosphate lyase enzymes // J. Agric. Food Chem. 2022. V. 70. P. 5634–5645.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01042>
- Giovannoni S.J., Schabtach E., Castenholz R.W. *Isosphaera pallida*, gen. and comb. nov., a gliding, budding eubacterium from hot springs // Arch. Microbiol. 1987. V. 147. P. 276–284.
<https://doi.org/10.1007/BF00463488>
- Göker M., Cleland D., Saunders E., Lapidus A., Nolan M., Lucas S. et al. Complete genome sequence of *Isosphaera pallida* type strain (IS1B) // Stand. Genom. Sci. 2011. V. 4. P. 63–71.
<https://doi.org/10.4056/sigs.1533840>
- Helfrich E.J.N., Lin G.M., Voigt C.A., Clardy J. Bacterial terpene biosynthesis: challenges and opportunities for pathway engineering // Beilstein J. Org. Chem. 2019. V. 15. P. 2889–2906.
<https://doi.org/10.3762/bjoc.15.283>
- Ivanova A.A., Naumoff D.G., Miroshnikov K.K., Liesack W., Dedysh S.N. Comparative genomics of four *Isosphaeraceae* planctomycetes: a common pool of plasmids and glycoside hydrolase genes shared by *Paludisphaera borealis* PX4^T, *Isosphaera pallida* IS1B^T, *Singulisphaera acidiphila* DSM 18658^T, and strain SH-PL62 // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 412.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00412>
- Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences // J. Mol. Biol. 2016. V. 428. P. 726–731.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>
- Kaushik R., Sharma M., Gaurav K., Jagadeeshwari U., Shabbir A., Sasikala C. et al. *Paludisphaera soli* sp. nov., a new member of the family *Isosphaeraceae* isolated from high altitude soil in the Western Himalaya // Antonie van Leeuwenhoek. 2020. V. 113. P. 1663–1674.
<https://doi.org/10.1007/s10482-020-01471-w>
- Kovaleva O.L., Elcheninov A.G., Toshchakov S.V., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. *Tautonia sociabilis* gen. nov., sp. nov., a novel thermotolerant planctomycete, isolated from a 4000 m deep subterranean habitat // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 2299–2304.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003467>
- Kulichevskaya I.S., Ivanova A.A., Detkova E.N., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., Dedysh S.N. *Tundrisphaera lichenicola* gen. nov., sp. nov., a psychrotolerant representative of the family *Isosphaeraceae* from lichen-dominated tundra soils // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 3583–3589.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002172>
- Kulichevskaya I.S., Ivanova A.A., Suzina N.E., Rijpstra W.I.C., Damsté J.S.S., Dedysh S.N. *Paludisphaera borealis* gen. nov., sp. nov., a hydrolytic planctomycete from northern wetlands, and the proposal of *Isosphaeraceae* fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 837–844.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000799>
- Kulichevskaya I.S., Ivanova A.O., Baulina O.I., Bodelier P.L.E., Damsté J.S.S., Dedysh S.N. *Singulisphaera acidiphila* gen. nov., sp. nov., a non-filamentous, *Isosphaera*-like planctomycete from acidic northern wetlands // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 1186–1193.
<https://doi.org/10.1099/ijse.0.65593-0>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M., New York: John Wiley & Sons, 1991. P. 115–175.
- Lhingjakim K.L., Smita N., Kumar G., Jagadeeshwari U., Ahamad S., Sasikala C. et al. *Paludisphaera rhizosphaerica* sp. nov., a new member of the family *Isosphaeraceae*, isolated from the rhizosphere soil of *Erianthus ravennae* // Antonie van Leeuwenhoek. 2022. V. 115. P. 1073–1084.
<https://doi.org/10.1007/s10482-022-01758-0>
- Medema M.H., Blin K., Cimermancic P., De Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M.A. et al. AntiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39 (Web Server issue) P. W339–W346.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>
- Moore E.K., Villanueva L., Hopmans E.C., Rijpstra W.I.C., Mets A., Dedysh S.N. et al. Abundant trimethylornithine lipids and specific gene sequences are indicative of planctomycete importance at the oxic/anoxic interface in *Sphagnum*-dominated northern wetlands // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 6333–6344.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00324-15>
- Naumoff D.G. β -Fructosidase superfamily: homology with some α -L-arabinases and β -D-xylosidases // Proteins. 2001. V. 42. P. 66–67.
[https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010101\)42:1<66::AID-PROT70>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010101)42:1<66::AID-PROT70>3.0.CO;2-4)
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2068–2069.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Serkebaeva Y.M., Kim Y., Liesack W., Dedysh S.N. Pyrosequencing-based assessment of the bacteria diversity in surface and subsurface peat layers of a northern wetland, with focus on poorly studied phyla and candidate divisions // PLoS One. 2013. V. 8. P. e63994.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063994>
- Staley J.T., Fuerst J.A., Giovannoni S., Schlesner H. The order *Planctomycetales* and the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata*, and *Isosphaera* // The Prokaryotes / Eds. Balows A. et al. New York, NY: Springer New York, 1992. P. 3710–3731.

Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // PLoS Comput. Biol. 2017. V. 13. P. e1005595.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>

Wiegand S., Jogler M., Jogler C. On the maverick *Planctomycetes* // FEMS Microbiol. Rev. 2018. V. 42. P. 739–760.
<https://doi.org/10.1002/adsc.201800020>

Paludisphaera mucosa sp. nov., a Novel Planctomycete of the Family *Isosphaeraceae* from a Boreal Fen

A. A. Ivanova^{1, *}, D. G. Naumoff¹, I. S. Kulichevskaya¹, A. A. Meshcheriakova^{1, 2}, and S. N. Dedysh¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Moscow State University, Faculty of Soil Science, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: ivanovastasja@gmail.com

Received March 16, 2023; revised March 28, 2023; accepted March 29, 2023

Abstract—Planctomycetes are common inhabitants of northern wetland ecosystems. In this study, a new planctomycete of the genus *Paludisphaera*, strain Pla2^T, was isolated from a boreal fen in Russia. The novel isolate was represented by nonmotile, pink-pigmented, spherical cells that multiplied by budding and occurred singly or were assembled in small aggregates. Strain Pla2^T was a chemoorganotrophic, psychrotolerant mesophile with a growth optimum at pH 5.5–6 and 15–20°C. The preferred growth substrates were polysaccharides, including xylan, xanthan gum, and phytigel, as well as some sugars. The 16S rRNA gene sequence of strain Pla2^T displayed the highest similarity (97.9%) to that of ‘*Paludisphaera soli*’ JC670^T isolated from highland soil of the western Himalayas. With other members of the genus *Paludisphaera*, “*P. rhizosphaerae*” JC665^T and *P. borealis* PX4^T, this similarity was 97.0 and 93.8%, respectively. The genome of strain Pla2^T was 8.21 Mb in size and contained about 6500 protein-coding genes and 3 copies of the rRNA operon. The DNA G + C content was 67 mol %. The average nucleotide identity between the genome sequence of strain Pla2^T and those of previously described members of the genus *Paludisphaera* was between 79.4 and 82.6%. This genotypic distance as well as several phenotypic differences allowed classifying the new planctomycete from a fen as representing a novel species of the genus *Paludisphaera*, *Paludisphaera mucosa* sp. nov. with the type strain Pla2^T (=KCTC92668^T = VKM B-3698^T).

Keywords: *Planctomycetes*, phylum *Planctomycetota*, family *Isosphaeraceae*, genus *Paludisphaera*, fens, polysaccharide degradation