

Oparta na genomie klasyfikacja nowego gatunku promieniowca, *Streptantibioticus silvisoli* sp. nov., wyizolowanego z kwaśnej gleby leśnej z uwzględnieniem jego potencjału biotechnologicznego i właściwości ekologicznych

Patrycja Golińska¹, Magdalena Świecimska¹, Bartosz Wachnowicz¹, Vartul Sangal², Michael Goodfellow³

¹ Katedra Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,

² Faculty of Health and Life Sciences, Northumbria University, Newcastle upon Tyne, UK

³ School of Natural and Environmental Sciences, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK

Wstęp

Promieniowce zasiedlają wiele ekosystemów, powszechnie występują w glebie, ale również w ekstremalnych środowiskach jak pustynie, zasolone jeziora, alkaliczne gleby, gorące źródła czy wieczne zmarzliny. Obecnie coraz więcej uwagi poświęca się badaniu promieniowców środowisk kwaśnych, które są słabiej poznane a często posiadają unikalne właściwości, zupełnie różne od tych wyizolowanych z gleb o odczynie neutralnym lub lekko alkalicznym. Promieniowce gleb kwaśnych uczestniczą w rozkładzie materii organicznej, wytwarzają enzymy stabilne w kwaśnym pH oraz wyspecjalizowane metabolity wtórne, zwłaszcza antybiotyki o potencjale terapeutycznym [1]. Analiza genomów promieniowców, zwłaszcza tych z rodziny *Streptomycetaceae*, wykazuje obecność ponad 20 klastrow genowych odpowiedzialnych za syntezę metabolitów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, przeciwpasożytniczym, przeciwnowotworowym i przeciwwirusowym [2].

Cel pracy

Celem pracy było ustalenie pozycji taksonomicznej dwóch izolatów pozyskanych z poziomu liściastego gleby lasu sosnowego, które porównano z gatunkami referencyjnymi reprezentującymi rodzaje w obrębie rodziny *Streptomycetaceae* w oparciu o analizę genomów. Genomy izolatów analizowano pod względem obecności biosyntetycznych klastrow genów kodujących syntezę potencjalnie nowych wyspecjalizowanych metabolitów wtórnych oraz genów stresu, które mogą dać wgląd w to jak izolaty adaptują się do kwaśnych warunków panujących w środowiskach, z których je wyizolowano.

Materiały i Metody

Selektywna izolacja: Izolaty SL13 i SL54^T wyizolowano z poziomu liściastego gleby w lesie sosnowym w Kotlinie Toruńskiej. Izolację przeprowadzono standardową metodą rozcieńczeniową na szalkach z pożywką skrobiowo-kazeinową [2] o pH 4.5.

Taksonomia wielofazowa: W celu ustalenia statusu taksonomicznego izolatów, izolaty i ich najbliższe spokrewnionych filogenetycznie sąsiadów analizowano z wykorzystaniem podejścia wielofazowego. Filogenetykę, filogenomikę, chemotaksonomię i analizy fenotypowe przeprowadzono stosując standardowe techniki taksonomiczne [2].

Analiza genomu: Genomy izolatów zsekwenconowano w MicrobeNG (Birmingham, UK). Analizę biosyntetycznych klastrow genowych przeprowadzono z wykorzystaniem programu AntiSMASH. Geny stresu analizowano za pomocą serwera internetowego RAST-SEED. Wartości cyfrowej hybrydyzacji DNA:DNA (dddh) i średniego podobieństwa aminokwasów (AAI) oraz nukleotydów (ANI) określono z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych dostępnych na rekomendowanych platformach i serwerach (GGDC DSMZ, CompareM, Enve-omics) [2].

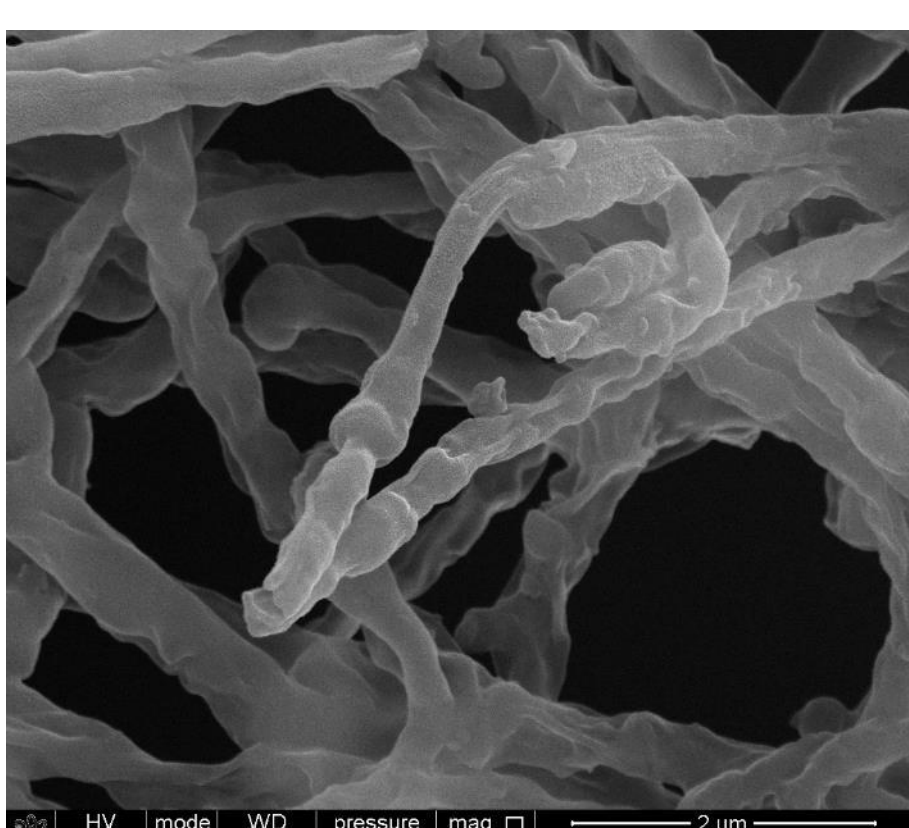
Wyniki i Wnioski

Morfologia i chemotaksonomia: Izolaty SL13 i SL54^T wykazują właściwości chemotaksonomiczne i morfologiczne typowe dla przedstawicieli rodziny *Streptomycetaceae*. Tworzą silnie rozgałęzioną grzybnię substratową z strzępkami powierzchni różnicującymi się w proste łańcuchy cylindrycznych zarodników (Fot. 1). Hydrolizaty komórkowe izolatów zawierają kwas LL-diaminopimelinowy, glukozę, mannozę i rybozę, dominującym izoprelegiem jest MK-9 (H8), lipidami polarnymi są difosfatydyloglicerol, fosfatydyloetanoloamina, fosfatydyloinozytol, fosfatydyloglicerol i glikofosfolipidy (Fot. 2), a główne kwasy tłuszczowe to *antyzjo-C*_{15:0} i *izo-C*_{15:0} i *izo-C*_{16:0} i antyzjo-C_{17:0}.

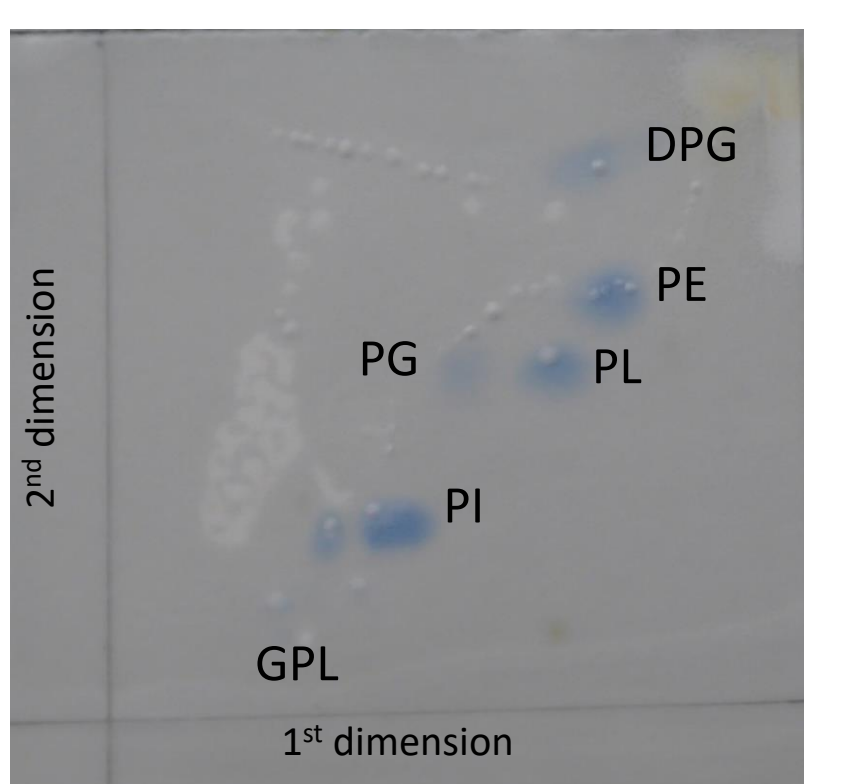
Filogenetyka: Drzewa filogenetyczne oparte na sekwencjach genów 16S rRNA (Fig. 1) i sekwencjach wielolokusowych konserwatywnych genów metabolizmu podstawowego (MLSA; Fig. 2) pokazują, że izolaty tworzą dobrze wsparty kład najbliższe spokrewniony ze *Streptomycetes parmotrematis* NBRC 115203^T. Szczepy te tworzą dobrze zdefiniowany kład w drzewie MLSA razem ze *Streptantibioticus cattleyicolor* DSM 46488^T, *Streptomycetes ferralitis* DSM 41836^T i *Streptomycetes rubrisoli* DSM42083^T. Odcisk palca (BOX-PCR wskazuje, że izolaty nie są klonami (Fot. 3).

Ekspozycja genomu: Genomy izolatów SL13 i SL54^T są bogate w biosyntetyczne klastry genów (BGCs; 44 i 38), które mogą kodować syntezę nowych wyspecjalizowanych metabolitów (Tab. 1), oraz geny związane ze stresem (78 i 80), które dają wgląd w to, jak szczepy przystosowały się do trudnych warunków panujących w kwaśnej ściółce sosnowej (Tab. 2).

Filogenomika: Filogenomicznie oba izolaty należą do tej samej linii co szczepy typu *S. cattleyicolor*, *S. ferralitis*, *S. parmotrematis* i *S. rubrisoli* (Fig. 3); zależności te opierają się na wysokiej wartości średniego podobieństwa aminokwasów (AAI; 74,7-74,9%), średniego podobieństwa nukleotydów (ANI; 82,9%) i hybrydyzacji genomowego DNA-DNA (DDH; 24,6%). Te wskaźniki, (wyrażone poniżej progów rekomendowanych dla przypisania izolatów do znanych gatunków; 95, 95 i 70%) potwierdzają, że izolaty SL13 i SL54^T należą do nowego gatunku, który jest najbliższe spokrewniony z *S. parmotrematis* NBRC 115203^T oraz, że szczepy te łącznie z *S. ferralitis* DSM 41836^T, *S. rubrisoli* DSM 42083^T należą do rodzaju *Streptantibioticus*. W związku z powyższym proponuje się uznanie izolatów za nowy gatunek *Streptantibioticus silvisoli* sp. nov. z izolatem SL54^T (=DSM 11111^T =PCM3044^T) jako szczepem wzorcowym, oraz aby *S. ferralitis*, *S. parmotrematis* i *S. rubrisoli* zostały przeniesione do rodzaju *Streptantibioticus* jako *Streptantibioticus ferralitis*, *Streptantibioticus parmotrematis* i *Streptantibioticus rubrisoli*. Proponowane zmiany wymagają poprawek w opisie rodzaju *Streptantibioticus* i rodziny *Streptomycetaceae*.



Fot. 1. Analiza TEM izolatu SL54^T.



Fot. 2. 2D TLC lipidów polarnych izolatu SL54^T.

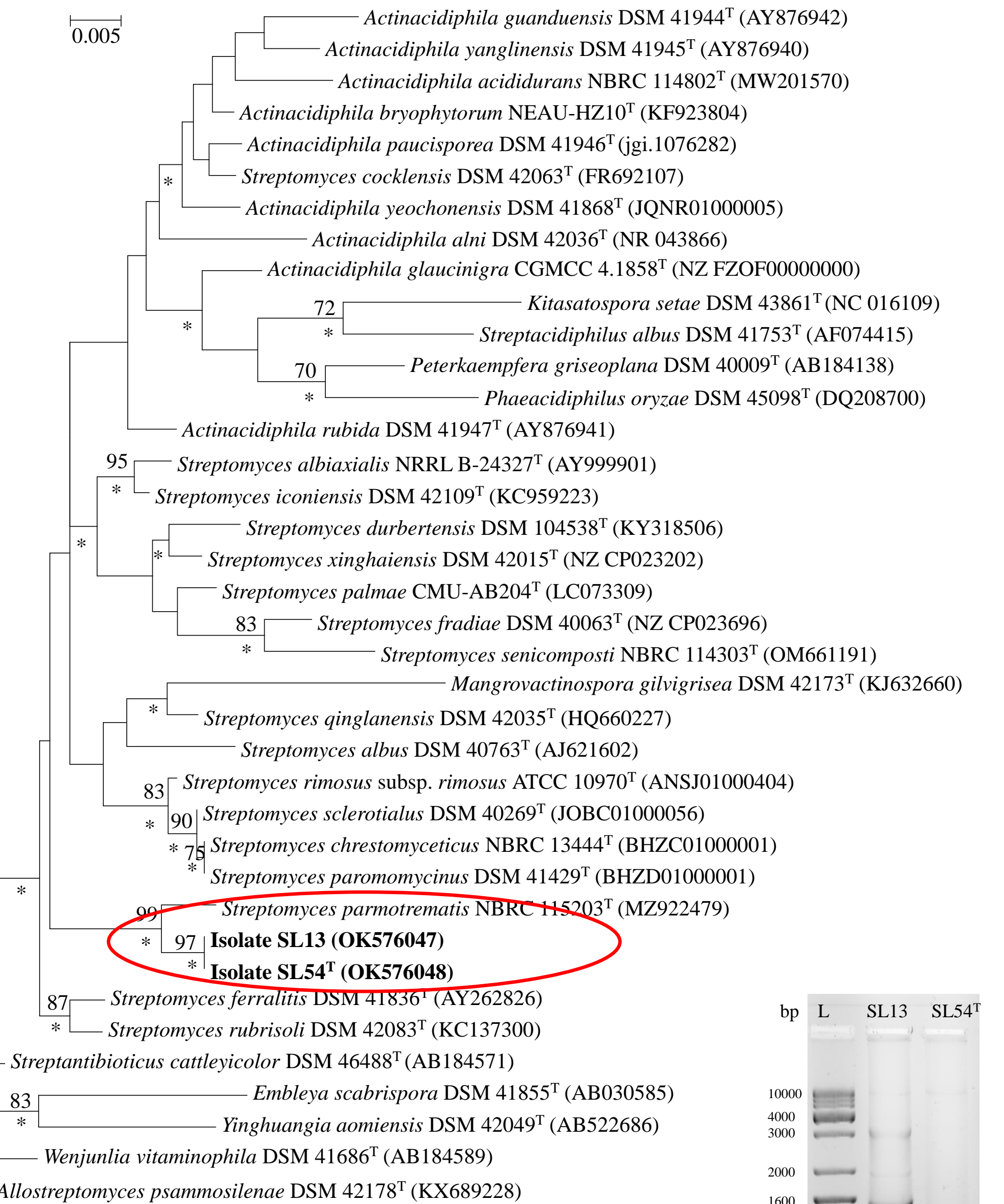
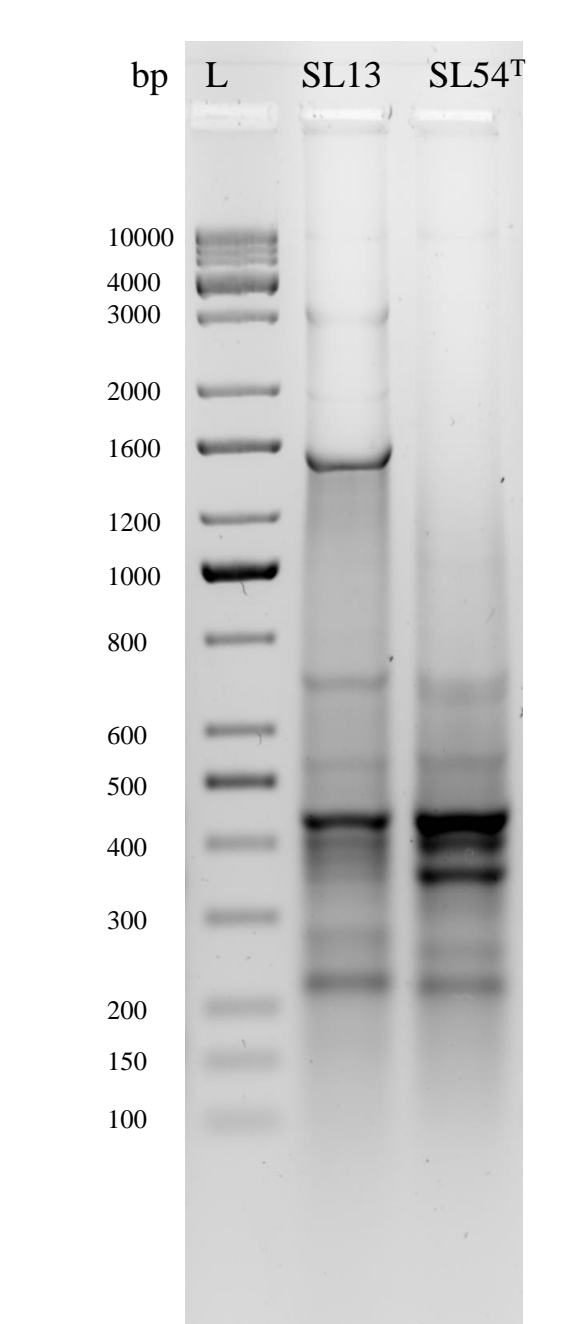


Fig. 1. Drzewo maksymalnego podobieństwa (ML) oparte na prawie kompletnych sekwencjach genu 16S rRNA pokazujące zależności filogenetyczne pomiędzy izolatami, najbliższe spokrewnionymi gatunkami i przedstawicielami rodziny *Streptomycetaceae*



Fot. 3. Box-PCR izolatów SL13 i SL54^T

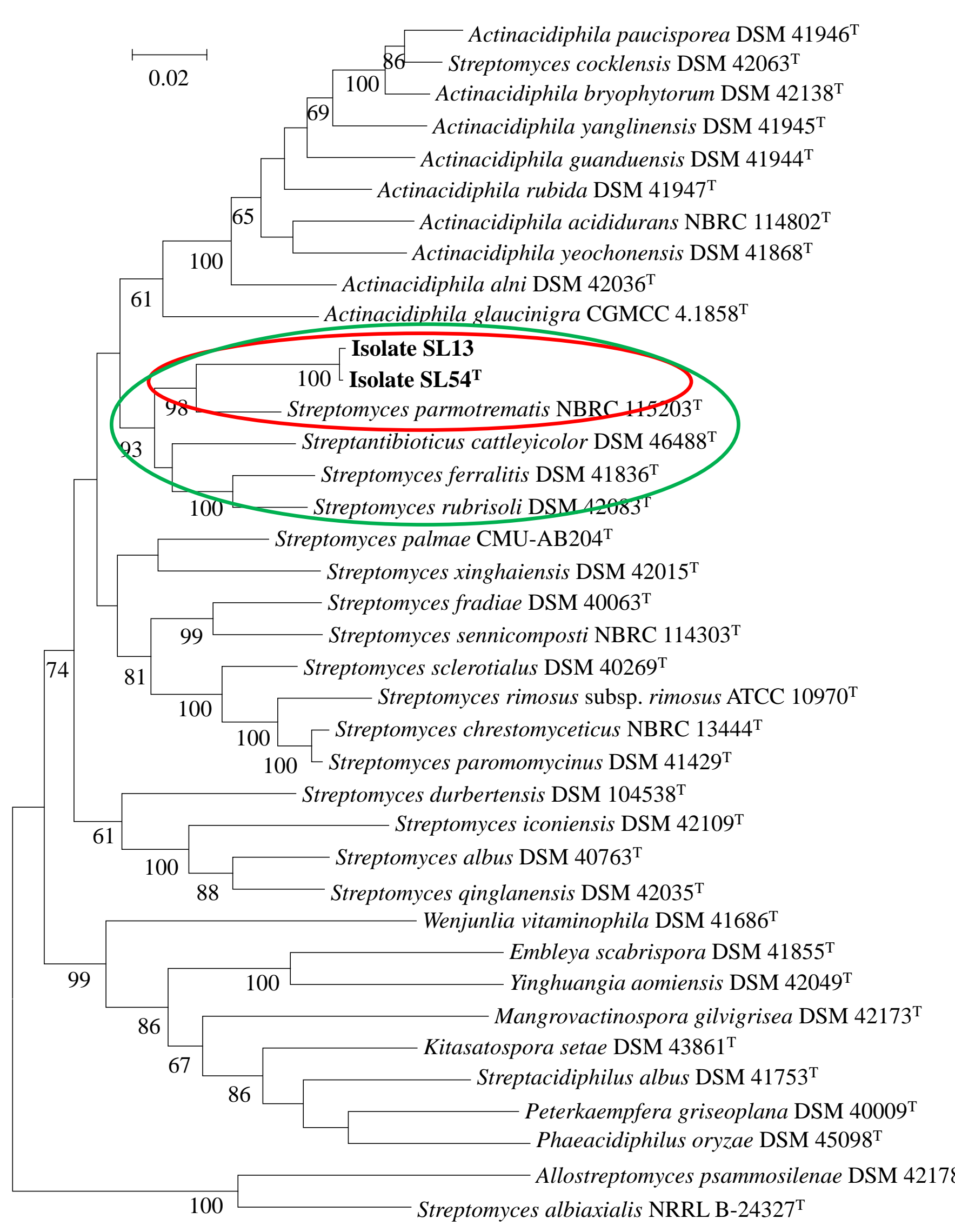


Fig. 2. Drzewo maksymalnego podobieństwa (ML) oparte na analizie MLSA genu 16S rRNA i pięciu genów metabolizmu podstawowego (atpD, gyrB, recA, rpoB i trpB) przedstawiające zależności filogenetyczne pomiędzy izolatami, najbliższe spokrewnionymi gatunkami i przedstawicielami rodziny *Streptomycetaceae*.

Tabela 1. BGCs w genomach izolatów SL13 i SL54^T

Typ	Najbardziej podobny znany klaster	SL13	SL54 ^T
butyrolactone		2 U	1 U
butyrolactone	cythomycin	P (11)	P (11)
butyrolactone	prejadomycin/rabelomycin / gaudimycin A / C / D	P (6)	P (6)
ectoine	ectoine	P (100)	P (100)
hgE-KS	hexacosalactone A		P (11)
lanthipeptide-class-I		1 U	
lanthipeptide-class-II/butyrolactone	lactonamycin	P (3)	P (3)
Ni-siderophore		1 U	1 U
Ni-siderophore	peucechelin	P (15)	P (15)
NRPS		1 U	
NRPS	bornevillamide D / E	P (6)	
NRPS	clavulanic acid	P (8)	
NRPS	deoxyhangamycin	P (5)	P (5)
NRPS	lysocin E	P (31)	P (8)
NRPS	fegymycin	P (9)	P (31)
NRPS	omigepitin	P (9)	P (11)
NRPS	skylamycin A / B		P (8)
NRPS	tyrobaline		P (27)
NRPS	skylamycin D / E	P (27)	P (27)
NRPS/T1PKS	echoside A / B / C / D / E	P (29)	P (29)
NRPS/T1PKS	enduracidin	P (10)	P (10)
NRPS/T1PKS	miharamycin A / B	P (39)	P (39)
NRPS/T1PKS	pellaromycin/pellarsore B	P (33)	
NRPS/T1PKS	rubiginone A2 / B2 / J / K / L / M / N / ochromycinone	P (17)	
NRPS/T1PKS	hexacosalactone A	P (11)	
NRPS/T1PKS	foxicin A / foxicin B / C	P (7)	P (7)
NRPS/terpene/T1PKS	SGR PTMs/SGR PTM Compound b / c / d	P (66)	
NRPS/terpene/T1PKS	heat-stable antifungal factor	P (62)	
NRPS/terpene/T1PKS	tambjamine BE-18591	P (14)	P (17)
T1PKS	A83543A	P (21)	
T1PKS	alchivemycin A / B		P (27)
T1PKS	butyrolactol A	P (60)	P (33)
T1PKS	cinnabaramide A	P (18)	P (18)
T1PKS	gargantulide B / C	P (18)	P (26)
T1PKS	tsaloid	P (15)	
T1PKS	linearmycin A / B / C	P (25)	P (25)
T1PKS	miharamycin B / A	P (42)	
T1PKS	stambomycin A / B / C / D	P (100)	P (40)
T1PKS	tetraforicin	P (13)	
T1PKS	tripartitactam/niizalactam C		P (24)
T1PKS/NRPS		1 U	P (33)
T1PKS/NRPS	alchivemycin A / B	P (33)	P (33)
T1PKS/other	tambjamine BE-18591	P (17)	P (17)
T1PKS/T3PKS	caniferolide A / B / C / D	P (48)	P (40)
T2PKS/T1PKS	tautomycin	P (72)	P (72)
T2PKS/LAP/thiopeptide	spore pigment	P (75)	P (75)
terpene		1 U	
terpene	carotenoid	P (63)	
terpene	brasilicardin A	P (38)	P (38)
terpene	geosmin	P (100)	P (100)
terpene	hopene	P (76)	P (76)
thioamide-NRP/ectoine	shiwomycin	P (23)	P (23)
thioamides	rifamycin	P (5)	P (5)
thiopeptide/LAP	hexacosalactone A	P (4)	
Suma		44	38

P, obecność przewidywanego bioklastru; U, niescharakteryzowane klastry. W nawiasach podano % genów wspólnych pomiędzy bioklastrami izolatów a najbliższymi znanymi BGCs wykazującymi znaczące trafienia z wykorzystaniem BLAST.

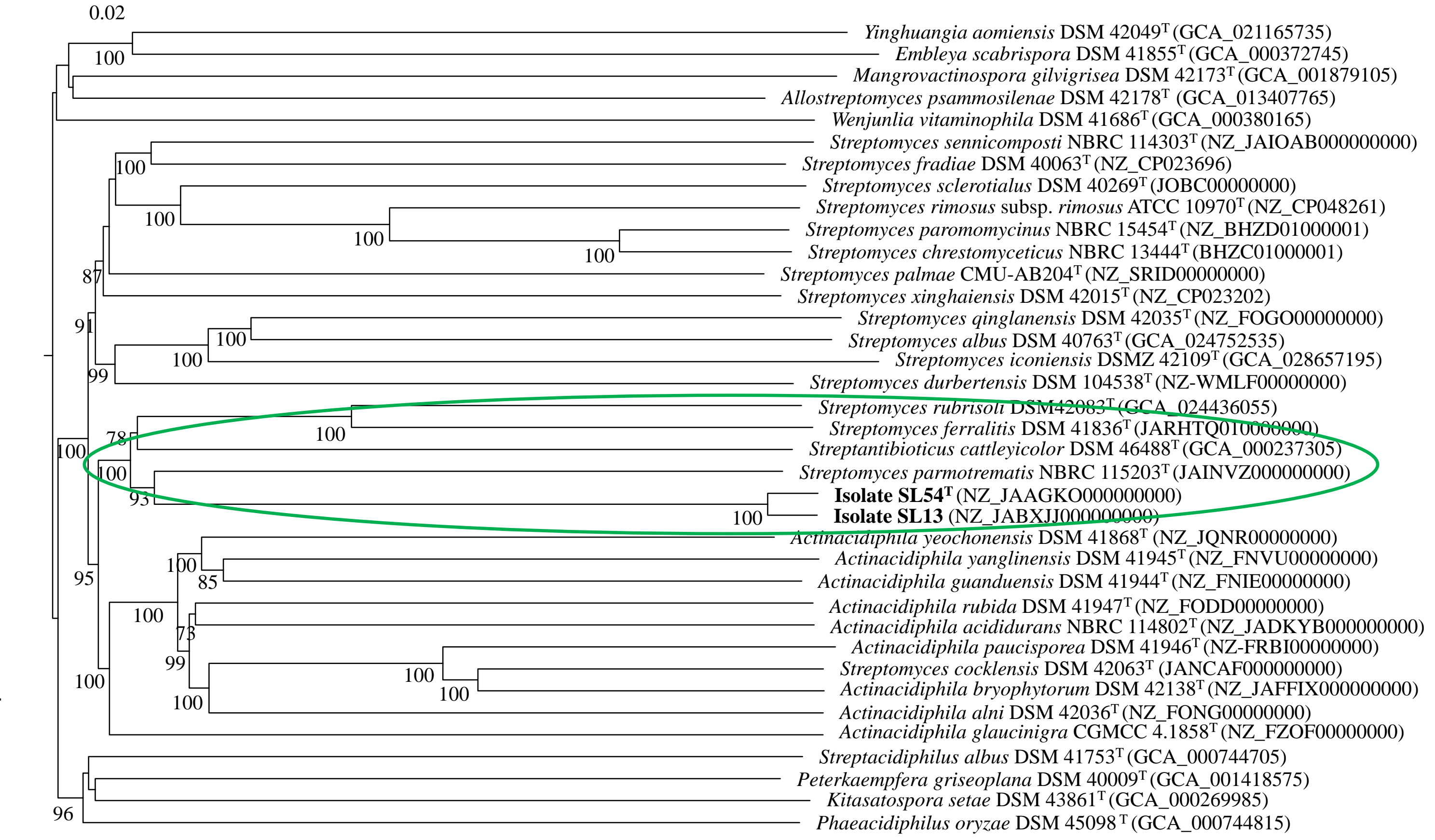


Fig. 3. Drzewo filogenomiczne pokazujące zależności filogenetyczne pomiędzy izolatami, najbliższe spokrewnionymi gatunkami i przedstawicielami rodziny *Streptomycetaceae*.

Tabela 2. Geny odpowiedzi na stres w genomach izolatów SL13 i SL54^T

Geny odpowiedzi na stres	Kodowane białka	SL13	SL54 ^T
Cold shock protein:			
csp	Cold shock protein family	10	10
DNA stabilizing and repair:			
recF	DNA recombination and repair protein	1	1
recN	DNA repair protein	1	0
recO	DNA recombination and repair protein	0	1
recR	DNA recombination and repair protein	1	1
uvrD	ATP-dependent helicase	1	1
uvrD-paralog	ATP-dependent DNA helicase UvrD/PcrA, actinomycete paralog	1	1
Heat shock protein:			
clpB	Protein chaperones, ATP-dependent subunit	2	2
clpC	Protein chaperones, ATP-dependent subunit	2	2
clpX	Protein chaperones, ATP-dependent subunit	1	1
dnaK	Protein chaperones, macromolecule protection and repair	2	2
dnaJ	Protein chaperones	3	2
grpE	Protein chaperones, heat shock protein	2	2
groEL	Heat shock protein 60 kDa family chaperone	2	2
groES	Heat shock protein 10 kDa family chaperone GroES	1	1
groES-like	GroES-like protein found in actinomycetes	1	1
hrcA	Heat-inducible transcription repressor	1	1
Oxidative stress related protein:			
katE	Catalase synthesis	2	2
soxR	Redox-sensitive transcriptional activator	1	1
trx	Putative thioredoxin	4	4
trxR	Thioredoxin reductase	3	3
Sigma factors:			
ECF-type Sig B	RNA polymerase ECF-type Sigma factor	12	15
rpoD	RNA polymerase Sigma factor, transcription initiation	3	3
rsbU	Serine phosphatase RsbU, regulator of Sigma subunit	9	9
rsbW	serine-protein kinase RsbW	2	2
SigB	RNA polymerase Sigma factor, transcription initiation	9	9
SigE	Alternative RNA polymerase	1	1
Suma		78	80

[1] Golińska P., Goodfellow W., Sangal V. (2023). Entering poorly charted waters. The biology of the filamentous acid-loving actinomycetes and acidimicrobia. W: *Actinomycetes in Marine and Extreme Environments: An Unexplored Source for Microbial Biotechnology*. Kurtböke I. (ed.). Taylor and Francis, CRC Press, Boca Raton Florida, USA. pp. 96-148.
 [2] Świecimska M., Golińska P., Sangal V., Wachnowicz B., Goodfellow M. (2023). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, DOI: 10.1099/ijsem.0.005978