

## Preliminary characteristics of fungistatic metabolites produced by *Paenibacillus* sp.

### Wstępna charakterystyka fungistatycznych metabolitów wytwarzanych przez *Paenibacillus* sp.

Romuald Gwiazdowski<sup>1</sup>, Daniela Gwiazdowska<sup>2</sup>, Krzysztof Juś<sup>2</sup>,  
Amelia Bednarek-Bartsch<sup>1</sup>, Beata Danielewicz<sup>1</sup>

#### Summary

The aim of presented research was an evaluation of fungistatic activity of two strains of *Paenibacillus* species including preliminary characteristics of metabolites responsible for antagonism. The tested strains inhibited growth of all fungi used as indicators however belonging to *Microdochium* and *Septoria* genera were more sensitive than *Fusarium*. It was observed that larger amount of *Paenibacillus* sp. added to culture caused usually stronger inhibition of fungal growth and antifungal effect was comparable for both strains. Enzymatic hydrolysis revealed completely lost of antagonistic activity, what indicates that fungistatic metabolites are proteins.

**Key words:** fungistatic activity, preliminary characteristics, protein

#### Streszczenie

Celem pracy była ocena fungistatycznej aktywności dwóch szczepów bakterii z rodzaju *Paenibacillus* z uwzględnieniem wstępnej charakterystyki metabolitów, odpowiedzialnych za antagonizm. Badane szczepy hamowały rozwój wszystkich grzybów wskaźnikowych, jednak większą wrażliwość wykazały grzyby rodzaju *Microdochium* i *Septoria* niż *Fusarium*. Większy dodatek hodowli *Paenibacillus* sp. powodował zwykle silniejsze zahamowanie wzrostu grzybów, przy czym oddziaływanie obu szczepów było podobne. Hydroliza enzymatyczna białek spowodowała całkowity zanik aktywności antagonistycznej, co wskazuje że fungistatyczne metabolity są białkami.

**Słowa kluczowe:** właściwości fungistatyczne, wstępna charakterystyka, białko

<sup>1</sup> Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
Zakład Badania Środków Ochrony Roślin  
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań  
R.Gwiazdowski@iorpib.poznan.pl

<sup>2</sup> Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu  
Wydział Towaroznawstwa  
Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości  
Niepodległości 10, 61-875 Poznań

## Wstęp / Introduction

Rodzaj *Paenibacillus* został wyodrębniony, jako osobna filogenetyczna grupa tlenowych i względnie beztlenowych przetrwalników laseczek, na podstawie analizy 16sRNA (Ash i wsp. 1993; Shida i wsp. 1997). Obecnie do rodzaju tego zalicza się 24 gatunki (Shida i wsp. 1997). Bakterie rodzaju *Paenibacillus* są szeroko rozpowszechnione w środowisku. Ich obecność wykryto między innymi w glebie (Axelrood i wsp. 2002; Garbeva i wsp. 2003), wodzie (Ross i wsp. 2001), ryzosferze (Berge i wsp. 2002; von der Weid i wsp. 2002) czy w tkankach roślin (Shishido i wsp. 1999; Garbeva i wsp. 2001).

Dane literaturowe wskazują, że niektóre gatunki bakterii rodzaju *Paenibacillus*, m.in. *P. polymyxa* czy *P. thiaminolyticus* mają zdolność do wytwarzania substancji o charakterze antybakterijnym, takich jak polimiksyna czy bacifelacyna (Slepecky i Hemphill 1991). Kilka gatunków jest również znanych z produkcji enzymów degradujących naturalne polimery, m.in. chondroitynę, kurdlan czy chitynę (Nakamura 1987; Kanzawa i wsp. 1995). W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień dotyczących wytwarzania przez te bakterie substancji antygrzybowych. Najlepiej poznany gatunkiem wykazującym właściwości fungistatyczne jest *P. polymyxa*, powszechnie występujący w glebie i w ryzosferze (Timmusk i Wagner 1999). Oprócz związków antybakterijnych bakterie tego gatunku wytwarzają fuzyrydyny o silnych właściwościach antygrzybowych w stosunku do takich grzybów, jak: *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium thomii* (Kajimura i Kaneda 1996, 1997) czy *Leptosphaeria maculans* (Beatty i Jensen 2002). Chung (1997) opisał chitynolityczny szczep bakterii, wyizolowany z kompostu, który wykazywał aktywność fungistatyczną wobec grzybów *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lagenarium*, *Sclerotinia sclerotiorum* i *Botrytis cinerea*. Na podstawie charakterystyki fenotypowej oraz analizy molekularnej szczep ten sklasyfikowano jako *Paenibacillus koreensis* sp. nov. (Lee i wsp. 2008) wykazali antagonistyczne właściwości szczepu *P. lentimorbis* WJ5, wyizolowanego z gleby wobec różnych patogenów roślin.

Niektóre szczepy bakterii *Paenibacillus* są zaliczane do PGPR (Plant Growth – Promoting Rhizobacteria), czyli do bakterii pozytywnie wpływających na rośliny uprawne (Timmusk i Wagner 1999; Cheong i wsp. 2005). Oprócz wspomnianych wcześniej właściwości antagonistycznych wobec patogenów roślinnych, bakterie *Paenibacillus* mogą być wykorzystywane w rolnictwie do poprawy kondycji roślin. Bakterie te występują na różnych częściach roślin na zasadzie symbiozy, dzięki czemu dochodzi do stymulacji wzrostu roślin oraz zwiększenia ich odporności na różne czynniki zewnętrzne. Stymulacja wzrostu roślin przez te bakterie odbywa się poprzez wytwarzanie fitohormonów, wspomaganie pobierania związków mineralnych przez rośliny, ograniczanie rozwoju patogenów (wytwarzanie związków przeciwrzybiczych, produkcja antybiotyków, ograniczanie dostępu patogenom do pożywienia) (Kalitkiewicz i Kępczyńska 2008).

Właściwości fungistatyczne bakterii rodzaju *Paenibacillus* są mało poznane, jednak doteczeńowa wiedza pozwala sądzić, że mogą stanowić one czynnik biologicznej ochrony roślin przed patogenami i być wartościową alternatywą dla środków chemicznych. W niniejszej pracy przedstawiono aktywność fungistatyczną dwóch gatunków *Paenibacillus* sp. z uwzględnieniem wstępnej charakterystyki wytwarzanych przez nie substancji antygrzybowych.

## Materiały i metody / Materials and methods

### Materiał badawczy

W badaniach zastosowano dwa szczepy bakterii testowych: *Paenibacillus alvei* PCM 481 i *P. macerans* PCM 1399 – szczepy pochodzące z kolekcji Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Bakterie hodowano na bulionie odżywczym przez 48 godzin w temperaturze 30°C. W zależności od doświadczenia stosowano hodowle z komórkami oraz supernatanty otrzymywane po odwierowaniu hodowli (6000 rpm/min, 15 minut).

### Mikroorganizmy wskaźnikowe

Jako mikroorganizmy wskaźnikowe zastosowano grzyby rodzajów: *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. langsetiae*), *Microdochium nivale* oraz *Septoria tritici* i *S. nodorum*. Grzyby pochodzące z kolekcji Zakładu Badania Środków Ochrony Roślin Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu.

### Ocena aktywności fungistatycznej metodą płytową

Oznaczenie aktywności fungistatycznej przeprowadzono metodą płytową na podłożu PDA (Potato Dextrose Agar). Do płynnej pożywki dodawano hodowle bakterii o gęstości komórek  $10^{10}$  jtk/ml w ilości 5 i 10% lub supernatanty otrzymywane z hodowli w ilości 1 i 5%, a po zestaleniu pożywki na centralnej części płytki umieszczano krążek wycięty z obwodu kultury grzyba. Po osiągnięciu brzegu płytki przez próbę kontrolne określono stopień zahamowania wzrostu.

### Hydroliza enzymatyczna

Roztwory enzymów: proteazy i proteinazy K przygotowywano w buforze fosforanowym i dodawano do supernatantów tak, by ostateczne stężenie wynosiło 0,5 mg/ml. Następnie prowadzono hydrolizę białek przez 2 godziny w 37°C. Po zakończeniu hydrolizy, enzymy inaktywowały poprzez ogrzewanie przez 3 minuty w temperaturze 80°C, a następnie oznaczano aktywność fungistatyczną supernatantów metodą opisaną wcześniej.

### Analiza statystyczna

Wyniki opracowano statystycznie testem Student-Newman-Keuls przy poziomie istotności  $p = 0,05$ .

## Wyniki i dyskusja / Results and discussion

W pierwszej części doświadczeń oceniono oddziaływanie badanych szczepów *Paenibacillus* sp. na wzrost wybranych grzybów rodzajów *Microdochium*, *Septoria* i *Fusarium* (tab. 1). Wyniki doświadczeń wykazały, że obydwa szczepy bakterii hamowały rozwój testowanych grzybów, jednak większą wrażliwością charakteryzowały się rodzaje *Microdochium* i *Septoria*. W zależności od ilości dodanej do podłoża hodowli bakterii, stopień zahamowania grzybni wynosił od 33 do 88%. Bardzo duże zróżnicowanie stopnia hamowania grzybni obserwowano w przypadku grzybów rodzaju *Fusarium*. W zależności od gatunku grzyba, procent zahamowania wynosił od 8 do 79% w przypadku zastosowania 5% dodatku hodowli bakterii oraz od 26 do 87% w przypadku zastosowania dodatku 10%. Porównując siłę oddziaływania testowanych szczepów bakterii można zauważać podobny stopień zahamowania poszczególnych grzybów, co sugeruje że większe znaczenie w tym wypadku miał gatunek grzyba i jego wrażliwość na metabolity wytwarzane przez *Paenibacillus* sp. Podobnie zróżnicowane oddziaływanie różnych gatunków bakterii należących do rodzaju *Paenibacillus* obserwowali inni autorzy (Kajimura i Kaneda 1996, 1997; Chung 1997; Beatty i Jensen 2002).

Do drugiego etapu badań, mającego na celu wstępne określenie charakteru antagonistycznych metabolitów, wybrano szczep *Paenibacillus alvei* PCM 481. W dotechczasowych badaniach do oceny aktywności antygrzybowej wykorzystywano hodowle bakterii, tym razem badaniu został poddany supernatant. Jak wynika z tabeli 2., supernatant wykazał silne oddziaływanie wobec grzybów rodzaju *Fusarium*, co świadczy o tym, iż wytwarzana

przez *P. alvei* substancja należy do metabolitów wydzielanych zewnątrzkomórkowo. Biorąc pod uwagę fakt, iż wiele metabolitów przeciwdrobnoustrojowych ma charakter białkowy, supernatanty poddano hydrolizie enzymatycznej z udziałem proteazy i proteinazy K.

Rezultaty przeprowadzonego doświadczenia wykazały, że supernatanty poddane działaniu enzymów proteolitycznych utraciły właściwości fungistyczne (tab. 2, rys. 1). Dodatek proteazy i proteinazy K do supernatantu z hodowli *P. alvei* zniwelował działanie antagonistyczne wobec grzybów, czego efektem był wzrost grzybni w takim samym tempie, jak w próbie kontrolnej. Wyniki pozwalają stwierdzić, że substancja produkowana przez bakterie *P. alvei*, nadająca im właściwości fungistatyczne, jest substancją o charakterze białkowym.

Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w danych literaturowych. Przykładem antygrzybowych metabolitów o białkowym charakterze są m.in. fuzarycydyny, wytwarzane przez *Paenibacillus* sp. Różne analogi fuzarycydyn wyizolowano z hodowli *P. polymyxa*, w tym LI-F03, LIF04, LI-F05, LI-F06, LI-F07 i LI-F08 (Kurusu i wsp. 1987; Kuroda i wsp. 2001), jak również fuzarycydyny A–D (Kajimura i Kaneda 1996, 1997). Selim i wsp. (2005) wyizolowali i scharakteryzowali antagonistyczne peptydy wytwarzane przez *Paenibacillus* sp. pochodzące z mikoryzofery sorga, a Lee i wsp. (2008) potwierdzili białkowy charakter antygrzybowego metabolitu produkowanego przez *P. lentimorbus* WJ5.

Antygrzybowe, białkowe metabolity budzą coraz większe zainteresowanie w biologicznej ochronie roślin przed patogenami, szczególnie w obliczu tendencji do poszukiwania alternatywy dla stosowania syntetyzowanych, chemicznych środków ochrony roślin.

Tabela 1. Fungistatyczna aktywność *P. alvei* PCM 481 i *P. macerans* PCM 1399 wobec wybranych grzybów patogenicznych  
Table 1. Fungistatic activity of *P. alvei* PCM 481 and *P. macerans* PCM 1399 against chosen pathogenic fungi

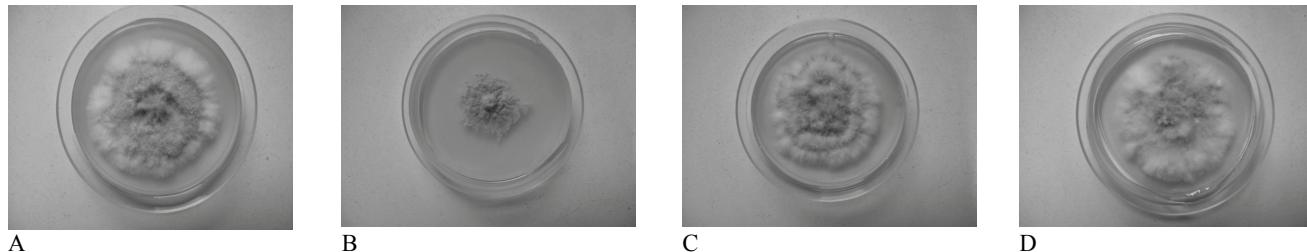
| Gatunek grzyba<br>Fungal species | Procent zahamowania wzrostu<br>przez <i>P. alvei</i> PCM 481<br>Percent of growth inhibition<br>by <i>P. alvei</i> PCM 481 |  | Procent zahamowania wzrostu<br>przez <i>P. macerans</i> PCM 1399<br>Percent of growth inhibition<br>by <i>P. macerans</i> PCM 1399 |  |
|----------------------------------|--|--|--|--|
|                                  | 5% dodatek hodowli<br>5% additive of culture   | 10% dodatek hodowli<br>10% additive of culture | 5% dodatek hodowli<br>5% additive of culture   | 10% dodatek hodowli<br>10% additive of culture |
| Kontrola – Control               | 0 a  | 0 a  | 0 a  | 0 a  |
| <i>Microdochium nivale</i>       | 81 c   | 88 c   | 70 bc  | 87 c   |
| <i>Septoria tritici</i>          | 85 c   | 51 bc  | 80 c   | 51 c   |
| <i>S. nodorum</i>                | 61 c   | –  | 33 b   | –  |
| <i>Fusarium avenaceum</i> 2010   | 52 b   | 79 c   | 50 b   | 78 c   |
| <i>F. avenaceum</i> 1592         | 69 c   | 78c  | 65 c   | 75 c   |
| <i>F. culmorum</i> F01           | 23 b   | 65c  | 34 b   | 72 c   |
| <i>F. equiseti</i> F31           | 22 b   | 72 c   | 22 b   | 70 c   |
| <i>F. graminearum</i> F11        | 0  | 38b  | 0  | 53 c   |
| <i>F. langsetiae</i>             | 79 c   | –  | 70 c   | –  |
| <i>F. oxysporum</i> F41          | 11 b   | 30 b   | 8 b  | 26 b   |

a, b, c – różnice istotne przy  $p < 0,5$  – significantly different at  $p < 0,5$

Tabela 2. Wpływ enzymów proteolitycznych na aktywność fungistatyczną supernatantów otrzymanych z hodowli *P. alvei* PCM 481  
Table 2. The influence of proteolytic enzymes on the fungistatic activity of supernatants obtained from *P. alvei* PCM 481 culture

| Badana frakcja  | Procent zahamowania grzybni przez <i>P. alvei</i> PCM 481<br>Percent of growth inhibition by <i>P. alvei</i> PCM 481 |                        |
|---|--|------------------------|
|   | <i>F. avenaceum</i> 1592   | <i>F. culmorum</i> F01 |
| Kontrola – Control  | 0 a  | 0 a                    |
| 1 % dodatek supernatantu<br>1 % addition of supernatant   | 61 b   | 17 b                   |
| 5 % dodatek supernatantu<br>5 % addition of supernatant   | 65 b   | 20 b                   |
| 1 % dodatek supernatantu po hydrolizie enzymatycznej z proteazą<br>1 % addition of supernatant after enzymatic hydrolysis with protease         | 0 a  | 0 a                    |
| 5 % dodatek supernatantu po hydrolizie enzymatycznej z proteazą<br>5 % addition of supernatant after enzymatic hydrolysis with protease         | 0 a  | 0 a                    |
| 1 % dodatek supernatantu po hydrolizie enzymatycznej z proteinazą K<br>1 % addition of supernatant after enzymatic hydrolysis with proteinase K | 0 a  | 0 a                    |
| 5 % dodatek supernatantu po hydrolizie enzymatycznej z proteinazą K<br>5 % addition of supernatant after enzymatic hydrolysis with proteinase K | 0 a  | 0 a                    |

a, b – różnice istotne przy  $p < 0,5$  – significantly different at  $p < 0.5$



A – bez dodatku supernatantu z hodowli *P. alvei* 481 (kontrola)  
B – z dodatkiem 5% supernatantu z hodowli *P. alvei* 481  
C – z dodatkiem 5% supernatantu z hodowli *P. alvei* 481 po hydrolizie enzymatycznej proteazą  
D – z dodatkiem 5% supernatantu z hodowli *P. alvei* 481 po hydrolizie enzymatycznej proteinazą K  
A – without addition of supernatant from *P. alvei* PCM 481 culture (control)  
B – with addition of 5% supernatant from *P. alvei* PCM 481 culture  
C – with addition of 5% supernatant from *P. alvei* PCM 481 culture after enzymatic hydrolysis with protease  
D – with addition of 5% supernatant from *P. alvei* PCM 481 culture after enzymatic hydrolysis with proteinase K

Rys. 1. Kultury *F. avenaceum* 1952 na pożywce PDA  
Fig. 1. Cultures of *F. avenaceum* 1952 on PDA medium

## Wnioski / Conclusions

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można wysunąć następujące wnioski:

1. Bakterie *Paenibacillus alvei* PCM 481 i *P. macerans* PCM 1399 wykazują fungistatyczne oddziaływanie wobec grzybów rodzajów *Microdochium*, *Fusarium* i *Septoria*.

2. Supernanty z hodowli *P. alvei* wykazują oddziaływanie antagonistyczne wobec grzybów *F. avenaceum* i *F. culmorum*, co dowodzi, iż wytwarzane przez nie substancje należą do metabolitów zewnątrzkomórkowych.
3. Supernanty poddane działaniu enzymów proteolitycznych (proteazy i proteinazy K) traciły całkowicie aktywność, co sugeruje, że substancja antagonistyczna ma charakter białkowy.

## Literatura / References

- Ash C., Priest F.G., Collins M.D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Leeuwenhoek* 64: 253–260.
- Axelrood P.E., Chow M.L., Arnold C.S., Lu K., McDermott J.M., Davies J. 2002. Cultivation-dependent characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. *Can. J. Microbiol.* 48: 643–654.
- Beatty P.H., Jensen S.E. 2002. *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. *Can. J. Microbiol.* 48: 159–169.
- Berge O., Guinebretiere M.H., Achouak W., Normand P., Heulin T. 2002. *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. *Int. Syst. Evolution. Microbiol.* 52: 607–616.
- Cheong H., Park S.Y., Ryu C.M., Kim J.H.F., Park S.H., Park C.S. 2005. Diversity of root-associated *Paenibacillus* spp. in winter crops from the southern part of Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 1286–1298.
- Chung M.H. 1997. Biological control of Rhizoctonia damping-off of radish by antagonistic bacteria with chitinolytic activity in commercial bed soils. MSc thesis, Gyeongsang National University, Chinju, Korea.
- Garbeva P., van Overbeek L.S., van Vuurd E.J.W.L., van Elsas J.D. 2001. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by planting and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microbial Ecol.* 41: 369–383.
- Garbeva P., van Veen J.A., van Elsas J.D. 2003. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecol.* 45: 302–316.
- Kajimura Y., Kaneda M. 1996. Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* 49: 129–135.
- Kajimura Y., Kaneda M. 1997. Fusaricidins B, C, and D, new depsipeptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa* KT-8: isolation, structure elucidation and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* 50: 220–228.
- Kalitkiewicz A., Kępczyńska E. 2008. Wykorzystanie ryzobakterii do stymulacji wzrostu roślin. *Biotechnologia* 81: 102–114.
- Kanzawa Y., Harada A., Takeuchi A., Yokota A., Harada T. 1995. *Bacillus curdlanolyticus* sp. nov. and *Bacillus kobensis* sp. nov., which hydrolyze resistant curdlan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 515–521.
- Kuroda J., Fukai T., Nomura T. 2001. Collision-induced dissociation of ring-opened cyclic depsipeptides with a guanidino group by electrospray ionization/ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 36: 30–37.
- Kurusu K., Ohba K., Arai T., Fukushima K. 1987. New peptide antibiotics LI-F03, F04, F05, F07, and F08, produced by *Bacillus polymyxa*. I. Isolation and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* 40: 1506–1514.
- Lee Y.K., Senthilkumar M., Kim J.H., Swarnalakshmi K., Annapurna K. 2008. Purification and partial characterization of antifungal metabolite from *Paenibacillus lentinorbus* WJ5. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 3057–3062.
- Nakamura L.K. 1987. *Bacillus alginolyticus* sp. nov. and *Bacillus chondroitinus* sp. nov., two alginate-degrading species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 284–286.
- Ross N., Villemur R., Marcandella E., Deschenes L. 2001. Assessment of changes in biodiversity when a community of ultramicrobacteria isolated from groundwater is stimulated to form a biofilm. *Microbial Ecol.* 42: 56–68.
- Selim S., Negrel J., Govaerts C., Gianinazzi S., van Tuinen D. 2005. Isolation and partial characterization of antagonistic peptides produced by *Paenibacillus* sp. strain B2 isolated from the sorghum mycorrhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6501–6507.
- Shida O., Takagi H., Kadokawa K., Nakamura L.K., Komagata K. 1997. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus lucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 289–298.
- Shishido M., Breuil C., Chanway C.P. 1999. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 191–196.
- Slepecky R.A., Hemphill H.E. 1991. The genus *Bacillus* – nonmedical. p. 1663–1696. In: "The prokaryotes" (A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer, eds). Springer, New York, 1992 pp.
- Timmusk S., Wagner E.G.H. 1999. The plant-growth promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: A possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol. Plant Microbiol. Interact.* 2: 951–959.
- von der Weid I., Duarte G.F., van Elsas J.D., Seldin L. 2002. *Paenibacillus brasiliensis* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 52: 2147–2153.