

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИТАТ-ГИДРОЛИЗУЮЩИХ РИЗОБАКТЕРИЙ РОДА *PANTOEAE* НА ОСНОВЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ И МУЛЬТИЛОКУСНОГО АНАЛИЗА¹

© 2021 г. А. Д. Сулейманова^a, *, Д. Л. Иткина^a, Д. С. Пудова^a, М. Р. Шарипова^a

^aКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

*e-mail: aliya.kzn@gmail.com

Поступила в редакцию 03.05.2020 г.

После доработки 21.08.2020 г.

Принята к публикации 28.08.2020 г.

В связи с гомологичной рекомбинацией, которая может нарушать границы видов, точная идентификация бактерий рода *Pantoea* тяжело достижима. В настоящее время в определении видов бактерий максимально эффективным является комплексный подход. Биохимическая идентификация с помощью системы API20E, филогенетический анализ последовательностей генов 16S рРНК и MLSA анализ на основе частичных последовательностей генов *fusA*, *pyrG*, *leuS*, *gyrB* и *rpoB* показал, что выделенные почвенные фитат-гидролизующие штаммы являются членами рода *Pantoea*, а именно вида *Pantoea brenneri*. Изучение способности штаммов к фиксации атмосферного азота позволило отнести их к диазототрофам.

Ключевые слова: *Pantoea*, идентификация, MLSA, API20E, фиксация азот

DOI: 10.31857/S0026365621010122

Род *Pantoea* был впервые описан французским ученым Gavini et al. (1989) и состоял из двух видов — *Pantoea agglomerans* sp. nov. и *Pantoea dispersa* sp. nov. На сегодняшний день род представлен 29 видами (<http://www.bacterio.net/pantoea.html>). Представители рода *Pantoea* выделяются из различных сред обитания, таких как почва, вода, продукты питания, растения, животные и люди (Chen et al., 2017). Одни из первых изолятов были признаны патогенами растений, вызывающими галлы, увядание, мягкую гниль и некрозы ряда сельскохозяйственных культур (Brady et al., 2008; Herrera et al., 2008). Другие же изоляты *Pantoea*, напротив, продуцируют антимикробные соединения и широко используются в качестве коммерческих биопрепаратов (Johnson et al., 1993). Например, бактерии вида *P. ananatis* обладают способностью разлагать гербициды без образования токсичных побочных продуктов и могут найти применение в биоремедиации почв (Pileggi et al., 2012). Вид *P. agglomerans* был первоначально идентифицирован как возбудитель болезней у широкого круга растений, однако многие штаммы, принадлежащие к этому виду, напротив, проявляют свойства, способствующие росту и развитию растений и

биоконтролю над фитопатогенами (Dutkiewicz et al., 2016). Повсеместность, универсальность и генетическая пластичность изолятов *Pantoea* делают этот род идеальной группой не только для изучения характерных для нее процессов адаптации и оппортунизма, но и для разработки коммерческих продуктов с целью применения их в медицине и сельском хозяйстве (Walterson, Stavrinides, 2015).

Филогенетический анализ и сравнение с другими родами семейства *Erwiniaceae* показал, что род *Pantoea* весьма разнообразен. Биохимическая гетерогенность внутри рода усложняет идентификацию штаммов до вида. Точная идентификация бактерий рода *Pantoea* тяжело достижима, особенно учитывая тот факт, что гомологичная рекомбинация и латеральный перенос генов могут нарушать границы видов. В настоящее время в определении видов бактерий используется комплексный подход, включающий в себя как геномные, так и фенотипические характеристики штаммов (Deletoile et al., 2009).

Использование 16S рРНК является важным инструментом для классификации и систематики представителей рода *Pantoea*. Однако последовательности генов 16S рРНК демонстрируют низкое разрешение на внутриродовом уровне (Gonzalez et al., 2013), что делает невозможной надежную идентификацию бактерий до видов и

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365621010122 для авторизованных пользователей.

подвидов. Таким образом, определение вида новых штаммов требует проведения более точного анализа, с использованием улучшенных таксономических методов, таких как мультилокусный филогенетический анализ (MLSA) (Gevers et al., 2005). В настоящее время определение видов бактерий основано на анализе мультилокусных последовательностей генов домашнего хозяйства, таких как *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB* и *rpoB*, которые регулярно используются для уточнения межвидовых филогенетических позиций видов из рода *Pantoea* (Brady et al., 2008; Deletoile et al., 2009; Palmer et al., 2017; Tambong, 2019). Установлено, что подход MLSA, основанный на шести генах (*leuS*, *fusA*, *gyrB*, *pyrG*, *rpoB* и *rplB*), обеспечивает надежное разграничение видов у рода *Pantoea* (Tambong, 2019). Кроме того, анализ MLSA повышает качество филогенетической реконструкции и сводит к минимуму вес событий рекомбинации (Deletoile et al., 2009).

В данной работе мы сообщаем о таксономической характеристике выделенных нами штаммов *Pantoea* sp. 3.1, 3.2, 3.5.2 и 3.6.1 с использованием полифазного подхода, включающего в себя фенотипические, генотипические и филогенетические данные. Оценивается способность штаммов к фиксации молекулярного азота, которая, вкуче с установленной ранее фитат-гидролизующей активностью, может способствовать росту и развитию растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы, питательные среды и условия культивирования. Все исследуемые бактерии были выделены из образцов почвы Республики Татарстан в 2009 г. по признаку максимальной фитат-гидролизующей активности (Suleimanova et al., 2015). Отбор штаммов производили на агаризованной среде PSM (phytase-screening medium), которая содержит фитат кальция в качестве единственного источника фосфора. С помощью ряда биохимических тестов штаммы были отнесены к порядку *Enterobacterales*, а анализ последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК, позволил идентифицировать изоляты как *Pantoea* sp. 3.1, 3.2, 3.5.2 и 3.6.1. Видовую принадлежность установить не удалось.

Для культивирования бактерий использовали среду LB (Лурия–Бертони) (г/л): триптон – 10.0, дрожжевой экстракт – 5.0, NaCl – 5.0. Бактерии культивировали в термостате-шейкере фирмы “KA@KS 4000” (Германия) при 37°C и интенсивности качания 200 об./мин. Оптическую плотность культуры измеряли на спектрофотометре iMark™ (“Bio-Rad”, США) при длине волны 590 нм.

Биохимические тесты проводили с использованием метода API (Analytical Profile Index) 20E

“bioMérieux” (Франция). Стрипы API 20E использовали в соответствии с инструкцией производителя (“bioMérieux”). Все тесты были проведены в трех биологических повторностях. Профили аналитических индексов были установлены через 24 и 48 ч инкубации при 37°C. Идентификация проводилась с использованием базы данных Биохимической идентификации “ABIS” (https://www.tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html).

Амплификация, очистка и секвенирование ДНК.

Для амплификации и секвенирования внутренних участков шести генов домашнего хозяйства *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB*, гена, кодирующего 16S rRNA и гена *repA* (с плазмиды патогенности) использовали праймеры, представленные в табл. 1 по протоколу, описанному в работе Deletoile et al. (2009). Олигонуклеотиды были синтезированы в компании “Евроген” (Москва).

Для ПЦР-амплификации использовали DreamTaq ДНК-полимеразу “Thermo Scientific™” (США) (5 ед./мкл) – 0.08 мкл; 10× DreamTaq буфер (с добавлением 20 mM MgCl₂) – 1.5 мкл; праймеры (5 мкМ) – 0.5 мкл; смесь dNTP (10 mM) – 0.5 мкл; безнуклеазную воду “Invitrogen™” (США) – 6.92 мкл. В качестве ДНК-матрицы использовали ресуспендированные в стерильной дистиллированной воде колонии свежей 18 ч культуры бактерий, выращенной при 37°C на агаризованной среде LB. ПЦР-амплификацию проводили с помощью амплификатора “T100™ Thermal Cycler Bio-Rad” (США), условия проведения реакций представлены в табл. 1. Полученные продукты очищали с помощью набора для очистки продуктов ПЦР GeneJET PCR Purification Kit (“Thermo Scientific™”, США). Секвенирование полученных ПЦР-продуктов проводили на секвенаторе SOLiD xl 5500 Wildfire (“Life Technologies”, США) Междисциплинарного центра коллективного пользования КФУ.

Мультилокусный филогенетический анализ.

Первичный анализ полученных последовательностей проводили с использованием программы BLAST сервера NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Конкатенированные последовательности генов сравнивали с таковыми у типовых штаммов рода *Pantoea*, которые указаны в базе данных BacDive (<https://bacdive.dsmz.de/>). Филогенетический анализ исследуемых штаммов проводили в программе MEGA7 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27004904>). Всего в исследовании использовали последовательности генов 55 представителей рода *Pantoea*, которые были загружены из базы данных GenBank NCBI (табл. S1). Множественное выравнивание последовательностей было выполнено, используя программу ClustalW (Thompson et al., 1994). Выводимые последовательности генов использовались для построения филогенетического дерева по методу максимального прав-

Таблица 1. Праймеры и условия, используемые для амплификации и секвенирования

Ген	Праймер	Программа ПЦР	Последовательность (5'–3')	Размер п.о.	Назначение праймеров
16S rRNA	27 F	94°C – 4 мин	GAGTTTGATCCTG	633	Амплификация
	1492 R	94°C – 1 мин 49°C – 1 мин 72°C – 1 мин (35 циклов); 72°C – 7 мин	TACCTTGTTACGACT		Реамплификация
<i>repA</i>	Rep23220_5	94°C – 4 мин	TACATCACACCAAAATTAAT		Амплификация
	Rep25101_3	94°C – 30 с 45°C – 30 с 72°C – 1 мин (30 циклов); 72°C – 5 мин	ATACTGTTAATGTAGTGATA		Реамплификация
<i>gyrB</i>	gyrB3	94°C – 2 мин 94°C – 1 мин 60°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (10 циклов);	GCG TAA GCG CCC GGG TAT GTA	417	Амплификация
	gyrB4		CCG TCG ACG TCC GCA TCG GTC AT		Реамплификация
	gyrB3i		AAC GCW ATC GAC GAA GC		Амплификация, секвенирование
	gyrB4i		TGG AAV CCR TCR TTC CAC		Реамплификация, секвенирование
<i>leuS</i>	leuS3	94°C – 1 мин 60°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (10 циклов);	CAG ACC GTG CTG GCC AAC GAR CAR GT	642	Амплификация
	leuS4		CGG CGC GCC CCA RTA RCG CT		Реамплификация
<i>fusA</i>	fusA3	94°C – 1 мин, 50°C – 1 мин, 72°C – 1 мин	CAT CGG TAT CAG TGC KCA CAT CGA	633	Амплификация
	fusA4		CAG CAT CGC CTG AAC RCC TTT GTT		Реамплификация
<i>pyrG</i>	pyrG3	(21 цикл); 72°C – 5 мин	GGG GTC GTA TCC TCT CTG GGT AAA GG	306	Амплификация
	pyrG4		GGA ACG GCA GGG ATT CGA TAT CNC CKA		Реамплификация
<i>rplB</i>	rplB3		CAG TTG TTG AAC GTC TTG AGT ACG ATC C	333	Амплификация
	rplB4		CAC CAC CAC CAT GYG GGT GRT C		Реамплификация
<i>rpoB</i>	Vic3	94°C – 4 мин	GGC GAA ATG GCW GAG AAC CA	501	Амплификация
	Vic4	94°C – 30 с 50°C – 30 с 72°C – 30 с (30 циклов); 72°C – 5 мин	GAG TCT TCG AAG TTG TAA CC		Реамплификация

доподобия (ML), основанного на Общей Обратимой модели времени (GTR), и по методу присоединения соседей (NJ), с использованием модели замен Jukes–Cantor (JC). Показатель достоверности порядка ветвления для деревьев ML и NJ оценивали с помощью бутстреп-анализа (1000 повторностей) и указывали в узлах ветвей в виде процентов, при этом оставляя значения досто-

верности свыше 70%. Последовательности генов *fusA*, *leuS*, *pyrG*, *gyrB*, *rplB* и *rpoB* всех четырех штаммов были депонированы в базу данных GenBank NCBI под номерами: для гена *fusA* – MT415378, MT415382, MT415386, MT415390; *leuS* – MT415379, MT415383, MT415387, MT415391; *pyrG* – MT415380, MT415384, MT415388, MT415392; *rpoB* – MT415381, MT415385, MT415389, MT415393;

gyrB – MT646765, MT646766, MT646767, MT646768;
rplB – MT646769, MT646770, MT646771, MT646772.

Способность штаммов к фиксации атмосферного азота. Для установления азотфиксирующей способности изолятов использовали селективную питательную среду Эшби (г/л дистиллированной воды): K_2HPO_4 – 0.1; KH_2PO_4 – 0.4; $MgSO_4$ – 0.2; $NaCl$ – 0.1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.08, $CaCl_2$ – 0.02; $FeCl_3$ – 0.01; Na_2MoO_4 – 0.002; сахароза – 20; pH 6.9 (Subba, 1977). Питательная среда Эшби не содержит в себе источника азота, поэтому только бактерии, обладающие способностью фиксировать азот из атмосферы, образуют колонии на данной среде. Изоляты инкубировали при 37°C в течение 24 ч, затем оценивали рост микроорганизмов.

Исследовали накопление биомассы бактериями на жидкой среде Эшби. Посевным материалом служил предварительно выращенный на среде Эшби инокулят исследуемых штаммов. Для посева использовали 2% инокулята и вносили в стерильную среду. Культивирование проводили на качалке при 37°C и 200 об./мин в течение 44 ч. Плотность клеток измеряли на спектрофотометре iMark™ (“Bio-Rad”, США) при ОП₆₀₀.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика бактериальных изолятов. Почвенные изоляты рода *Pantoea* представляют собой грамотрицательные, факультативно анаэробные, не образующие спор мелкие палочки. Величина клеток односточной культуры на питательной среде LB составляла 3–6 × 0.6 мкм. Исследуемые штаммы при росте на агаризованной среде синтезировали пигмент желтого цвета, за исключением изолята *Pantoea* sp. 3.5.2, который образовывал пигмент кремового цвета.

Вирулентность *P. agglomerans*, как патогена растений, связана с плазмидой pPATN, которая несет в себе островки патогенности (Manulis et al., 1991). Чтобы определить наличие или отсутствие плазмиды pPATN в исследуемых штаммах, мы провели ПЦР-анализ с использованием праймеров Rep23220_5 и Rep25101_3 (табл. 1). Данная пара праймеров позволяет амплифицировать ген *repA*, который кодирует репликазу А плазмиды pPATN. Установили, что ни один из исследуемых нами штаммов *Pantoea* sp. не несет в своем геноме ген *repA*. Таким образом, плазида pPATN в изучаемых изолятах отсутствует, что указывает на авирулентность исследуемых нами штаммов по отношению к растениям.

Биохимические свойства. На основании тестов API 20E все почвенные изоляты имели типичные характеристики для рода *Pantoea*, к которому они относятся: они не обладали способностью ни расщеплять уреазу, ни декарбоксилировать аргинин, лизин и орнитин, ни выделять H₂S из тиосульфа-

та, не образовывали индол (табл. 2). У всех штаммов была положительная реакция на β-галактозидазу. При ферментации сахаров использовали глюкозу, маннозу, инозит, арабинозу, также они были способны гидролизовать желатин. Тест на цитохром С-оксидазу у всех штаммов был отрицательным.

Однако штаммы отличались друг от друга по некоторым свойствам (табл. 2). Например, при ферментации сахаров изолят *Pantoea* sp. 3.2 обладал способностью ферментировать рамнозу и сахарозу, в отличие от отрицательных реакций на данные сахара у других штаммов. В свою очередь, штамм *Pantoea* sp. 3.5.2 не ферментировал мелибиозу и амигдалин, и не обладал способностью использовать цитрат в качестве единственного источника углерода, в отличие от других штаммов.

Идентификацию штаммов проводили путем считывания шкалы API 20E, отметив каждый тест выставленным баллом в триплетах с использованием базы данных биохимической идентификации “ABIS” (табл. 3). Изоляты *Pantoea* sp. 3.1 и *Pantoea* sp. 3.6.1, обладающие одинаковым биохимическим профилем, идентифицированы как *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* (88 и 91% идентичности). Единственный штамм, ферментирующий рамнозу и сахарозу, *Pantoea* sp. 3.2, был идентифицирован как *P. ananatis* (91%). Изолят *Pantoea* sp. 3.5.2, не использующий цитрат как единственный источник углерода и не ферментирующий мелибиозу и амигдалин, идентифицирован как *Pantoea agglomerans* (83%) (табл. 3). Процент точности идентификации видов бактерий с помощью ABIS считается допустимым в диапазоне от 88 до 99%.

Идентификация штаммов в системе API 20E часто оказывается на уровне предположительной и требует дополнительной верификации (Афанасьев и соавт., 2014). При использовании системы API 20E существует ряд ограничений в интерпретации результатов: оценка изменения цвета ячейки может быть субъективной, длительная ручная обработка изолятов, усложненная система архивации и поиска информации в оценочных листах API. Например, при идентификации 58 штаммов *Burkholderia pseudomallei* и 23 штаммов *B. mallei* с использованием данной системы корректное определение вида наблюдалось лишь в 60% случаев (Glass, Popovic, 2005). Для более достоверной идентификации видов необходимо дополнительно применение других молекулярно-генетических методов.

Филогенетический анализ. Идентификацию изолятов проводили путем анализа гена, кодирующего 16S рРНК. Последовательность гена 16S рРНК исследуемых штаммов имела высокую степень гомологии (более 99%) с генами других видов рода *Pantoea*: 99.8% со штаммами *P. agglomer-*

Таблица 2. Биохимические свойства исследуемых штаммов *Pantoea* sp. 3.1, *Pantoea* sp. 3.2, *Pantoea* sp. 3.5.2, *Pantoea* sp. 3.6.1

Тест	Обозначение теста	<i>Pantoea</i> 3.1	<i>Pantoea</i> 3.2	<i>Pantoea</i> 3.5.2	<i>Pantoea</i> 3.6.1	<i>Pantoea bremeri</i> sp. nov.
ONPG	Фермент β -галактозидаза	+	+	+	+	+
ADH	Декарбоксилирование аргинина	–	–	–	–	–
LDC	Декарбоксилирование лизина	–	–	–	–	–
ODC	Декарбоксилирование орнитина	–	–	–	–	–
CIT	Использование цитрата как единственного источника углерода	+	+	–	+	–
H ₂ S	Производство сероводорода	–	–	–	–	–
URE	Фермент уреазы	–	–	–	–	–
TDA	Фермент триптофан-деаминаза	+	+	+	+	
IND	Производство индола	–	–	–	–	–
VP	Производство ацетона	+	+	+	+	+
GEL	Разжижение желатина	+	+	+	+	+
Ферментация сахаров:						
GLU	Глюкоза	+	+	+	+	+
MAN	Манноза	+	+	+	+	+
INO	Инозит	+	+	+	+	+
SOR	Сорбит	–	–	–	–	–
RHA	Рамноза	–	+	–	–	+
SAC	Сахароза	–	+	–	–	–
MEL	Мелибиоза	+	+	–	+	–
AMY	Амигдалин	+	+	–	+	
ARA	Арабиноза	+	+	+	+	+
OX	Тест на цитохром с оксидазу	–	–	–	–	–

Таблица 3. Идентификация почвенных изолятов с помощью базы данных “ABIS”

Почвенный изолят	Штамм	Процент идентичности
<i>Pantoea</i> 3.1	<i>P. stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i>	88
<i>Pantoea</i> 3.2	<i>P. ananatis</i>	91
<i>Pantoea</i> 3.5.2	<i>P. agglomerans</i>	83
<i>Pantoea</i> 3.6.1	<i>P. stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i>	91

ans, 99.6% со штаммами *P. vagans*, 99.4% со штаммами *P. ananatis*, *P. conspicua* и 99.2% со штаммами *P. anthophila*. Таким образом, анализ последовательности генов, кодирующих 16S рРНК штаммов 3.1, 3.2, 3.5.2, 3.6.1 позволил подтвердить принадлежность выделенных микроорганизмов к семейству *Erwiniaceae*, роду *Pantoea*, но не позволил однозначно определить вид исследуемых изолятов. Установлено, что порог сходства генов для классификации видов составляет 98.7–99% (Stackebrandt et al., 2006). Предыдущие исследования показали ограничения последовательности гена 16S рРНК как единственного маркера для сравнительных филогенетических исследований — 16S рРНК часто имеет слабую дискриминационную силу, может не отражать общие взаимосвязи и может быть неточным в идентификации некоторых видов (Janda et al., 2007). Полученные нами результаты демонстрируют, что разнообразие 16S рРНК внутри рода *Pantoea* выше данного значения, подтверждая, что ген 16S рРНК не содержит достаточных вариаций для дифференциации видов в пределах данного рода.

Мультилокусный анализ (MLSA) был предложен как лучший альтернативный подход к определению филогении новых изолятов (Palmer et al., 2017; Tambong et al., 2019), в частности, видовую идентификацию внутри рода *Pantoea*. Уровень генетического полиморфизма в генах домашнего хозяйства достаточно высок для оценки филогенетического родства между микроорганизмами (Maiden, 2006). Ген *leuS* кодирует лейцил-тРНК-синтетазу, ген *pyrG* кодирует СТР-синтазу; ген *rpoB* кодирует β -субъединицу РНК-полимеразы, ген *gyrB* является структурным геном для β -субъединицы ДНК-гиразы, ген *fusA* кодирует фактор элонгации белковой цепи (EFG) (Holmes et al., 2004). Мультилокусный филогенетический анализ был основан на сравнении последовательностей пяти генов домашнего хозяйства — *fusA*, *leuS*, *pyrG*, *gyrB* и *rpoB* (Tambong et al., 2014). Кроме вышеперечисленных генов, были секвенированы локусы гены *rplB*, однако использовать их для филогенетического анализа не удалось, поскольку последовательности этого гена в базе данных представлены лишь для 28 штаммов из 55 используемых представителей.

Для четырех исследуемых штаммов были получены частичные последовательности пяти кодирующих белок генов, которые впоследствии были объединены в следующем порядке: *fusA* (588 п.н.), *leuS* (642 п.н.), *pyrG* (372 п.н.), *rpoB* (409 п.н.) и *gyrB* (774 п.н.). Таким образом, общая длина конкатенированной последовательности составила 2785 п.н. Сравнение с помощью BLAST NCBI объединенных последовательностей исследуемых и типовых штаммов рода *Pantoea* позволило провести идентификацию изолятов. Процент гомологии среди штаммов варьировал от

80.0 до 99% (табл. S2). При этом все четыре штамма показали высокий процент гомологии с типовым штаммом вида *P. brenneri* LMG 5343 — более 99%.

Филогенетическое дерево, полученное при сравнении выровненных объединенных последовательностей генов по методу максимального правдоподобия (ML), показало наличие четырех основных филогенетических подгрупп рода *Pantoea* — *P. stewartii*, *P. ananatis*, *P. agglomerans* и *P. vagans* (рис. 1). При этом исследуемые штаммы образовали отдельный кластер с представителями вида *P. brenerii* — *P. brenerii* B024858 и *P. brenerii* B016381, который четко отделен от остальных филогрупп, демонстрируя процент достоверности узла равный 91%. Кроме того, степень достоверности данного узла так же была подтверждена построением филогенетического дерева по методу присоединения соседей (NJ) (рис. 1).

Ранее, при сравнении филогенетических деревьев, построенных на основе одного гена, с деревьями, полученными на основе сцепленных последовательностей, было выявлено, что ген *leuS* является надежным филогенетическим маркером для идентификации новых штаммов рода *Pantoea* (Tambong et al., 2014). Исходя из этого, нами дополнительно было построено филогенетическое дерево на основе гена домашнего хозяйства *leuS*, с использованием методов NJ и ML. Дерево в целом демонстрирует схожую топологию с деревом на основе сцепленных последовательностей, однако есть штаммы, которые меняют свое местоположение (рис. S1). В данном случае исследуемые штаммы образовали обособленный кластер со всеми представителями вида *P. brenneri*, используемыми в данном исследовании. Это различие в топологии штаммов может быть следствием различных процессов эволюции, которые претерпевают гены, используемые в мультилокусном анализе. Тем не менее, исходя из полученных данных, можно предположить, что исследуемые изоляты являются представителями вида *P. brenneri*.

Идентификация изолятов с помощью тест-системы API 20E не подтверждается результатами филогенетического анализа. Виды *P. stewartii* subsp. *indologenes*, *P. ananatis* и *P. agglomerans* образуют отдельные филогенетические кластеры, которые не включают в себя изучаемых изолятов (рис. 1). Биохимические свойства штаммов значительно отличаются друг от друга и от типового штамма *P. brenneri* (табл. 2). Однако известно, что представителям рода *Pantoea* присуща биохимическая гетерогенность даже в рамках одного вида. Например, в геноме *P. vagans* C9-1 обнаружены два кластера генов для утилизации сорбитола, которые отсутствуют у других штаммов *P. vagans* (Smits et al., 2011). Следовательно, эти дан-

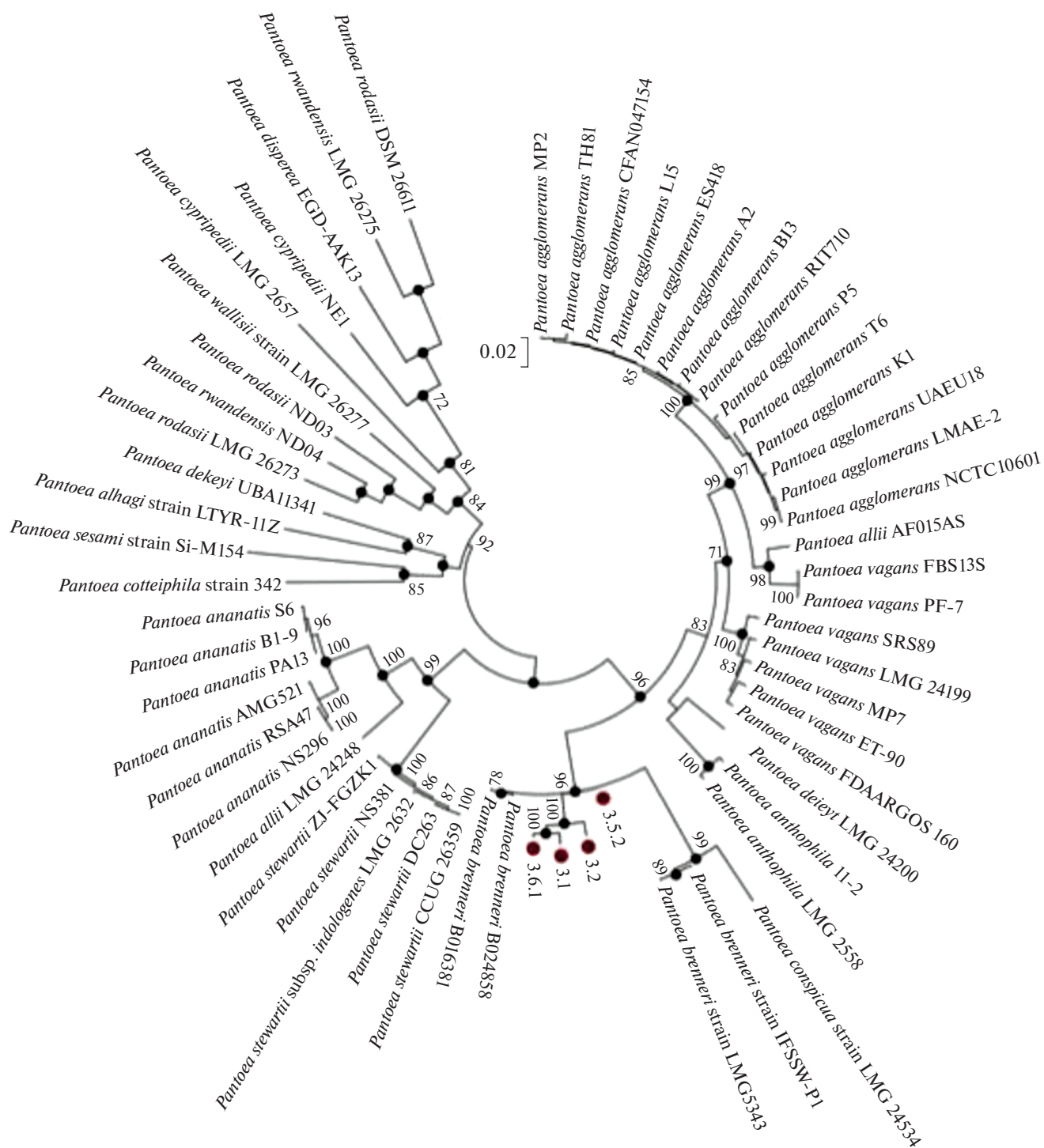


Рис. 1. Филогенетическое дерево 59 представителей рода *Pantoea*, основанное на анализе объединенных последовательностей генов *fusA*, *leuS*, *pyrG*, *gyrB* и *rpoB*. Дерево построено в программе MEGA7 методом максимального правдоподобия (ML). Черными кругами обозначены узлы, которые подтверждены алгоритмом присоединения соседей (NJ). Цифрами в узлах филогенетического дерева показана достоверность ветвления на основе бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев (в %), при этом значащими признаются значения больше 70%. Шкала масштаба показывает эволюционное расстояние, соответствующее 2 заменам на каждые 100 нуклеотидов.

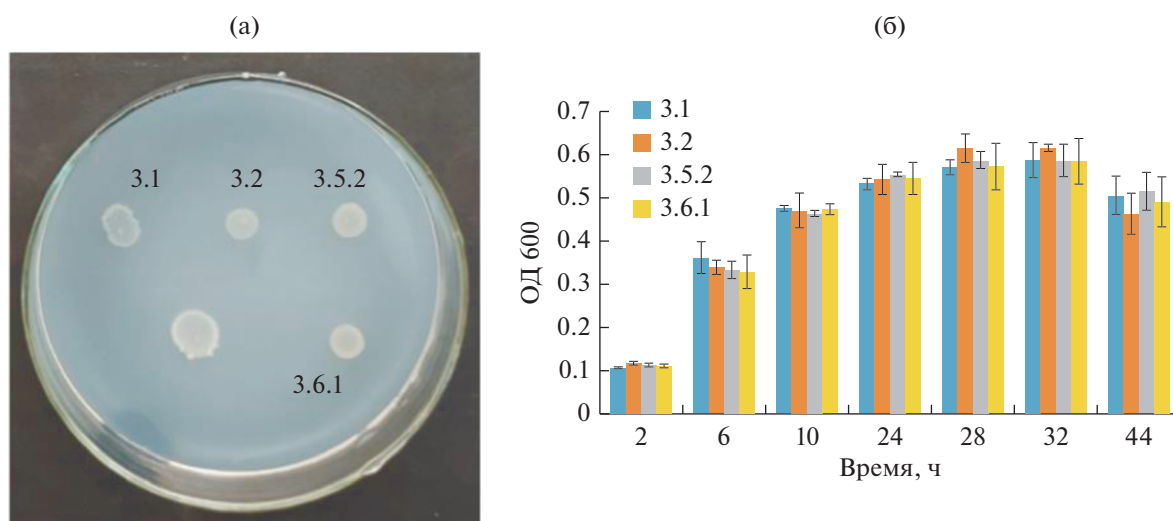


Рис. 2. Рост бактериальных штаммов *Pantoea* sp. на дифференциальной питательной среде Эшби: а — образование колоний на агаризованной среде; б — динамика роста бактерий на жидкой безазотной среде Эшби.

ные не противоречат идентификации выделенных штаммов как *P. brenneri*.

Способность штаммов к фиксации атмосферного азота. Изучали способность четырех бактериальных штаммов *P. brenneri* к фиксации атмосферного азота с помощью дифференциальной питательной среды Эшби. Рост колоний был зафиксирован через 12 ч культивирования при 37°C, что говорит о способности штаммов к использованию молекулярного азота, поскольку источник азота в питательной среде отсутствовал. Исследуемые бактерии при росте на твердой питательной среде Эшби образуют плоские, блестящие, гладкие с ровными краями колонии (рис. 2а). На данной питательной среде пигмент не образовывался, все колонии были кремового цвета.

Для подтверждения способности штаммов *P. brenneri* к азотфиксации изучали динамику накопления биомассы на жидкой безазотной среде Эшби, используя в качестве инокулятов 12-часовые культуры штаммов на этой же среде. Все исследуемые штаммы успешно росли в жидкой безазотной среде, демонстрируя стандартную кривую роста (рис. 2б). В течении первых 10 ч культивирования наблюдался активный рост культуры, затем бактерии переходили в длительную стационарную фазу, после которой происходило снижение уровня накопления биомассы. Аналогичная кривая роста с активным накоплением биомассы в первые часы культивирования наблюдалась у штамма *P. agglomerans* на безазотной среде Эшби (Doty et al., 2009).

Таким образом, с помощью фенотипических методов установили, что исследуемые бактерии можно отнести к группе азотфиксирующих бактерий (дiazотрофы) (Quispel, 1988). Способность

к фиксации азота бактериями рода *Pantoea* отмечается несколькими авторами (Loiret et al., 2004; Dutkiewicz et al., 2016). Была отмечена способность к фиксации азота штаммом *P. agglomerans*. Бактериальный штамм способен фиксировать азот как в чистой культуре, так и в сочетании с растениями пшеницы в гидропонике (Merbach et al., 1997).

В заключение отметим, что только с помощью MLSA на основе частичных последовательностей генов *fusA*, *pyrG*, *leuS*, *gyrB* и *rpoB* нам удалось произвести идентификацию почвенных изолятов до вида — *P. brenneri*. Установлено, что штаммы *P. brenneri* 3.1, 3.2, 3.5.2 и 3.6.1, помимо гидролиза почвенных фитатов, также обладают способностью к фиксации молекулярного азота, что может способствовать росту и развитию растений за счет увеличения доступности макроэлементов. Соответственно, штаммы *P. brenneri* 3.1, 3.2, 3.5.2 и 3.6.1 могут быть рассмотрены в качестве кандидатов для создания экологически чистого биопрепарата, заменяющего ряд химических удобрений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РНФ 19-76-00020.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

В настоящей статье отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Басов Е.А., Остяз А.С., Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ в ускоренной идентификации микроорганизмов рода *Vibrio* // Мол. генет., микробиол. вирусол. 2014. № 3. С. 22–28.
- Brady C., Cleenwerck I., Venter S., Vancanneyt M., Swings J., Coutinho T. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA) // Syst. Appl. Microbiol. 2008. V. 31. P. 447–460.
- Chen C., Xin K., Liu H., Cheng J., Shen X., Wang Y., Zhanga L. *Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat // Sci. Rep. 2017. V. 7. Art. 41564.
- Deletoile A., Decre D., Courant S., Passet V., Audo J., Grimont P., Arlet G., Brisse S. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing // Bacteriology. 2009. V. 47. P. 300–310.
- Doty S.L., Oakley B., Xin G., Kang J.W., Singleton G., Khan Z., Vajzovic A., Staley J.T. Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow // Symbiosis. 2009. V. 47. P. 23–33.
- Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Lemieszek M.K., Golec M., Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects // Ann. Agric. Environ. Med. 2016. V. 23. P. 206–222.
- Gavini F., Mergaert J., Beji A., Mielcarek C., Izard D., Kers-ter S.K., De Ley J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pan-toea dispersa* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1989. V. 39. P. 337–345.
- Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J., Stackebrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F.L., Swings J. Re-evaluating prokaryotic species // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. P. 733–739.
- Glass M.B., Popovic T. Preliminary evaluation of the API 20NE and RapID NF Plus Systems for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* // Clin. Microbiol. 2005. V. 43. P. 479–483.
- Gonzalez A.J., Cleenwerck I., De Vos P., Fernandez-Sanz A.M. *Pseudomonas asturiensis* sp. nov., isolated from soybean and weeds // Syst. Appl. Microbiol. 2013. V. 36. P. 320–324.
- Herrera C., Koutsoudis M., Wang X., Bodman S. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* exhibits surface motility, which is a critical aspect of stewart's wilt disease development on maize // Mol. Plant Microbe Interact. 2008. V. 21. P. 1359–1370.
- Holmes D.E., Nevin K.P., Lovley D.R. Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family *Geobacteraceae* fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 1591–1599.
- Janda J.M., Abbott S.L. 16S rRNA gene sequencing for bac-terial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls // J. Clin. Microbiol. 2007. V. 45. P. 2761–2764.
- Johnson K.B., Stockwell V.O., McLaughlin R., Sugar D., Loper J.E., Roberts R.G. Effect of antagonistic bacteria on establishment of honey bee-dispersed *Erwinia amylovora* in pear blossoms and on fire blight control // Phytopathology. 1993. V. 83. P. 995–1002.
- Loiret F.G., Ortega E., Kleiner D., Ortega-Rodes P., Rodes R., Dong Z. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacteri-um *Pantoea* sp. from sugarcane // J. Appl. Microbiol. 2004. V. 97. P. 504–511.
- Maiden M.C. Multilocus sequence typing of bacteria // Annu. Rev. Microbiol. 2006. V. 60. P. 561–588.
- Manulis S., Gafni Y., Clark E., Zutra D., Ophir Y., Barash I. Identification of a plasmid DNA probe for detection of strains of *Erwinia herbicola* pathogenic on *Gypsophila pa-niculata* // Phytopathology. 1991. V. 81. P. 54–57.
- Merbach W., Ruppel S., Schulze J. Dinitrogen fixation of microbe-plant associations as affected by nitrate and am-monium supply // Isotopes Environ. Health Stud. 1997. V. 33. P. 67–73.
- Palmer M., Steenkamp E.T., Coetzee M.P., Chan W.Y., van Zyl E., De Maayer P., Coutinho T.A., Blom J., Smits T.H., Duffy B., Venter S.N. Phylogenomic resolution of the bacte-rial genus *Pantoea* and its relationship with *Erwinia* and *Tatumella* // Antonie van Leeuwenhoek. 2017. V. 110. P. 1287–1309.
- Pileggi M., Pileggi S.A., Olchanheski L.R., Silva P.A., Mu-noz A.M., Koskinen W.C., Barber B., Sadowsky M.J. Isola-tion of mesotriene-degrading bacteria from aquatic envi-ronments in Brazil // Chemosphere. 2012. V. 86. P. 1127–1132.
- Quispel A. Hellriegel and Wilfarth's discovery of (symbiotic) nitrogen fixation hundred years ago // Nitrogen Fixation: Hundred Years after / Eds. Bothe H., de Bruijn F.J., New-ton W.E. Stuttgart–N.Y.: Gustav Fischer Verlag, 1988. P. 3–12.
- Smits T.H.M., Rezzonico F., Kamber T., Blom J., Goesmann A., Ishimaru C.A., Frey J.E., Stockwell V.O., Duffy B. Metabolic versatility and antibacterial metabolite biosynthesis are dis-tinguishing genomic features of the fire blight antagonist *Pantoea vagans* C9-1 // PLoS One. 2011. V. 6. Art. e22247.
- Suleimanova A.D., Beinbauer A., Valeeva L.R., Chas-tukhina I.B., Balaban N.P., Shakirov E.V., Greiner R., Sharipova M.R. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1 // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 6790–6799.

Stackebrandt E., Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards // Microbiol. Today. 2006. V. 33. P. 152–155.

Subba R. Soil Microorganisms and Plant Growth. Oxford and IBH Publishing Co., India, 1977. 287 p.

Tambong J.T., Xu R., Kaneza C.A., Nshogozabahizi J.C. An in-depth analysis of a multilocus phylogeny identifies *leuS* as a reliable phylogenetic marker for the genus *Pantoea* // Evol. Bioinform. 2014. V. 10. P. 115–125.

Tambong J.T. Taxogenomics and systematics of the genus *Pantoea* // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 24–63.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. P. 4673–4680.

Walterson A.M., Stavriniades J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae* // FEMS Microbiol. Rev. 2015. V. 39. P. 968–984.

Identification of *Pantoea* Phytate-Hydrolyzing Rhizobacteria Based on Their Phenotypic Features and Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

A. D. Suleimanova¹,*, D. L. Itkina¹, D. S. Pudova¹, and M. R. Sharipova¹

¹Kazan (Volga region) federal university, Kazan, 420008 Russia

*e-mail: aliya.kzn@gmail.com

Received May 3, 2020; revised August 21, 2020; accepted August 28, 2020

Abstract—Accurate strain identification within the *Pantoea* genus is difficult due to homologous recombination, which may affect the species boundaries. An integrated approach is presently the most effective one in determining the species of bacteria. Biochemical identification using the API20E system, phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequences, and MLSA analysis based on partial sequences of the *fusA*, *pyrG*, *leuS*, *gyrB*, and *rpoB* genes showed that the soil phytate-hydrolyzing isolates belonged to the genus *Pantoea*, specifically to the species *Pantoea brenneri*. It was also established that phytate-hydrolyzing activity of the strains was accompanied by their ability to fix atmospheric nitrogen.

Keywords: *Pantoea*, identification, MLSA, API20E, nitrogen fixation