

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Π.Μ.Σ. «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ»  
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ  
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΩΝ  
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑ  
ΤΟΥ *TRITICUM AESTIVUM***

**ΓΕΩΡΓΙΑ Α. ΛΙΑΡΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ  
ΚΑΤΙΝΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2011**



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Π.Μ.Σ. «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ»  
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ  
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ»

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΩΝ**  
**ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑ**  
**ΤΟΥ *TRITICUM AESTIVUM***

**ΓΕΩΡΓΙΑ Α. ΛΙΑΡΑ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ  
**ΚΑΤΙΝΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ**  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2011

Η ανάθεση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας με θέμα: «Μοριακός χαρακτηρισμός αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του *Triticum aestivum*», έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύθεσης (16<sup>η</sup> συνεδρία/02.06.2009) του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, κατά την οποία ορίστηκε η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή.

### **Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή**

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Λέκτορας (Μέλος)

Ταμπακάκη Αναστασία, Λέκτορας (Μέλος)

*Στον αδερφό μου Μιχάλη*

*«Έργο της επιστήμης είναι να βάλει γεγονότα  
στη θέση των φαινομένων και αποδείξει στη  
θέση των εντυπώσεων»*

*Τζον Φάσκιν*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

*Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών», του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.*

*Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους εκείνους, που με την παρουσία, την υποστήριξη και την ανεκτικότητα τους, συνέβαλλαν στην υλοποίηση αυτής της διπλωματικής εργασίας.*

*Αρχικά οφείλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Κατινάκη Παναγιώτη, επιβλέποντα της μεταπτυχιακής διατριβής, τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, όσο και για την επιστημονική καθοδήγηση, ουσιαστική επίβλεψη, εποικοδομητική κριτική και την αμέριστη υποστήριξη που μου παρείχε. Θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για τη γενναιοδωρία, με την οποία μεταλαμπάδευσε την αγάπη του για την έρευνα.*

*Ιδιαίτερη μνεία αξίζουν τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κ. Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Λέκτορας και κα. Τάμπακάκη Αναστασία, Λέκτορας, των οποίων οι εύστοχες παρατηρήσεις, υποδείξεις και συμβουλές, υπήρξαν πολύτιμες τόσο για τη λογική ροή όσο και τη βέλτιστη δομή της παρούσας διατριβής.*

*Ως πράξη αναγνώρισης της συνεισφοράς της στην περάτωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής, εκφράζω ευγνωμοσύνη στη διδάκτορα κ. Βενιεράκη Αναστασία, για τη συνεχή υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές*

της. Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τη διδάκτορα του εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Κεφαλογιάννη Ηώ, για τις επιπρόσθετες χρήσιμες πληροφορίες που μου παρείχε καθώς και τη διδάκτορα κ. Δήμου Μαρία για το ευδιαφέρον που έδειξε κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων μου.

Στους συναδέλφους και συμφοιτητές μου, χρωστώ ένα μεγάλο ευχαριστώ για τις πολύωρες συζητήσεις και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ απ' όλα, το οφείλω στους γονείς μου, Αρχοντή και Μαρία, οι οποίοι μου παρέχουν ανιδιοτελή, συνεχή, ανεξάντλητη και αλόγιστη υποστήριξη, συμπαράσταση και αγάπη, όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς αυτούς στο πλάι μου δε θα είχα καταφέρει τίποτα.

Σας ευχαριστώ θερμά.

Λιάρα Α. Γεωργία

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>i</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vii</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ</b>	<b>viii</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ</b>	<b>x</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ</b>	<b>xv</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Γενικά</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Δέσμευση του αζώτου</b>	<b>3</b>
1.2.1 Σημασία βιολογικής δέσμευσης του αζώτου	8
1.2.2 Μηχανισμός βιολογικής δέσμευσης του αζώτου	9
1.2.3 Ενεργειακό κόστος	15
1.2.4 Παρέμβαση του ανθρώπου	18
1.2.5 Ποικιλότητα συστημάτων βιολογικής δέσμευσης αζώτου	21
1.2.5.1 Συμβιωτικοί οργανισμοί	22
<b>1.3 Μη συμβιωτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια</b>	<b>27</b>
1.3.1 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης	29
1.3.1.1 <i>Azospirillum</i>	30
1.3.1.2 <i>Pseudomonas</i>	36
1.3.1.3 <i>Paenibacillus</i> και <i>Bacillus</i>	45
1.3.1.4 <i>Azotobacter</i>	52
1.3.1.5 <i>Xanthobacter</i>	58
1.3.1.6 <i>Beijerinckia</i>	59
1.3.1.7 <i>Derxia</i>	60
1.3.1.8 <i>Clostridium</i>	60
1.3.1.9 Φωτοσυνθετικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια	63
I. Πορφυρά μη θειικά βακτήρια	64
II. Πορφυρά θειοβακτήρια ( <i>Chromatiaceae</i> και <i>Ectothiorhodospiraceae</i> )	66
III. Πράσινα θειοβακτήρια (οικογένεια <i>Chlorobiaceae</i> , φύλο <i>Chlorobi</i> )	67
IV. Πράσινα μη θειικά βακτήρια	68
V. <i>Heliobacteriaceae</i> (ηλιοβακτήρια)	68
1.3.1.10 <i>Archaea</i> (Αρχαιοβακτήρια)	69

1.3.1.11	Θειοαναγωγικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια	72
1.3.1.12	Μεθανοτροφικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια	72
1.3.1.13	<i>Vibrio</i>	73
1.3.1.14	<i>Magnetospirillum</i> και <i>Geobacter</i>	74
1.3.1.15	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ( <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> )	75
1.3.1.16	Άλλοι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί	76
1.3.2	Ενδοφυτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια	77
1.3.2.1	<i>Gluconacetobacter</i>	78
1.3.2.2	Άλλα αζωτοδεσμευτικά μέλη της οικογένειας <i>Acetobacteraceae</i>	82
1.3.2.3	<i>Azoarcus</i>	84
1.3.2.4	<i>Herbaspirillum</i>	89
1.3.2.5	<i>Klebsiella</i>	91
1.3.2.6	Άλλα αζωτοδεσμευτικά μέλη της οικογένειας <i>Enterobacteriaceae</i>	92
1.3.2.7	<i>Burkholderia</i>	95
1.3.2.8	<i>Aquaspirillum</i>	97
1.3.2.9	<i>Alcaligenes</i>	98
1.4	Σκοπός μελέτης	99
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	100
2.1	Βακτηριακά στελέχη	100
2.2	Εκτίμηση αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας - Βιοχημική δοκιμή	102
2.3	Μοριακές τεχνικές ταξινόμησης βακτηριακών στελεχών	103
2.3.1	Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από Gram <sup>-</sup> βακτήρια	103
2.3.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	104
2.3.2.1	Αρχή της μεθόδου	104
2.3.2.2	Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR)	106
2.3.3	Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης	107
2.3.4	Ανάκτηση κλάσματος δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων από πηκτή αγαρόζης	109
2.3.5	Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων	110
2.3.6	Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα	110
2.3.6.1	Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα	110
2.3.6.2	Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation)	111
2.3.7	Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	112
2.3.7.1	Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i>	112
2.3.7.2	Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> ικανών για μετασηματισμό (Competent cells)	112
2.3.7.3	Μετασηματισμός ικανών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμίδιο	113
2.3.8	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασηματισμένα κύτταρα <i>E.coli</i>	114



2.3.9 Πέψη δεοξυριβονουκλεοτιδικών οξέων (DNA) με χρήση ενζύμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού -----	116
2.3.10 Αλληλούχηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequencing) -----	117
2.3.11 Σύγκριση ακολουθιών, φυλογενετική ανάλυση -----	117
<b>2.4 Ανθεκτικότητα βακτηριακών στελεχών παρουσία άλατος και αντιβιοτικού-118</b>	
2.4.1 Ανθεκτικότητα σε αλατότητα -----	118
2.4.2 Ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Rifabacin (Rif)-----	118
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ----- 120</b>	
<b>3.1 Μοριακή ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA----- 120</b>	
3.1.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA -----	122
3.1.2 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων -----	124
3.1.3 Φυλογενετικό δέντρο των ακολουθιών 16S rRNA -----	127
<b>3.2 Μοριακή ανάλυση του γονιδίου <i>nifH</i>----- 131</b>	
3.2.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου <i>nifH</i> -----	133
3.2.2 Ανάλυση 8 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>nifH</i> , των βακτηριακών στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως <i>Azospirillum</i> , βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA--	134
3.2.2.1 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων, των αναγνωρισμένων ως <i>Azospirillum</i> , βακτηριακών στελεχών-----	134
3.2.3 Ανάλυση 3 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>nifH</i> , των βακτηριακών στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως <i>Pseudomonas</i> , βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA	137
3.2.3.1 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων, των αναγνωρισμένων ως <i>Pseudomonas</i> , βακτηριακών στελεχών -----	137
3.2.4 Φυλογενετικό δέντρο των ακολουθιών <i>nifH</i> -----	138
<b>3.3 Μοριακή ανάλυση του γονιδίου <i>ipdC</i>----- 142</b>	
3.3.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου <i>ipdC</i> -----	143
3.3.2 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων -----	145
3.3.3 Φυλογενετικό δέντρο των ακολουθιών <i>ipdC</i> -----	147
<b>3.4 Μοριακή ανάλυση γονιδίου <i>dnaK</i>----- 149</b>	
3.4.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου <i>dnaK</i> -----	151
3.4.2 Ανάλυση 8 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>dnaK</i> , των βακτηριακών στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως <i>Azospirillum</i> , βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA--	152
3.4.2.1 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων, των αναγνωρισμένων ως <i>Azospirillum</i> , βακτηριακών στελεχών-----	152
3.4.3 Ανάλυση 3 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>dnaK</i> , των βακτηριακών στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως <i>Pseudomonas</i> , βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA -----	155
3.4.3.1 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων, των αναγνωρισμένων ως <i>Pseudomonas</i> , βακτηριακών στελεχών -----	155
3.4.4 Φυλογενετικό δέντρο των ακολουθιών <i>dnaK</i> -----	157

<b>3.5 Ανθεκτικότητα βακτηριακών στελεχών παρουσία άλατος και αντιβιοτικού</b>	<b>161</b>
3.5.1 Ανθεκτικότητα σε αλατότητα -----	161
3.5.2 Ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη (Rifampicin)-----	163
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> -----	<b>164</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ</b> -----	<b>170</b>
Παράρτημα Α' -----	170
Σύνθεση Θρεπτικών Μέσων -----	170
Παράρτημα Β' -----	173
Σύνθεση Διαλυμάτων-----	173
Παράρτημα Γ' -----	175
Μητρικά Διαλύματα Αντιβιοτικών -----	175
Παράρτημα Δ' -----	176
Ευθυγραμμίσεις Νουκλεοτιδικών Αλληλουχιών-----	176
Παράρτημα Ε' -----	187
Εκτίμηση Εξελικτικών Αποστάσεων Νουκλεοτιδικών Ακολουθιών -----	187
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> -----	<b>190</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σιτάρι θεωρείται παγκοσμίως ως το σημαντικότερο και το πιο διαδεδομένο από τα αγρωστώδη φυτά, τα οποία τόσο από οικονομικής όσο και βιολογικής άποψης αποτελούν τη σπουδαιότερη ομάδα του φυτικού βασιλείου.

Το μεγαλύτερο ποσοστό (>90 %) του εδαφικού αζώτου, το οποίο είναι απαραίτητο για πολλά αγρωστώδη, βρίσκεται στη μη αφομοιώσιμη, από τους περισσότερους ανώτερους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, μορφή. Η τροφοδότηση της ριζόσφαιρας των σιτηρών με άζωτο στη φύση, επιτελείται από τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης.

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε ο μοριακός χαρακτηρισμός έντεκα στελεχών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα φυτών μαλακού σιταριού *Triticum aestivum*, προερχόμενα από γεωγραφικά διαμερίσματα που αποτελούν τους κύριους σιτοβολώνες της Ελλάδας. Για το μοριακό χαρακτηρισμό των εν λόγω στελεχών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του συντηρημένου γονιδίου 16S rRNA, μια προσέγγιση πλέον αποδεκτή και διαδεδομένη για την κατάταξη των προκαρυωτικών οργανισμών, και έπειτα του γονιδίου *dnaK*, που κωδικοποιεί για μόρια τσαπερόνης τα οποία επιτελούν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Εν συνεχεία, αναλύθηκε το δομικό γονίδιο *nifH*, που κωδικοποιεί για τη Fe-πρωτεΐνη της νιτρογενάσης (αναγωγή της νιτρογενάσης) και είναι υπεύθυνο για την ιδιότητα της αζωτοδέσμευσης των PGPRs βακτηρίων, προκειμένου να εκτιμηθεί η αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα του εκάστοτε στελέχους. Τέλος, σε ορισμένα βακτηριακά στελέχη, μελετήθηκε το γονίδιο *ipdC* που κωδικοποιεί για την ινδολο-3 πυρουβική αποκαρβοξυλάση, η οποία συμμετέχει στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της αυξίνης ινδολοξικό οξύ, το οποίο συνεισφέρει στην προώθηση ανάπτυξης του ριζικού συστήματος των φυτών. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι, από τα έντεκα αζωτοδεσμευτικά στελέχη, δύο ανήκουν στο γένος *Azospirillum zeae*, έξι στο *Azospirillum brasilense* και τρία στο είδος *Pseudomonas stutzeri*.

**Λέξεις κλειδιά:** Ριζόσφαιρα, *Azospirillum zeae*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas stutzeri*, 16S rRNA, *dnaK*, αναγωγή της νιτρογενάσης, μοριακός φυλογενετικός χαρακτηρισμός



## ABSTRACT

The wheat is universally considered as the most important and most widespread species of the graminaceae family, which are, from both economic and biological terms, the most important group of plant kingdom.

The vast majority (> 90%) of soil nitrogen, which is necessary for many graminaceae, is in a form that is non-adoptable by most of the higher plants and animals. The nitrogen supply of the rhizosphere of grain in nature, is carried out by free living, nitrogen-fixing bacteria.

Subject of this post-graduate research thesis was the molecular identification of eleven nitrogen-fixing bacteria, isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*, deriving from regions that constitute the main grain growing regions of Greece. The analysis of the conserved 16S rRNA gene, an approach widely accepted in our days as an indispensable tool for the phylogenetic classification of prokaryotes, and the analyses of *dnaK*, a gene encoding for chaperons responsible for numerous cellular functions of great importance, were used for the molecular identification of the strains. The structural *nifH* gene, which encodes the Fe-protein of nitrogenase (nitrogenase reductase) and is responsible for the nitrogen-fixing ability of PGPRs bacteria, was also analysed in order to estimate the nitrogen fixing capability of each strain. Finally, in some strains, the *IpdC* gene, encoding indolo-3-pyruvate, which is involved in the metabolic pathway of indole acetic acid (IAA) biosynthesis and promotes the development of the root system in plants, was studied. The phylogenetic analysis carried out showed that of the eleven nitrogen-fixing strains studied, two belong to the genus *Azospirillum zeae*, six to *Azospirillum brasilense* and three to *Pseudomonas stutzeri* species.

**Key words:** Rhizosphere, *Azospirillum zeae*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas stutzeri*, 16S rRNA, *dnaK*, nitrogenase reductase, molecular phylogenetic identification

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.1.</b> Ποικιλότητα ορισμένων βακτηρίων ως προς το περιβάλλον αζωτοδέσμευσης και τις πηγές ενέργειας.....	<b>17</b>
<b>Πίνακας 1.2.</b> Είδη που επάγουν τον σχηματισμό φυματίων.....	<b>23</b>
<b>Πίνακας 1.3.</b> Είδη του γένους <i>Azospirillum</i> .....	<b>30</b>
<b>Πίνακας 1.4.</b> Διαφοροποιητικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Azospirillum</i> σε σχέση με γένη άλλων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων.....	<b>35</b>
<b>Πίνακας 1.5.</b> Ταξινόμηση των ψευδομονάδων σε πέντε ομάδες με βάση την ομολογία του ριβοσωμικού RNA (Palleroni <i>et al.</i> , 1973) .....	<b>37</b>
<b>Πίνακας 1.6.</b> Σύγχρονη ταξινόμηση των ψευδομονάδων. Γένη και είδη.....	<b>38</b>
<b>Πίνακας 1.7.</b> Ταξινόμηση της οικογένειας Bacillaceae με βάση την ομολογία του ριβοσωμικού RNA (Xu <i>et al.</i> , 2003) .....	<b>46</b>
<b>Πίνακας 1.8.</b> Η παλιά και η νέα ταξινόμηση των 17 στελεχών πορφυρών μη θεικών βακτηρίων που αναφέρονται ως αζωτοδεσμευτικά φωτοσυνθετικά στελέχη στη δημοσίευση των Madigan και συνεργατών. Το <i>Rubrivivax gelatinosus</i> δεν έχει ταξινομηθεί ακόμα σε κάποια οικογένεια. (Madigan <i>et al.</i> , 1984, Euzéby, 1997: List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Last full update on January 12, 2011 by <a href="http://www.bacterio.net">http://www.bacterio.net</a> ) .....	<b>65</b>
<b>Πίνακας 1.9.</b> Πηγές απομόνωσης και είδη καλλιέργειας ορισμένων αζωτοδεσμευτικών μελλών της οικογένειας Acetobacteraceae (Saravanan <i>et al.</i> , 2008) .....	<b>82</b>
<b>Πίνακας 2.1.</b> 11 υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη. Είδος φυτού, ποικιλία ξενιστή, περιοχή απομόνωσης και τμήμα επέμβασης.....	<b>100</b>
<b>Πίνακας 3.1.</b> Αποτελέσματα σύγκρισης των 11 υποκλώνων 16S rRNA, με τη βάση δεδομένων BLAST του NCBI.....	<b>124</b>
<b>Πίνακας 3.2.</b> Συχνότητα νουκλεοτιδίων, αθροισμάτων A+T(U) και G+C καθώς και ο μέσος όρος αυτών, στην κάθε αλληλουχία των 11 υποκλώνων 16S rRNA. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Lasergene 7.0. ....	<b>127</b>
<b>Πίνακας 3.3.</b> Αποτελέσματα σύγκρισης των 8 υποκλώνων <i>nifH</i> , αναγνωρισμένων ως <i>Azospirillum</i> (βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA), με τη βάση δεδομένων του NCBI, μέσω του προγράμματος BLAST.....	<b>134</b>
<b>Πίνακας 3.4.</b> Συχνότητα νουκλεοτιδίων, αθροισμάτων A+T(U) και G+C καθώς και ο μέσος όρος αυτών, στην κάθε αλληλουχία των 8 υποκλώνων <i>nifH</i> , οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως <i>Azospirillum</i> (βάσει μοριακής ανάλυσης 16S rRNA). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Lasergene 7.0.....	<b>136</b>

- Πίνακας 3.5.** Αποτελέσματα σύγκρισης των 3 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *nifH*, των αναγνωρισμένων ως *Pseudomonas* στελεχών (βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA), με τη βάση δεδομένων του NCBI, μέσω του προγράμματος BLAST.....**137**
- Πίνακας 3.6.** Συχνότητα νουκλεοτιδίων, αθροισμάτων A+T(U) και G+C καθώς και ο μέσος όρος αυτών, στην κάθε αλληλουχία των 3 υποκλώνων *nifH*, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas* (βάσει μοριακής ανάλυσης 16S rRNA). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Lasergene 7.0.....**138**
- Πίνακας 3.7.** Αποτελέσματα σύγκρισης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *ipdC*, των αναγνωρισμένων ως *Azospirillum* στελεχών (βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA), με τη βάση δεδομένων του NCBI, μέσω του προγράμματος BLAST.....**145**
- Πίνακας 3.8.** Συχνότητα νουκλεοτιδίων, αθροισμάτων A+T(U) και G+C καθώς και ο μέσος όρος αυτών, στην κάθε αλληλουχία των υποκλώνων *ipdC*, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum* (βάσει μοριακής ανάλυσης 16S rRNA). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Lasergene 7.0.....**146**
- Πίνακας 3.9.** Αποτελέσματα σύγκρισης των 8 υποκλώνων *dnaK*, αναγνωρισμένων ως *Azospirillum* (βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA), με τη βάση δεδομένων του NCBI, μέσω του προγράμματος BLAST.....**152**
- Πίνακας 3.10.** Συχνότητα νουκλεοτιδίων, αθροισμάτων A+T(U) και G+C καθώς και ο μέσος όρος αυτών, στην κάθε αλληλουχία των 8 υποκλώνων *dnaK*, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum* (βάσει μοριακής ανάλυσης 16S rRNA). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Lasergene 7.0.....**154**
- Πίνακας 3.11.** Αποτελέσματα σύγκρισης των 3 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *dnaK*, των αναγνωρισμένων ως *Pseudomonas* στελεχών (βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA), με τη βάση δεδομένων του NCBI, μέσω του προγράμματος BLAST.....**155**
- Πίνακας 3.12.** Συχνότητα νουκλεοτιδίων, αθροισμάτων G+C και A+T(U) καθώς και ο μέσος όρος αυτών, στην κάθε αλληλουχία των 3 υποκλώνων *dnaK*, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas*, βάσει μοριακής ανάλυσης 16S rRNA. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Lasergene 7.0.....**157**
- Πίνακας 4.1.** Κατάταξη των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών μετά από ταυτοποίηση βάσει του 16S rRNA γονιδίου. (Στήλη 1. Αποτέλεσμα Blast με το διαδικτυακό πρόγραμμα NCBI, Στήλη 2. Αποτέλεσμα Blast με το διαδικτυακό πρόγραμμα EzTaxon, για τον προσδιορισμό του πλησιέστερου τυπικού στελέχους (Chun *et al.*, 2007) .....**167**

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1.1.** Φυμάτια αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων στις ρίζες των ψυχανθών.....5
- Σχήμα 1.2.** Κύκλος του αζώτου, (a) Κλασικός Κύκλος αζώτου, (b) Διαδικασία μετατροπής αμμωνίου σε νιτρώδη, (c) Αερόβια απονιτροποίηση μέσω βακτηρίων-Nitrosomonas (d) Απονιτροποίηση μέσω βακτηρίων-Nitrosomonas, (e) Αναερόβια οξειδωση αμμωνίου, (f) Γενικός δίκτυο του αζώτου (Ahn, 2006).....7
- Σχήμα 1.3.** Σχηματική απεικόνιση του πρωτεϊνικού συμπλόκου της νιτρογενάσης (Fe protein, FeMo protein).....9
- Σχήμα 1.4.** Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της νιτρογενάσης κατά την πραγματοποίηση της βιολογικής αζωτοδέσμευσης. Στο σχήμα φαίνεται η ροή ηλεκτρονίων από μόρια μεταφορείς όπως η φερρεδοξίνη (Fd) και η φλαβοδοξίνη (Fld) στην Fe υπομονάδα (αριστερά), η μεταφορά ηλεκτρονίων από την Fe υπομονάδα στην FeMo υπομονάδα σε συνδυασμό με την υδρόλυση του ATP (κέντρο) και η επακόλουθη αναγωγή των εκάστοτε υποστρωμάτων με την επιστροφή της FeMo υπομονάδας στην αρχική της μορφή.....11
- Σχήμα 1.5. Φυλογενετικό δέντρο *nifH***  
 Στους οργανισμούς που είναι διαθέσιμο το γονιδίωμα, το νούμερο μετά το όνομα του είδους αναφέρεται στη σχετική θέση του ανοικτού αναγνωστικού πλαισίου της πρωτεΐνης εντός του γονιδιώματος. (δεν περιλαμβάνονται τα *R. capsulatus* και *R. palustris*). Τα νούμερα στους κόμβους του δενδρογράμματος δείχνουν την τιμή bootstrap support σε 100 αντίγραφα της μεθόδου μέγιστης πιθανοφάνειας (πρώτο νούμερο) ή βασισμένη σε 500 αντίγραφα της μεθόδου απόστασης. Η παύλα (-) σε έναν κόμβο υποδεικνύει χαμηλή τιμή bootstrap support (<60%) για το συγκεκριμένο πρότυπο διακλάδωσης είτε για το δέντρο μέγιστης πιθανοφάνειας (Μ.Π.) είτε για το δέντρο από τη μέθοδο της γενετικής απόστασης (αν και παρατηρείται ίδια τοπολογία). Μονό νούμερο ή κανένα νούμερο δείχνει την ασυμφωνία στην τοπολογία του κόμβου μεταξύ δέντρου Μ.Π. και δέντρου από τη μέθοδο της γενετικής απόστασης. Το μονό νούμερο δείχνει την τιμή bootstrap support από δέντρο της μεθόδου απόστασης αν είναι ίση ή μεγαλύτερη από 60%. Η κλίμακα στην εικόνα αντιστοιχεί στον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση για τους κλάδους στο δέντρο της μεθόδου απόστασης (προσαρμοσμένο από Raymond *et al.*, 2004) .....14
- Σχήμα 1.6.** Ο μηχανισμός της νιτρογενάσης:  $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16MgATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16MgADP + 16Pi$ .....15
- Σχήμα 1.7.** Στέλεχος *Anabaena* ελεύθερης διαβίωσης σε θρεπτικό μέσο, απουσία αζώτου, όπου οι ετεροκύστες φαίνονται καθαρά μεταξύ των κανονικών κυττάρων (Franche *et al.*, 2008) ..... 25
- Σχήμα 1.8.** Φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Μορφολογία ριζικού τριχιδίου τομάτας 48h μετά από εμβολιασμό με *A. brasilense* **A**. Μάρτυρας χωρίς εμβολιασμό **B**. Εμβολιασμός με 108cfu/ml (Dobbelaere & Okon, 2007) .....34
- Σχήμα 1.9.** Μορφολογία αποικίας *Pseudomonas stutzeri* (Lalucat *et al.*, 2006) .....41
- Σχήμα 1.10.** Οργάνωση των γονιδίων *nif* και σχετικών γονιδίων του *P. stutzeri* A1501. Τα οριζόντια βέλη υποδεικνύουν τη διεύθυνση της μεταγραφής. Τα σκιασμένα ορθογώνια



- υποδεικνύουν γονίδια τα οποία δε σχετίζονται με την αζωτοδέσμευση. Τα νούμερα αντιστοιχούν σε μη ταυτοποιημένα αναγνωστικά πλαίσια (Pedrosa & Elmerich, 2007).....**43**
- Σχήμα 1.11.** Φυλογενετική ανάλυση 46 ειδών της οικογένειας Bacillaceae, κατηγοριοποιημένα σε δέκα φυλογενετικές ομάδες του γένους (*Xu et al.*, 2003) .....**48**
- Σχήμα 1.12.** Βλαστικά κύτταρα του στελέχους *Azotobacter vinelandii*.....**53**
- Σχήμα 1.13.** Συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών του γονιδίου 16S rRNA ορισμένων ειδών των *Azomonas* (*Azm.*), *Azospirillum* (*Azs.*), *Azotobacter* (*Azt.*), και *Pseudomonas* μέσω του αλγορίθμου Neighbor. Η μπάρα αντιστοιχεί σε υποκαταστάσεις ανά θέση. Αλληλουχίες σημειωμένες με αστερίσκο (\*) προέρχονται από τα τυπικά στελέχη. Οι αλληλουχίες AY324110\*, EF100150\*, EF100149 και EP100150\* αναφέρονται στα *Azospirillum brasilense* (ATCC 29145T) *Azospirillum lipoferum* (8672 και ATCC 29707T), αντίστοιχα (*Young & Park*, 2007) .....**56**
- Σχήμα 1.14.** Σύγκριση διάταξης γονιδίων *nif* των *Mesorhizobium loti* (NC 002678), *Clostridium acetobutylicum* (NC 003030), *Nostoc* sp. Strain 7120 (NC 003272) και *Chlorobium tepidum* TLS (NC 002932) (*Zehr et al.*, 2003) .....**62**
- Σχήμα 1.15.** Οργάνωση οπερονίου *nif* του *Methanococcus maripaludis* (*Leigh*, 2000) .....**71**
- Σχήμα 1.16.** α. Όξινα στραγγιζόμενα νερά προερχόμενα από πυριτικά μεταλλεύματα εγκαταλειμμένου ορυχείου προ-ρωμαϊκής εποχής (Rio Tinto, Ισπανία), β. Εμπορική εφαρμογή βιοεκχύλισης σε σωρό για ανάκτηση χαλκού (*Veldés et al.*, 2008).....**76**
- Σχήμα 1.17.** Πιθανές θέσεις προσβολής και αποίκησης σε ρίζα νεαρού ρυζιού (οριζόντια τομή) και σε ρίζα ώριμου ρυζιού (κάθετη τομή). Οι θέσεις αποίκησης είναι το χρώμα της ριζόσφαιρας (περιβάλλει τις ρίζες και επηρεάζεται από τις εκκρίσεις τους) ή για επιφυτικούς μικροοργανισμούς, το ριζοπλάνο (περιλαμβάνονται η επιδερμίδα και η εξωδερμίδα) ή οι εσωτερικοί ιστοί. Η ενδοδερμίδα αποτελεί το φράγμα που περιβάλλει το κεντρικό αγγείο (πράσινα βέλη), το οποίο περιέχει ξυλώδη αγγεία για την παροχή θρεπτικών στοιχείων της ρίζας και μέχρι πρότινος θεωρείτο ότι αποικίζεται από μικροοργανισμούς μη παθογόνους. Οι θέσεις αποίκησης των αζωτοδεσμευτικών ενδοφυτικών οργανισμών υποδεικνύονται από κόκκινα δισκία και τα μονοπάτια εισόδου από κόκκινα βέλη. Τα μπλε βέλη δείχνουν τα εξωτερικά στρώματα κυττάρων και τον φλοιό (*Reinhold-Hurek & Hurek*, 1998).....**86**
- Σχήμα 2.1.** Χάρτης πλασμιδιακού φορέα PGEM-T easy (Promega) .....**111**
- Σχήμα 3.1.** Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA, μεγέθους 1450 bp, στο ολικό γονιδιωματικό DNA των υπό μελέτη δειγμάτων, μέσω της αντίδρασης PCR (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III) .....**123**
- Σχήμα 3.2.** Πέψεις με το ένζυμο EcoRI των πλασμιδίων, από τους PGEM-T κλώνους 16S rRNA των υπό μελέτη δειγμάτων (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III) .....**123**
- Σχήμα 3.3.** Εξελεγκτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς, βάσει τμήματος του γονιδίου 16S rRNA. Η απεικόνιση της εξελεγκτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (*Saitou & Nei*, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να

απεικονιστεί η εξελεγκτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa (32 taxa). Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μια ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν στο σύνολο των δεδομένων (επιλογή πλήρους επάλειψης). Σύνολο 1282 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2004) .....128

**Σχήμα 3.4.** Προτεινόμενα σενάρια και η αντίστοιχη απεικόνιση δενδρογράμματος γονιδίου και είδους. **A.** 1<sup>ο</sup> Σενάριο του τελευταίου κοινού προγόνου. Οι τρεις επικράτειες και η απόκλιση τους από τον τελευταίο κοινό πρόγονο (LCA), παρουσιάζονται με γράμματα και διακεκομμένες γραμμές μπλε χρώματος. Οι ενιαίες, μαύρες (τυπική νιτρογενάση) και πράσινες (εναλλακτική νιτρογενάση) γραμμές υποδεικνύουν την εξέλιξη της νιτρογενάσης από πρόγονο της ομάδας IV στη βάση του δέντρου (Οι Raymond και συνεργάτες το 2004 διαχώρισαν τους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς σε πέντε ομάδες, βάσει φυλογένειας του γονιδίου 16S rRNA). Επιπλέον, η γκρι διακεκομμένη γραμμή και η κόκκινη τελεία απεικονίζουν την οριζόντια μεταφορά και τα σημεία διπλασιασμού του γονιδίου αντίστοιχα. Σύμφωνα με το σενάριο του τελευταίου κοινού προγόνου, η απώλεια γονιδίων ήταν το κυρίαρχο γεγονός στις συγγενικές σειρές, οι οποίες δεν έχουν πλέον την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν. **B.** 2<sup>ο</sup> Σενάριο αρχικής εμφάνισης στα μεθανογόνα βακτήρια. Βάσει του συγκεκριμένου σεναρίου η αζωτοδέσμευση εμφανίστηκε ως ιδιότητα πρώτα στα μεθανογόνα αρχαιοβακτήρια και έπειτα μεταφέρθηκε σε ένα πρωτόγονο βακτήριο, παρακάμπτοντας την αναγκαιότητα για εκτεταμένες απώλειες γονιδίων προκειμένου να εξηγηθεί η απουσία αζωτοδεσμευτικών συγγενικών σειρών. Στην προαναφερθείσα περίπτωση, μάλλον έχει συμβεί εκτεταμένη και σχετικά πρόσφατη οριζόντια μεταφορά γονιδίων ώστε να εξηγηθούν η κατανομή και η ομοιότητα των νιτρογενασών των ομάδων II και III (Raymond *et al.*, 2004) .....132

**Σχήμα 3.5.** Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *nifH*, μεγέθους 360 bp, στο ολικό γονιδιωματικό DNA των υπό μελέτη δειγμάτων, μέσω της αντίδρασης PCR (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III).....133

**Σχήμα 3.6.** Πέψεις με το ένζυμο EcoRI των πλασμιδίων, από τους PGEM-T κλώνους *nifH* των υπό μελέτη δειγμάτων (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III). .....134

**Σχήμα 3.7.** Εξελεγκτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει τμήματος του γονιδίου *nifH*. Η απεικόνιση της εξελεγκτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονιστεί η εξελεγκτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa (31 taxa). Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μια ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν

- υπολογίστηκαν στο σύνολο των δεδομένων (επιλογή πλήρους επάλειψης). Σύνολο 270 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2004) .....139
- Σχήμα 3.8.** Μονοπάτια βιοσύνθεσης IAA στα βακτήρια. Το όνομα του μονοπατιού προκύπτει από τις ενδιάμεσες ενώσεις που είναι υπογραμμισμένες. IAAld: ινδολο-ακεταλδεΐδη, IAM: ινδολο-ακεταμίδι, *IpdC*: αποκαρβοξυλάση του ινδολοπυρουβικού, Trp: τρυπτοφάνη (Sraepren *et al.*, 2007) .....143
- Σχήμα 3.9.** Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ipdC*, μεγέθους 1278 bp, στο ολικό γονιδιωματικό DNA των υπό μελέτη δειγμάτων, μέσω της αντίδρασης PCR (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III).....144
- Σχήμα 3.10.** Πέψεις με το ένζυμο *EcoRI* των πλασμιδίων, από τους PGEM-T κλώνους *ipdC* των υπό μελέτη δειγμάτων (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III) .....144
- Σχήμα 3.11.** Εξελεγκτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει τμήματος του γονιδίου *ipdC*. Η απεικόνιση της εξελεγκτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονιστεί η εξελεγκτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa (10 taxa). Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μια ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν στο σύνολο των δεδομένων (επιλογή πλήρους επάλειψης). Σύνολο 1245 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2004) .....147
- Σχήμα 3.12.** Ευθυγράμμιση ομόλογων Hsp70 από ολοκληρωμένα βακτηριακά γονιδιώματα. Εντός του παραλληλογράμμου διακρίνεται η περιοχή η οποία είναι χαρακτηριστική των Gram αρνητικών βακτηρίων (Gurta, 2001) .....150
- Σχήμα 3.13.** Εξελεγκτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει τμήματος του γονιδίου *dnaK*. Η απεικόνιση της εξελεγκτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονιστεί η εξελεγκτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa (32 taxa). Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μια ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν στο σύνολο των δεδομένων (επιλογή πλήρους επάλειψης). Σύνολο 242 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2004) .....158

- Σχήμα 3.14.** Ανάπτυξη των στελεχών Gr22, Gr23, Gr24, Gr29, Gr30, Gr35, Gr37, Gr42, Gr44, Gr45 και Gr46 σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία  $MgSO_4$  και  $CaCl_2$  τελικής συγκέντρωσης 2,5 Mm (Μάρτυρας). Επώαση υπό ανάδευση τους 30°C για 24h. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (O.D.<sub>600nm</sub>) .....**161**
- Σχήμα 3.15.** Ανάπτυξη των στελεχών Gr22, Gr23, Gr24, Gr29, Gr30, Gr35, Gr37, Gr42, Gr44, Gr45 και Gr46 σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία  $MgSO_4$  και  $CaCl_2$  τελικής συγκέντρωσης 2,5 Mm, εμπλουτισμένο με 1% NaCl. Επώαση υπό ανάδευση τους 30°C για 24h. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (O.D.<sub>600nm</sub>).....**162**
- Σχήμα 3.16.** Ανάπτυξη των στελεχών Gr22, Gr23, Gr24, Gr29, Gr30, Gr35, Gr37, Gr42, Gr44, Gr45 και Gr46 σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία  $MgSO_4$  και  $CaCl_2$  τελικής συγκέντρωσης 2,5 Mm, εμπλουτισμένο με 5% NaCl. Επώαση υπό ανάδευση τους 30°C για 24h. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (O.D.<sub>600nm</sub>).....**162**
- Σχήμα 3.17.** Ανάπτυξη των στελεχών Gr22, Gr23, Gr24, Gr29, Gr30, Gr35, Gr37, Gr42, Gr44, Gr45 και Gr46 σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία  $MgSO_4$  και  $CaCl_2$  τελικής συγκέντρωσης 2,5 Mm, εμπλουτισμένο με 10% NaCl. Επώαση υπό ανάδευση τους 30°C για 24h. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (O.D.<sub>600nm</sub>).....**163**

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

- ACC, αμινοκυκλοπροπανο-καρβοξυλικό οξύ
- ADP, διφοσφορική αδενοσίνη
- Anf, εναλλακτική νιτρογενάση σιδήρου
- ATP, τριφοσφορική αδενοσίνη
- BLAST, Basic Local Aligment Tool
- ExPaSy, Expert Protein Analysis System
- Fd, φερεδοξίνη
- FeMo πρωτεΐνη, μολυβδαινο-φερρεδοξίνη ή δινιτρογενάση
- Fe-πρωτεΐνη, αζωφερρεδοξίνη ή αναγωγή της δινιτρογενάσης,
- Fld, φλαβοδοξίνη
- IpdC, αποκαρβοξυλάση του ινδολοπυρουβικού
- IPTG, ισοπροπυλοθειογαλακτοσίδιο
- IPyA, ινδολοπυρουβικό οξύ
- L.B., Lysogeny Broth
- MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis
- NAD, Δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου-αδενίνης
- NCBI, National Center for Biotechnology Information
- Nif, τυπική νιτρογενάση
- NifL, φλαβοπρωτεΐνη
- PCR, Polymerase Chain Reaction
- PGPB, Plant Growth Promoting Bacteria
- PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria
- RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA
- Vnf, εναλλακτική νιτρογενάση βαναδίου
- W.B., Wash Buffer
- X-GAL, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D galactopyranoside
- Μ.Π., μέγιστη πιθανοφάνεια



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γενικά

Το έδαφος είναι ένα δυναμικό, ζωντανό σύστημα που περιλαμβάνει ένα δίκτυο από ανόργανα και οργανικά συστατικά και περιέχει ένα πλήθος κενών χώρων και πόρων μέσα στους οποίους περιέχονται και κυκλοφορούν υγρά και αέρια. Επιπρόσθετα, τα εδάφη περιέχουν έμβιους πληθυσμούς που ξεκινούν από βακτήρια μέχρι μύκητες, γαιοσκώληκες και μικρά τρωκτικά.

Το έδαφος είναι ένα σημαντικό συστατικό της βιόσφαιρας με καθοριστικές λειτουργίες για τη διατήρηση των οικοσυστημάτων. Αναμφισβήτητα συντελεί στην ευημερία του ανθρώπου (Jones & Hinsinger, 2008). Παράγει τροφές για τον άνθρωπο και τα ζώα, ανανεώσιμες πρώτες ύλες και παράλληλα παρέχει θρεπτικά συστατικά, νερό, οξυγόνο και μηχανική στήριξη για την ανάπτυξη των φυτών. Είναι, επίσης, το μέσο όπου αναπτύσσονται και προστατεύονται μεγάλοι πληθυσμοί κατώτερων και ανώτερων οργανισμών οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αναγέννηση και διατήρηση της ποιότητας του εδάφους, συνεισφέροντας στους κύκλους των θρεπτικών στοιχείων, στις μετατροπές της οργανικής ουσίας και στη δημιουργία εδαφικής δομής. Αυτές οι πολύπλοκες, ποικίλες και υπέρθετες λειτουργικές ομάδες των οργανισμών του εδάφους δίνουν στο έδαφος σταθερότητα ή δυνατότητα να επανέρχεται μετά από προσωρινές μεταβολές (Prescott *et al.*, 1999).

Παράγοντες που επηρεάζουν την διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων είναι τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους, όπως η χημική σύσταση του μητρικού πετρώματος και ο ρυθμός αποσάθρωσής του, η λεπτή υφή του εδάφους, το pH, αλλά και οι επικρατούσες κλιματικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία

και ο αερισμός του εδάφους. Επιπλέον, ορισμένοι βιοτικοί παράγοντες όπως η δραστηριότητα της μικροχλωρίδας του εδάφους και η εγκατάσταση συμβιωτικών σχέσεων επηρεάζουν σημαντικά το είδος των θρεπτικών στοιχείων και τις ποσότητες οι οποίες είναι διαθέσιμες στα φυτά (Taiz & Zeiger, 1998), συμβάλλοντας έτσι στην διατήρηση της γονιμότητας των εδαφών.

Η μικροβιακή βιομάζα στο έδαφος αποτελεί περίπου το 2-3% του συνολικού οργανικού άνθρακα. Τους μεγαλύτερους πληθυσμούς των μικροοργανισμών τους συναντάμε στα πρώτα 30-40 εκατοστά (Ekelund *et al.*, 2001), ενώ στα 100-120 εκατοστά ουσιαστικά μηδενίζεται. Τα βακτήρια, είναι οι περισσότερο άφθονοι μικροοργανισμοί του εδάφους με πληθυσμό που κυμαίνεται από  $10^6$  έως  $10^8$  και σε κάποιες περιπτώσεις  $10^9$  κύτταρα ανά κυβικό εκατοστό εδάφους και βάρος 10 τόνους ανά εκτάριο κατά προσέγγιση, ενώ η μάζα τους αντιστοιχεί στο 5% της οργανικής ουσίας ξηρού βάρους του εδάφους. Ο Metting (1993), εκτίμησε ότι ένα γραμμάριο γόνιμου εδάφους περιέχει  $10^5$ – $10^8$  βακτήρια,  $10^6$ – $10^7$  ακτινομύκητες και  $10^5$ – $10^6$  μύκητες (και επί το ορθότερο, colony forming units – cfu). Η μικροβιακή δραστηριότητα στο έδαφος είναι συνάρτηση της διαθεσιμότητας του άνθρακα. Τα περισσότερα είναι μεσόφιλα με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους να κυμαίνεται από 25 έως 35 °C και όρια 15 και 45 °C. Λιγότερα είναι τα ψυχρόφιλα με άριστη τους  $\leq 20$  °C, ενώ πολλά ανήκουν στα θεرمόφιλα με άριστη θερμοκρασία που κυμαίνεται ανάμεσα στους 45 και 65 °C. *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Achromobacter*, *Bacillus* *Micrococcus* είναι μερικά από τα πιο κοινά γένη στο έδαφος. Αρκετά συχνά θα συναντήσουμε είδη του γένους *Corynebacterium* ενώ από το γένος *Bacillus*, τα πιο συχνά απαντώμενα είδη είναι τα *B. megaterium*, *B. cereus* και *B. subtilis*.

Σημαντικό ρόλο στη σχέση μικροβίων-φυτών παίζει η κοινή επιφάνεια ανάμεσα στο έδαφος και τις ρίζες ή εναλλακτικά ο χώρος που περιβάλλει τις ρίζες και επηρεάζεται από αυτές, ο οποίος καλείται ριζόσφαιρα. Ένας χώρος υψηλών μικροβιακών πληθυσμών, έντονης μικροβιολογικής δραστηριότητας και ταχύτατων αλλαγών. Στην ριζόσφαιρα η παροχή άνθρακα είναι σταθερή. Βροχόπτωση, ξηρασία, pH, άλατα, οργανική ουσία επηρεάζουν και επηρεάζονται με αποτέλεσμα τις έντονες διακυμάνσεις (Handelsman & Stabb, 1996). Ρίζες, ριζικά εκκρίματα, βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα, νηματώδης, ακάρεα και γαιοσκώληκες αλληλεπιδρούν σε ένα περιβάλλον που χαρακτηρίζεται σαν ριζόσφαιρα. Οι μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας ζουν πάνω σε νέκρα επιδερμικά κύτταρα, εκκρίματα των ριζών και



νεκρή οργανική ουσία. Το σύνολο των μικροοργανισμών, αναπτύσσονται μέσω παροχής θρεπτικών συστατικών από το ριζικό σύστημα των φυτών. Στην αντίπερα όχθη, οι αποικούντες μικροοργανισμοί επηρεάζουν την ανάπτυξη, τη θρέψη και την υγεία του φυτού και της ρίζας (Mantelin & Touraine, 2004). Η άποψη ότι η ριζόσφαιρα των φυτών ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών έχει γίνει ευρέως αποδεκτή (Elmerich, 2007, Franche *et al.*, 2008).

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτή η πολυπλοκότητα της σχέσης μικροοργανισμού-φυτού ξενιστή. Το πλήθος των μικροοργανισμών οι οποίοι έχουν επίδραση στην ανάπτυξη και την υγεία του φυτού, διακρίνεται σε παθογόνους και σε ωφέλιμους, ενώ οι υπόλοιποι φαίνεται να έχουν ουδέτερη επίδραση στα φυτά (Somers *et al.*, 2004). Οι φυτοπαθογόνοι συνιστούν την μειοψηφία τόσο σε αριθμό ειδών όσο και σε πληθυσμό έναντι του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού στο έδαφος. Υπάρχουν μερικές μόνο δεκάδες ειδών φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών έναντι 1.500.000 ειδών μικροοργανισμών, τουλάχιστον, συνολικά. Οι κακές συνθήκες στράγγισης και αερισμού, η έλλειψη οργανικής ουσίας και η αλόγιστη χρήση φυτοφαρμάκων είναι οι σημαντικότερες αιτίες που οδηγούν στο να προκληθούν μεγάλες συχνά ζημιές από φυτοπαθογόνα μικρόβια στο έδαφος.

Το πιο σημαντικό φαινόμενο, το οποίο επηρεάζει θετικά τη σχέση φυτών-μικροχλωρίδας, είναι η δέσμευση του αζώτου, φαινόμενο το οποίο αναλύεται παρακάτω.

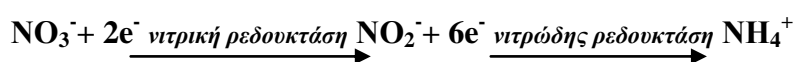
## 1.2 Δέσμευση του αζώτου

Το άζωτο αποτελεί ένα εκ των βασικότερων χημικών στοιχείων που ανευρίσκονται στη φύση, δεδομένης της παρουσίας του σε πολλά βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊνικά οξέα και ορισμένα συνένζυμα.

Το μεγαλύτερο ποσοστό (>90%) του εδαφικού αζώτου βρίσκεται στη μη αφομοιώσιμη, από τους περισσότερους ανώτερους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, οργανική μορφή (Hubbel & Kidder, 2003), το δε ανόργανο άζωτο των εδαφών επηρεάζεται από τις καλλιεργητικές τεχνικές και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Below, 1995). Καθώς λίγα είναι τα είδη που μπορούν μέσω της αζωτοδέσμευσης να εξασφαλίσουν το απαραίτητο για την ανάπτυξή τους άζωτο, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει εξελικτικά, μηχανισμούς ώστε να μπορούν αφενός να

ανταπεξέρχονται σε χαμηλές παροχές αζώτου, αφετέρου να αναπτύσσονται σε διαφορετικές πηγές εδαφικού αζώτου (Tischner, 2000). Επιπροσθέτως αναπτύχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι ανθρώπινες πρακτικές (επιστήμες γεωπονίας, χημείας και άλλες) για την εξασφάλιση αφομοιώσιμων πηγών αζώτου.

Οι κύριες διαθέσιμες μορφές του ανόργανου εδαφικού αζώτου περιλαμβάνουν το νιτρικό ( $\text{NO}_3^-$ ) και το αμμωνιακό ιόν ( $\text{NH}_4^+$ ). Για να είναι το άζωτο αξιοποιήσιμο από το φυτό, πρέπει πρωταρχικά να ενσωματωθεί σε οργανικές ενώσεις. Καθώς η μορφή του αζώτου με την οποία λαμβάνει χώρα η αφομοίωση είναι η αμμωνιακή, απαρχή του μεταβολισμού του αζώτου συνιστά η αναγωγή του  $\text{NO}_3^-$  σε  $\text{NH}_4^+$ , μία διαδικασία που πραγματοποιείται σε δύο στάδια, όπως φαίνεται παρακάτω:



Η πρόσληψη φορτισμένων ιόντων, όπως των νιτρικών ( $\text{NO}_3^-$ ) και των αμμωνιακών ( $\text{NH}_4^+$ ), από τις ρίζες των φυτών είναι ενεργός διαδικασία, μέσω μηχανισμών που εμπλέκουν τη δραστηριότητα εξειδικευμένων (ενζυμικής φύσεως) φορέων (carriers), στο πλασμαλήμμα των εξωτερικών κυττάρων της ρίζας. Η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται από εκλεκτικότητα (επιλογή ιοντικού είδους εις βάρος άλλων), κατανάλωση μεταβολικής ενέργειας (υπό μορφή ATP), και μετακίνηση του ιόντος αντίθετα από τη φορά του ηλεκτροχημικού δυναμικού (Below, 1995). Τα δε συστήματα πρόσληψης έχουν χαρακτηριστεί ως πολυφασικά, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή περισσότερων του ενός, συστημάτων μεταφοράς (τριών για το  $\text{NO}_3^-$  και δύο για το  $\text{NH}_4^+$ ), ανάλογα με την εξωτερική συγκέντρωση του ανόργανου αζώτου (Tischner, 2000, Crawford *et al.*, 1998, Glass *et al.*, 2002, Von Wirén *et al.*, 1997, Von Wirén *et al.*, 2000, Forde, 2000).

Η γνώση και κατανόηση του κύκλου του αζώτου στα καλλιεργητικά συστήματα είναι πολύ σημαντική, τόσο για τη μέγιστη αξιοποίηση των αποθεμάτων του εδαφικού αζώτου (φυσικών ή πρόσθετων), όσο και για την εκτίμηση της απόκρισης του κύκλου του αζώτου στις διαταραχές που υφίσταται από τις ανθρωπογενείς παρεμβάσεις.

Η αζωτοδέσμευση διακρίνεται σε ατμοσφαιρική και βιολογική. Κατά την ατμοσφαιρική αζωτοδέσμευση, το άζωτο της ατμόσφαιρας αντιδρά είτε με τους υδρατμούς, σχηματίζοντας αμμωνία, είτε με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, σχηματίζοντας νιτρικά ιόντα. Η απαραίτητη ενέργεια προσφέρεται από τις ηλεκτρικές εκκενώσεις (αστραπές, κεραυνοί). Η αμμωνία και τα νιτρικά ιόντα μεταφέρονται με τη βροχή στο έδαφος. Η ατμοσφαιρική αζωτοδέσμευση κατέχει το 10% της

συνολικής αζωτοδέσμευσης.

Η βιολογική αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται από φυλογενετικά διαφορετικούς προκαρυωτικούς οργανισμούς (ελεύθερους ή συμβιωτικούς), οι οποίοι ανήκουν στις οικογένειες των βακτηρίων και των αρχαίων (Eady, 1991, Young, 1992). Οι διαφορετικές απαιτήσεις που παρουσιάζουν οι οργανισμοί αυτοί για την ανάπτυξή τους, αποκλείουν την απόπειρα ταυτόχρονης ανάπτυξής τους (Knowles & Baraqqio, 1994, Weaver & Graham 1994). Επιπλέον η αδυναμία ανάπτυξης ορισμένων τέτοιων οργανισμών σε εργαστηριακό επίπεδο (Roszak & Colwell, 1987) καθιστούν αδύνατη την *in vitro* παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αζωτοδεσμευτικών οργανισμών. Η παραγωγή αζώτου από τους παραπάνω οργανισμούς



Σχήμα 1.1. Φυμάτια αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων στις ρίζες των ψυχανθών.

υπολογίζεται περί τα  $2 \times 10^{13}$  g/χρόνο (Falkovski, 1997). Η αντίστοιχη ποσότητα αζώτου που προέρχεται από την εκκένωση ατμοσφαιρικών ηλεκτρικών φορτίων υπολογίζεται στα  $10^{12}$  με  $10^{13}$  g/χρόνο.

Τα σημαντικότερα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια είναι αυτά που ζουν συμβιωτικά στις ρίζες της οικογένειας των ψυχανθών (*Leguminosae*, *Fabaceae*), τα οποία επάγουν το σχηματισμό ειδικών εξογκωμάτων που καλούνται φυμάτια (σχήμα 1.1).

Οι εν λόγω μικροοργανισμοί (ριζόβια) περιλαμβάνουν στελέχη που ανήκουν στα γένη *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Shinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* και *Frankia*.

Οι νηματώδεις μύκητες του γένους *Frankia*, επάγουν το σχηματισμό φυματίων σε ξυλώδη φυτά των οικογενειών *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Myricaceae*, *Elaeagnaceae*, *Rhamnaceae*, *Rosaceae*, *Coriariaceae* και *Datisticaceae* (Benson & Clawson, 2000, Benson & Silvester, 1993). Επιπλέον μελέτες, έδειξαν ότι το πρωτεοβακτήριο *Methylobacterium* επάγει το σχηματισμό φυματίων στο *Crotalaria* καθώς επίσης και β-πρωτεοβακτήρια, συγγενικά του *Burkholderia*, στα φυτά *Machaerium lunatum* και *Aspalathus carnosa* (Sy *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2003).

Υπολογίζεται ότι το ετήσιο κέρδος του εδάφους σε άζωτο από το σχηματισμό φυματίων είναι μεταξύ 57 και 600 Kg/ha. Υπάρχουν αναφορές για την ύπαρξη και άλλων αζωτοδεσμευτικών οργανισμών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν

τα κυανοβακτήρια *Tricodesmium*, τα οποία αναπτύσσονται στα oligοτροφικά ενδιαιτήματα των ωκεανών (Zehr *et al.*, 1998).

Η βιολογική δέσμευση αζώτου (κατέχει το 90% της συνολικής αζωτοδέσμευσης), είναι η βασικότερη διαδικασία μέσω της οποίας το ατμοσφαιρικό άζωτο μετατρέπεται σε αφομοιώσιμες μορφές για τα φυτά και τα ζώα και συνεισφέρει 100-290 Tg N ανά έτος στη βιόσφαιρα (Hsu & Buckley, 2009). Από τα ποσά της βιολογικής δέσμευσης, την μεγαλύτερη συνεισφορά παρουσιάζει η δέσμευση αζώτου μέσω της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών-ριζοβίων, η οποία ανέρχεται σε μερικές εκατοντάδες Kg/N/εκτάριο/έτος σε εντατικές καλλιέργειες (Lindemann & Glover, 2003).

Τα φυτά χρησιμοποιούν τα νιτρικά ιόντα που προσλαμβάνουν από το έδαφος (είτε με τη διαδικασία της ατμοσφαιρικής, είτε με αυτήν της βιολογικής αζωτοδέσμευσης) προκειμένου να συνθέσουν τις αζωτούχες ενώσεις τους, όπως τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Το άζωτο που περιέχεται στις ουσίες αυτές διακινείται μέσω των τροφικών αλυσίδων στις διάφορες τάξεις των καταναλωτών προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή πρωτεϊνών.

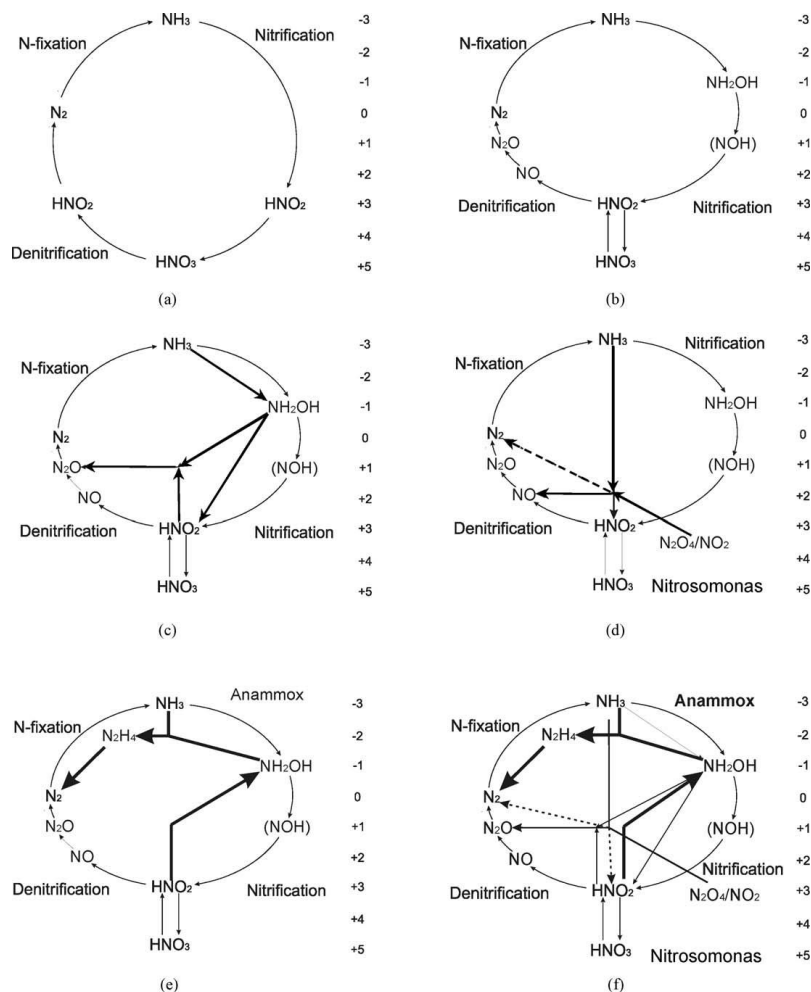
Όμως τόσο τα φυτά όσο και τα ζώα εγκαταλείπουν στο έδαφος νεκρή οργανική ύλη (καρπούς, φύλλα, νεκρά σώματα, τρίχωμα και άλλα.) που φυσικά περιέχει άζωτο. Τα ζώα επιπροσθέτως αποβάλλουν αζωτούχα προϊόντα του μεταβολισμού τους, όπως είναι η ουρία, το ουρικό οξύ και τα περιττώματα. Όλες αυτές οι ουσίες διασπώνται από τους αποικοδομητές του εδάφους μέσα από μια διαδικασία που καταλήγει στην παραγωγή αμμωνίας. Η αμμωνία που συγκεντρώνεται στο έδαφος, υφιστάμενη τη δράση των νιτροποιητικών βακτηρίων του εδάφους, μετατρέπεται τελικά σε νιτρικά ιόντα τα οποία παραλαμβάνονται από τα φυτά. Έτσι κλείνει ένας κύκλος αζώτου στο εσωτερικό του οικοσυστήματος.

Πώς όμως επανέρχεται το άζωτο που έχει απομακρυνθεί από την ατμόσφαιρα πίσω σ'αυτήν; Την εργασία αυτή, την αναλαμβάνουν τα απονιτροποιητικά βακτήρια του εδάφους με τη μετατροπή των νιτρικών ιόντων σε μοριακό άζωτο, το οποίο επιστρέφει στην ατμόσφαιρα.

Ολοκληρώνοντας, αξίζει να αναφερθεί συνοπτικά, ένα ακόμα είδος αζωτοδέσμευσης, η οποία οφείλεται στην ανθρώπινη δραστηριότητα μέσω της χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων, και καλείται βιομηχανική αζωτοδέσμευση. Συγκεκριμένα, κατά τη διαδικασία παραγωγής λιπασμάτων δεσμεύεται ατμοσφαιρικό άζωτο σε συνθήκες μεγάλης πίεσης και θερμοκρασίας, και μετατρέπεται τελικά σε

αμμωνία ή νιτρική αμμωνία, η οποία χρησιμοποιείται ως λίπασμα στις γεωργικές καλλιέργειες. Η βιομηχανική δέσμευση του αζώτου είναι τόσο έντονη ώστε το αζώτο που δεσμεύεται από την ατμόσφαιρα είναι πλέον περισσότερο από το αζώτο που απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα από τα απονιτροποιητικά βακτήρια. Είναι χαρακτηριστικό ότι πάνω από το μισό της συνολικής αζωτοδέσμευσης οφείλεται στη σύγχρονη γεωργία, είτε εξαιτίας της βιομηχανικής αζωτοδέσμευσης, είτε εξαιτίας της αύξησης καλλιέργειας ψυχανθών όπως η σόγια. Αυτό σημαίνει ότι η συγκέντρωση αζώτου στην ατμόσφαιρα θα αρχίσει πιθανά να μειώνεται. Δεν αποκλείεται όμως η περίσσεια αμμωνιακών αλάτων στα γήινα οικοσυστήματα να προκαλέσει τελικά αύξηση της δράσης των απονιτροποιητών, με αποτέλεσμα να αποκατασταθεί η ποσοτική ισορροπία του ατμοσφαιρικού αζώτου.

Η ακολουθία των παραπάνω διεργασιών βρίσκεται σε συνεχή ανακύκλωση, και συνθέτει τον κύκλο του αζώτου στη φύση, όπως φαίνεται και στην σχήμα 1.2. Ο κύκλος του αζώτου αποσκοπεί στην ανακύκλωση και οικονομία του αζώτου στην φύση.



**Σχήμα 1.2.** Κύκλος του αζώτου, (a) Κλασικός Κύκλος αζώτου, (b) Διαδικασία μετατροπής αμμωνίου σε νιτρώδη, (c) Αερόβια απονιτροποίηση μέσω βακτηρίων-*Nitrosomonas* (d) Απονιτροποίηση μέσω βακτηρίων-*Nitrosomonas*, (e) Αναερόβια οξείδωση αμμωνίου, (f) Γενικός δίκτυο του αζώτου (Ahn, 2006).

### 1.2.1 Σημασία βιολογικής δέσμευσης του αζώτου

Ο βιογεωχημικός κύκλος του αζώτου έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών, λόγω της ξεχωριστής σημασίας του στην ισορροπία και στην παραγωγικότητα των φυσικών οικοσυστημάτων (Van Dam & Van Breemen 1995, Christian *et al.*, 1996, Chapelle *et al.*, 2000, Lin *et al.*, 2000, Kercher & Chambers 2001, Corbeels *et al.*, 2005, Bruce *et al.* 2006, McNeil *et al.*, 2006).

Η αζωτοδέσμευση (δηλ. η αναγωγή του μοριακού αζώτου της ατμόσφαιρας σε αφομοιώσιμο άζωτο) είναι το κρίσιμότερο στάδιο στον κύκλο του αζώτου δεδομένου, όπως έχει αναφερθεί, ότι μόνο ορισμένα βακτήρια είναι ικανά να αζωτοδεσμεύουν, είτε διαμορφώνοντας συμβιωτικές σχέσεις με ψυχανθή φυτά, όπως αυτά του γένους *Rhizobium* και *Bradyrhizobium* (Postgate, 1982, Bailey & Ollis, 1986, Atlas & Bartha, 1993), είτε ως ελεύθερα διαβιούντα, όπως τα αερόβια *Azotobacter*, τα μικροαερόβια *Azospirillum* και ορισμένα κυανοβακτήρια. Όλοι οι άλλοι οργανισμοί (προκαρυωτικοί και ευκαρυωτικοί) απαιτούν για την αύξησή τους δεσμευμένες μορφές αζώτου.

Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα βακτήρια του γένους *Azospirillum*, καθώς εμφανίζονται σε υψηλές πυκνότητες στα εδαφικά οικοσυστήματα (Döbereiner & Day, 1976, Bashan & Holguin, 1997) και είναι τα πιο μελετημένα, μεταξύ των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ελεύθερης διαβίωσης (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000, Harmann & Baldani, 2006). Τα βακτήρια αυτά διαβιούν στη ριζόσφαιρα των φυτών απ' όπου λαμβάνουν ενέργεια, καταναλώνοντας διάφορες πηγές άνθρακα που παράγονται μέσω της φωτοσύνθεσης. Σε αντάλλαγμα, προμηθεύουν τα φυτά με αμμωνιακό άζωτο, ορμόνες, βιταμίνες, και άλλα. (Bashan & Holguin, 1997, Zuberer, 1998, Bashan *et al.*, 2004).

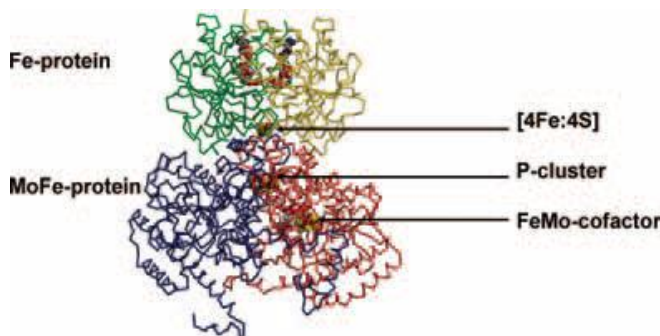
Στο εδαφικό οικοσύστημα οι αζωτοδεσμευτικοί πληθυσμοί αναπτύσσουν επωφελείς (συνεργιστικές) ή καταστροφικές (αμενσαλιστικές) σχέσεις, διαφόρου βαθμού πολυπλοκότητας, με άλλους πληθυσμούς. Η επιβίωσή τους εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις των πληθυσμών, καθώς και από τη φύση και τη συγκέντρωση οργανικών ενώσεων που εκλύονται από τα φυτά (Cacciari *et al.*, 1986, Solé *et al.*, 1992, Roberts & Stone, 2004, Bastolla *et al.*, 2005).

Σε όλες τις περιπτώσεις, ρόλο κλειδί στη διεργασία της αζωτοδέσμωσης κατέχει το ένζυμο νιτρογενάση, η βιοσύνθεση και η δραστηριότητα του οποίου επηρεάζεται άμεσα τόσο από τη συγκέντρωση αμμωνίας στο έδαφος, όσο και από τη

συγκέντρωση μοριακού οξυγόνου στο εδαφικό διάλυμα (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000, Tsagou *et al.*, 2003). Εκτός από τον αυστηρό έλεγχο της δραστηριότητας της νιτρογενάσης από τους ανωτέρω φυσικοχημικούς παράγοντες, η αζωτοδέσμευση περιορίζεται και από τη χαμηλή συγκέντρωση αφομοιώσιμων πηγών άνθρακα στο έδαφος, παράγοντας που ελέγχει την αύξηση των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (Klucas, 1991). Η χαμηλή διαθεσιμότητα αφομοιώσιμου άνθρακα έχει άμεσες συνέπειες στη διεργασία της αζωτοδέσμευσης, δεδομένου ότι η βιολογική δέσμευση του αζώτου απαιτεί υψηλά ποσά ενέργειας (16 μόρια ATP για την αναγωγή ενός μορίου N<sub>2</sub> σε αμμωνία).

Επίσης, η παρουσία ορισμένων παρεμποδιστών των βακτηρίων, όπως το αμμωνιακό άζωτο σε υψηλές συγκεντρώσεις (Pötter *et al.*, 2001, Tsagou *et al.*, 2003), δρα ανασταλτικά στη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης (Tsagou *et al.*, 2003). Παρά το γεγονός ότι το αμμωνιακό άζωτο βοηθάει την ανάπτυξη των βακτηρίων υπό αερόβιες συνθήκες (Okon *et al.*, 1976), αυτό συνιστά, σε υψηλές συγκεντρώσεις και σε χαμηλή συγκέντρωση μοριακού οξυγόνου στο εδαφικό διάλυμα, παρεμποδιστή της αύξησης (Hurek *et al.*, 1987, Tsagou *et al.*, 2003, Bashan *et al.*, 2004). Παρ' όλα αυτά, τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του γένους *Azospirillum*, σε μικροαερόβιες συνθήκες, είναι ικανά να αναπτύσσονται ακόμη και παρουσία αμμωνιακού αζώτου (σε μικρές συγκεντρώσεις), ενώ όταν τα αποθέματα αμμωνιακού αζώτου εξαντληθούν, συνεχίζουν να αυξάνονται δεσμεύοντας μοριακό άζωτο, υπό τον όρο βέβαια ότι αφομοιώσιμες πηγές άνθρακα και ενέργειας θα είναι διαθέσιμες στο περιβάλλον της αύξησης (Fritzsche *et al.*, 1990, Fritzsche & Niemann, 1990, Kefalogianni & Aggelis, 2002).

### 1.2.2 Μηχανισμός βιολογικής δέσμευσης του αζώτου



Σχήμα 1.3. Σχηματική απεικόνιση του πρωτεϊνικού συμπλόκου της νιτρογενάσης (Fe protein, FeMo protein).

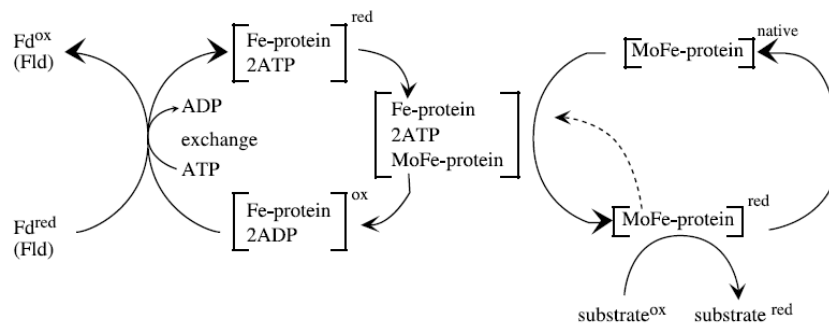
Όπως έχει προαναφερθεί, η ενζυματική μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αμμωνία, καταλύεται από το ένζυμο νιτρογενάση (Burgess & Lowe,

1996, Rees & Howard, 2000, Lawson

& Smith, 2002, Seefeldt *et al.*, 2004). Η νιτρογενάση είναι ένα ενζυμικό σύμπλοκο το οποίο αποτελείται από δύο υπομονάδες (μεταλλοπρωτεΐνες) εκ των οποίων, η μία περιέχει σίδηρο (Fe-protein) και η δεύτερη μολυβδαίνιο και σίδηρο (FeMo-protein) (σχήμα 1.3). Η πιο κοινή μορφή νιτρογενάσης είναι η Mo νιτρογενάση ή τυπική νιτρογενάση (FeMo-co). Υπάρχουν βέβαια αναφορές και για εναλλακτικού τύπου νιτρογενάσες στις οποίες το μολυβδαίνιο αντικαθίσταται από βανάδιο (Vnf) ή σίδηρο (Anf) (Eady, 1996). Μερικοί από τους μικροοργανισμούς, που φέρουν τις επιπρόσθετες μορφές νιτρογενάσης είναι το *Azotobacter* καθώς και αρκετά φωτοσυνθετικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (μεταξύ αυτών τα κυανοβακτήρια) (Franche *et al.*, 2008). Οι εναλλακτικές νιτρογενάσες σε όλες τις περιπτώσεις που είναι παρούσες αποτελούν δευτερεύοντα συστήματα. Εκφράζονται μόνο όταν οι συγκεντρώσεις μολυβδαινίου είναι περιορισμένες και εφόσον φυσικά διατίθενται από τον οργανισμό, με τη νιτρογενάση βαναδίου να παράγεται περισσότερο σε σχέση με τη νιτρογενάση σιδήρου όταν τα στοιχεία βανάδιο και σίδηρος είναι και τα δύο παρόντα. Η τυπική νιτρογενάση (FeMo νιτρογενάση) έχει βρεθεί ότι είναι πιο εξειδικευμένη και ικανή στο να δεσμεύει και να ανάγει άζωτο σε αμμωνία εν συγκρίσει με τις εναλλακτικές (με τη σειρά Nif>Vnf>Anf). Οι τελευταίες μπορεί να προέρχονται από την τυπική νιτρογενάση, όμως ενδέχεται να αποτελούν και αρχέγονες νιτρογενάσες οι οποίες έχουν συντηρηθεί σε ορισμένους προκαρυωτικούς οργανισμούς (Raymond *et al.*, 2004).

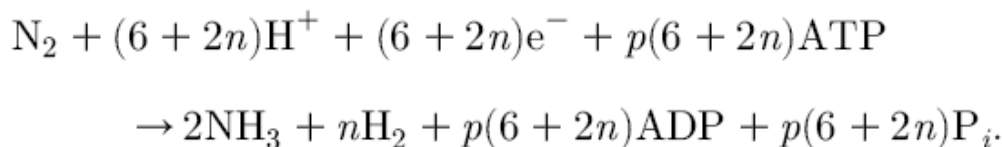
Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ο μηχανισμός δράσης της νιτρογενάσης (Thorneley & Lowe, 1985, Burgess & Lowe, 1996) περιλαμβάνει: i) σύνδεση μεταξύ της Fe υπομονάδας με δύο μόρια ATP και της FeMo υπομονάδας, ii) μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των πρωτεϊνών οι οποίες είναι συζευγμένες με το ATP, iii) αποδέσμευση της Fe υπομονάδας συνοδευόμενη από εκ νέου αναγωγή μέσω φερεδοξίνης (Fd) ή φλαφοδοξίνης (Fld) και μετατροπή του ATP σε ADP και τέλος iv) επανάληψη των προηγούμενων διαδικασιών μέχρι τη συσσώρευση επαρκούς συγκέντρωσης ηλεκτρονίων και πρωτονίων ώστε να αναχθούν εκ νέου διαθέσιμα υποστρώματα (σχήμα 1.4).





**Σχήμα 1.4.** Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της νιτρογενάσης κατά την πραγματοποίηση της βιολογικής αζωτοδέσμευσης. Στο σχήμα φαίνεται η ροή ηλεκτρονίων από μόρια μεταφορείς όπως η φερρεδοξίνη (Fd) και η φλαβοδοξίνη (Fld) στην Fe υπομονάδα (αριστερά), η μεταφορά ηλεκτρονίων από την Fe υπομονάδα στην FeMo υπομονάδα σε συνδυασμό με την υδρόλυση του ATP (κέντρο) και η επακόλουθη αναγωγή των εκάστοτε υποστρωμάτων με την επιστροφή της FeMo υπομονάδας στην αρχική της μορφή.

Η πιθανή στοιχειομετρία (ακόμη δεν έχει καθοριστεί επακριβώς) της συνολικής αντίδρασης αναγωγής του μοριακού αζώτου η οποία καταλύεται από το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης, παρουσιάζεται στην παρακάτω αντίδραση (Rees & Howard, 2000):



Σύμφωνα με την παρουσίαση του παραπάνω μοντέλου, θα πρέπει  $n=1$  και  $p=2$ . Παρ' όλα αυτά, υπό φυσιολογικές πειραματικές συνθήκες υπολογίζεται ότι  $n>1$  και  $p>2$  (Eriksson *et al.*, 1999).

Τέλος, αναφέρεται ότι το μοριακό οξυγόνο μπορεί να δράσει μη αντιστρεπτά παρεμποδιστικά ως προς την πραγματοποίηση της ως άνω αντίδρασης, απενεργοποιώντας και τα δύο σύμπλοκα της νιτρογενάσης. Το σύμπλοκο της νιτρογενάσης είναι ασταθές παρουσία οξυγόνου. Επιπλέον, έχει υπό προϋποθέσεις την ικανότητα να καταλύει διάφορες αντιδράσεις όπως η αναγωγή πρωτονίων προς μοριακό υδρογόνο ( $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ ) και η αναγωγή αιθυλενίου  $\text{C}_2\text{H}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{C}_2\text{H}_4$  (Heldt, 1999).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, η δράση της νιτρογενάσης αναστέλλεται παρουσία νιτρικών ιόντων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές αζώτου καθώς και παρουσία αμμωνιακών ιόντων. Ο έλεγχος της αζωτοδέσμευσης από τα αμμωνιακά ιόντα είναι επαγωγικό φαινόμενο και πραγματοποιείται σε επίπεδο DNA, διότι αναστέλλει την μεταγραφή γονιδίων υπεύθυνων για την σύνθεση της νιτρογενάσης.

Το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης δεν καταλύει μόνο την αντίδραση αναγωγής του αζώτου, καταλύει και την αντίδραση αναγωγής των πρωτονίων, επομένως παράγεται υδρογόνο (Διαμαντίδης, 1994).

Οι αλληλουχίες των υπομονάδων της νιτρογενάσης είναι πολύ συντηρημένες μεταξύ συμβιωτικών και ελεύθερης διαβίωσης αζωτοδεσμευτικών οργανισμών (Poly *et al.*, 2001, Franche *et al.*, 2008).

Η FeMo πρωτεΐνη ή δινιτρογενάση, η οποία καλείται και μολυβδαινοφερρεδοξίνη, είναι ένα τετραμερές μεγέθους 220.000 Da, που συνίσταται από δύο ετεροδιμερή  $\alpha_2\beta_2$  και αποτελεί προϊόν των γονιδίων *nifD* και *nifK* (όπου  $\alpha=nifD$  και  $\beta=nifK$  πρωτεΐνες) (Franche *et al.*, 2008, Raymond *et al.*, 2004, Raymond *et al.*, 2004, Διαμαντίδης, 1994). Κάθε FeMo πρωτεΐνη περιέχει δύο ζεύγη μεταλλομάδων ξεχωριστών για την κάθε μία: δύο ομάδες Fe-Mo-co και δύο  $[Fe_8S_7]$  ομάδες (P ομάδες). Η Fe-Mo-co περιστοιχίζεται πλήρως από τις τρεις περιοχές της α υπομονάδας και θεωρείται ως υπόστρωμα της αναγωγής του  $N_2$ . Η Fe-πρωτεΐνη ή αναγωγάση της δινιτρογενάσης, η οποία ονομάζεται και αζωφερρεδοξίνη, είναι υποχρεωτικός δότης ηλεκτρονίων στην πρωτεΐνη FeMo. Είναι προϊόν του γονιδίου *nifH* και αποτελεί διμερές μεγέθους 68.000 Da, το οποίο αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες. Μια μόνο ομάδα  $[Fe_4S_4]$  είναι συμμετρικά τοποθετημένη μεταξύ των υπομονάδων στα κατάλοιπα Cys97 και Cys132 από την κάθε υπομονάδα. Αυτή η ομάδα σχετίζεται άμεσα με την μεταφορά ηλεκτρονίων στην FeMo πρωτεΐνη, διότι αποτελεί το οξειδοαναγωγικό κέντρο. Η ομάδα  $[Fe_4S_4]$  της αζωφερρεδοξίνης εναλλάσσεται μεταξύ της ανηγμένης και της οξειδωμένης κατάστασης κατά τη διάρκεια της μεταφοράς ηλεκτρονίων στη FeMo πρωτεΐνη (Halbleib & Ludden, 2000).

Τα υπεύθυνα γονίδια σύνθεσης της νιτρογενάσης και όλων των απαραίτητων μηχανισμών αζωτοδέσμευσης, τα οποία εντοπίζονται στο ίδιο οπερόνιο, το *nifHDK*, ονομάζονται *nif* γονίδια (nitrogen fixation γονίδια ) (Διαμαντίδης, 1994).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα *nif* γονίδια εντοπίζονται σε ένα ή περισσότερα, μεγάλα σε μέγεθος και συν-μεταγραφόμενα, οπερόνια ή ρεγουλόνια τα οποία εκφράζουν, όχι μόνο τις υπομονάδες της νιτρογενάσης αλλά και ένα σύνολο πρωτεϊνών, σχετικών με τη ρύθμιση της βιοσύνθεσης, τη μεταφορά μετάλλων και άλλα (Raymond *et al.*, 2004).

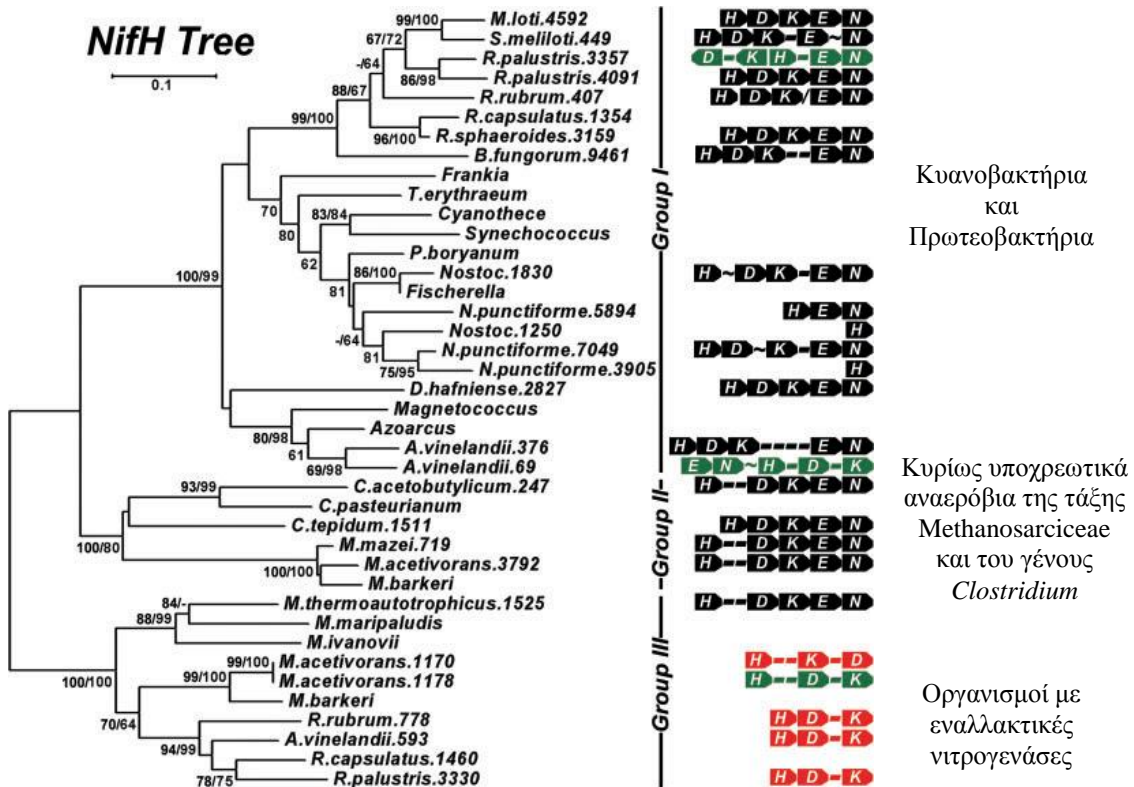
Η μοριακή ανάλυση της αζωτοδέσμευσης πραγματοποιήθηκε, αρχικά, στο βακτήριο *Klebsiella oxytoca* στέλεχος M5a1 (πρωτύτερα γνωστή ως *K. pneumoniae*).

Στο συγκεκριμένο στέλεχος τα γονίδια *nif*, τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνθεση της νιτρογενάσης, είναι ομαδοποιημένα σε μια περιοχή 24 kb και αποτελεί την πιο συμπαγή οργάνωση *nif* γονιδίων που έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα. Για την πλήρη και λειτουργική σύνθεση της νιτρογενάσης, δεν απαιτούνται μόνο τα βασικά γονίδια *nifD*, *nifK* και *nifH*. Τα γονίδια που απαιτούνται για τη σύνθεση της FeMo-co πρωτεΐνης είναι τα *nifB*, *nifQ*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifY* και *nifH*. Για τις ομάδες θείου-σιδήρου περιλαμβάνονται τα *nifS* και *nifU*, ενώ για την ωρίμανση των στοιχείων της νιτρογενάσης τα γονίδια *nifW* και *nifZ*. Είναι πλέον διαπιστωμένο ότι ο πυρήνας γονιδίων (*nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifB*, *nifQ*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*) που απαιτείται για τη σύνθεση και την κατάλυση του συμπλόκου της νιτρογενάσης είναι συντηρημένος σε όλους τους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς (Franche *et al.*, 2008). Οι πρωτεΐνες NifE και NifN έχουν σημαντικές ομοιότητες με τις NifD και NifK αντίστοιχα και πιθανώς να προέρχονται από αρχέγονο διπλασιασμό του οπερονίου *nifHDK*. Οι NifD και NifK θεωρείται ότι έχουν σταθεροποιητικό ρόλο κατά τον σχηματισμό των Fe-Mo-co και FeV-co. Το γονίδιο *nifH* φαίνεται να είναι το πιο συντηρημένο σε σχέση με τα άλλα τέσσερα (με τη σειρά H>D>K>E>N) (Raymond *et al.*, 2004). Η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων *nif* στο *K. oxytoca* αλλά και στα περισσότερα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια πραγματοποιείται από την πρωτεΐνη NifA (παραγόμενη από το γονίδιο *nifA*). Το *nifA* μεταγράφεται μαζί με το γονίδιο *nifL* το οποίο κωδικοποιεί για μια οξειδοαναγωγική και αζωτοεξαρτώμενη ρυθμιστική φλαβοπρωτεΐνη (NifL). Η NifL ενεργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της NifA προσθέτοντας έτσι άλλο ένα επίπεδο ρύθμισης σε σχέση με το οξυγόνο και το άζωτο. Η οξειδωμένη NifL είναι επίσης ευαίσθητη στην παρουσία νουκλεοτιδίων *in vitro* και παρουσιάζει αυξημένη αναστολή, ειδικά, παρουσία ADP (Halbleib & Ludden, 2000). Η ρύθμιση της έκφρασης των *nif* γονιδίων είναι αρκετά περίπλοκη και συνδέεται άμεσα με την αφομοίωση αμμωνίας και τον μεταβολισμό του αζώτου.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα εξελικτικά γεγονότα που οδήγησαν στη δημιουργία και τη σταθεροποίηση των δομών των οπερονίων που είναι υπεύθυνα για την αζωτοδέσμευση. Το σύνολο των γονιδίων που εκφράζουν το σύστημα της νιτρογενάσης ήταν στο παρελθόν σαφώς κινητό στοιχείο μέσω οριζόντιας μεταφοράς, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι πλέον δεν μπορεί να έχει τέτοιες ιδιότητες. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα γονιδίων νιτρογενάσης τα οποία χάθηκαν μέσω επιλογής, διπλασιάστηκαν, μεταφέρθηκαν οριζόντια και, τουλάχιστον σε μία περίπτωση, επανεντοπίστηκαν στο μονοπάτι της φωτοσύνθεσης. Πλέον, οι πυρήνες των γονιδίων

*nif* εντοπίζονται σε πλήθος προκαρυωτικών οργανισμών, ακόμα και σε πλασμίδια, υποδεικνύοντας ότι έχουν ένα κοινό πρόγονο ο οποίος κάποια στιγμή απέκτησε αυτό το πλεονέκτημα.

Η απόδειξη ότι, το γονίδιο *nifH* είναι το πιο συντηρημένο μεταξύ βακτηρίων και αρχαίων εμφανίζεται στο παρακάτω δενδρόγραμμα (σχήμα 1.5) (Raymond *et al.*, 2004).



Σχήμα 1.5. Φυλογενετικό δέντρο *nifH*.

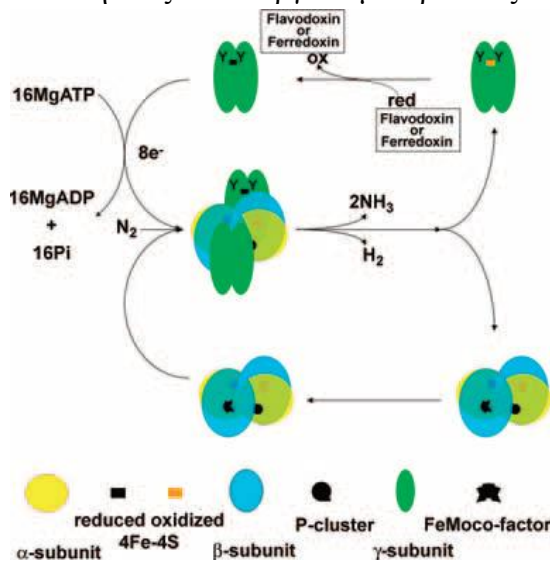
Στους οργανισμούς που είναι διαθέσιμο το γονιδίωμα, το νούμερο μετά το όνομα του είδους αναφέρεται στη σχετική θέση του ανοικτού αναγνωστικού πλαισίου της πρωτεΐνης εντός του γονιδιώματος. (δεν περιλαμβάνονται τα *R. capsulatus* και *R. palustris*). Τα νούμερα στους κόμβους του δενδρογράμματος δείχνουν την τιμή bootstrap support σε 100 αντίγραφα της μεθόδου μέγιστης πιθανοφάνειας (πρώτο νούμερο) ή βασισμένη σε 500 αντίγραφα της μεθόδου απόστασης. Η παύλα (-) σε έναν κόμβο υποδεικνύει χαμηλή τιμή bootstrap support (<60%) για το συγκεκριμένο πρότυπο διακλάδωσης είτε για το δέντρο μέγιστης πιθανοφάνειας (Μ.Π.) είτε για το δέντρο από τη μέθοδο της γενετικής απόστασης (αν και παρατηρείται ίδια τοπολογία). Μονό νούμερο ή κανένα νούμερο δείχνει την ασυμφωνία στην τοπολογία του κόμβου μεταξύ δέντρου Μ.Π. και δέντρου από τη μέθοδο της γενετικής απόστασης. Το μονό νούμερο δείχνει την τιμή bootstrap support από δέντρο της μεθόδου απόστασης αν είναι ίση ή μεγαλύτερη από 60%. Η κλίμακα στην εικόνα αντιστοιχεί στον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση για τους κλάδους στο δέντρο της μεθόδου απόστασης (προσαρμοσμένο από Raymond *et al.*, 2004).

### 1.2.3 Ενεργειακό κόστος

Η αναγωγή του αζώτου απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας είτε πραγματοποιείται χημικά είτε βιολογικά. Για την παραγωγή λιπασμάτων καταναλώνονται τεράστια ποσά φυσικών καυσίμων ως πηγή ενέργειας. Οι ύλες αυτές είναι αναντικατάστατες και εν τέλει εξαντλήσιμες.

Κατά τη βιολογική δέσμευση αζώτου η απαιτούμενη ενέργεια, η οποία προμηθεύεται από την οξείδωση υδατανθράκων που έχουν συντεθεί μέσω φωτοσυνθετικής δραστηριότητας από τα φυτά, προέρχεται άμεσα από την ηλιακή ενέργεια. Δεν έχει οικονομικό κόστος, είναι οικολογικής φύσης και ανεξάντλητη, ενώ ταυτόχρονα είναι διαθέσιμη σε όλα τα μέρη όπου οι συνθήκες επιτρέπουν την ανάπτυξη φωτοσυνθετικών οργανισμών (Hubbell & Kidder, 2003). Καθημερινά ο πλανήτης μας «βομβαρδίζεται» με  $10^{22}$  Joules ηλιακής ενέργειας, τα οποία ισοδυναμούν με την ενέργεια που περικλείεται σε 1.000 ατομικές βόμβες. Το μεγαλύτερο μέρος αυτής της ενέργειας απορροφάται, ανακλάται ή σκεδάζεται από την ατμόσφαιρα και την επιφάνεια του πλανήτη. Ένα μικρό μόνο μέρος, που δεν ξεπερνά το 1% κατά μέσο όρο, δεσμεύεται από τους μικροοργανισμούς προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στη φωτοσύνθεση. Αυτό όμως το μικρό ποσοστό επαρκεί για την παραγωγή 170 περίπου δισεκατομμυρίων τόνων οργανικής ύλης παγκοσμίως.

Η διαδικασία της βιολογικής δέσμευσης αζώτου αποτελεί μία από τις πιο απαιτητικές σε ενέργεια μεταβολικές διαδικασίες στη βιολογία. Η ικανότητα των



**Σχήμα 1.6.** Ο μηχανισμός της νιτρογενάσης:  $\text{N}_2 + 8\text{H}^+ + 8e^- + 16\text{MgATP} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{H}_2 + 16\text{MgADP} + 16\text{Pi}$ .

αζωτοδεσμευτικών οργανισμών να δεσμεύουν άζωτο στηρίζεται αποκλειστικά στο σύστημα της νιτρογενάσης κατά το οποίο υδρολύονται 16 μόρια ATP για κάθε μόριο αζώτου ( $\text{N}_2$ ) (Raymond *et al.*, 2004).

Στη βιολογική δέσμευση του αζώτου, δότης ηλεκτρονίων είναι το  $\text{NADH}^+\text{H}^+$ , που παράγεται κυρίως στις αντιδράσεις του κύκλου του Krebs. Τα ηλεκτρόνια από το  $\text{NADH}^+\text{H}^+$  μεταβιβάζονται στη φερρεδοξίνη και στη συνέχεια στη Fe-πρωτεΐνη της νιτρογενάσης.

Η ανηγμένη μορφή της Fe-πρωτεΐνης δεσμεύει τα μόρια της ATP τα οποία υδρολύονται σε ADP και Pi, καθώς τα ηλεκτρόνια μεταβιβάζονται στη δεύτερη υπομονάδα της νιτρογενάσης, τη FeMo πρωτεΐνη. Η υδρόλυση δύο μορίων ATP ανά ηλεκτρόνιο που μεταβιβάζεται, είναι αναγκαία για την απαραίτητη παροχή ενέργειας που απαιτείται ώστε να αυξηθεί η αναγωγική ικανότητα της Fe-πρωτεΐνης. Εν συνεχεία, η FeMo-πρωτεΐνη αποθηκεύει τα ηλεκτρόνια που δέχεται μέχρις ότου αυξηθεί ικανοποιητικά η αναγωγική δύναμή της (απαιτούνται συνολικά έξι ηλεκτρόνια), ώστε να είναι δυνατή η αναγωγή του μοριακού αζώτου (σχήμα 1.6). Η υποχρεωτική αναγωγή πρωτονίων συμβαίνει κατά την κατάλυση της νιτρογενάσης κατά την οποία παράγεται τουλάχιστον 1 mol H<sub>2</sub> για κάθε N<sub>2</sub> που ανάγεται. Η αναλογία ηλεκτρονίων που διατίθεται για αναγωγή αυξάνεται υπό συνθήκες μειωμένης ροής ηλεκτρονίων μέσω περαιτέρω αύξησης της κατανάλωσης MgATP (Halbleib & Ludden, 2000). Η προαναφερθείσα αντίδραση, εν συγκρίσει με την αντίδραση αφομοίωσης αζώτου, είναι περισσότερο ενεργοβόρος σε βιολογικά ισοδύναμα ενέργειας και απαιτεί μεγαλύτερη αναγωγική δύναμη και περισσότερα ATP.

Όλοι οι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί, συμβιωτικοί και μη, εκμεταλλεύονται τις εκκρίσεις των ριζών των φυτών, προκειμένου να εξασφαλίσουν πηγές άνθρακα και ενέργειας. Εξαιρεση αποτελούν οι φωτοσυνθετικοί αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί, οι οποίοι εξασφαλίζουν την απαιτούμενη ενέργεια απευθείας από την ηλιακή ακτινοβολία (Saikia & Jain, 2007). Τα συμβιωτικά βακτήρια εντός των φυματίων λαμβάνουν εξειδικευμένες μορφές και αποκτούν το όνομα βακτηριοειδή. Μέσα στα φυμάτια η απαιτούμενη ενέργεια για την αναγωγή του αζώτου προέρχεται άμεσα από τη φωτοσύνθεση των φυτών. Στα φυμάτια μεταφέρεται σακχαρόζη, η οποία διασπάται από διακαρβοξυλικά οξέα σε άνθρακα και ενέργεια που χρειάζεται το βακτηριοειδές και σε αντάλλαγμα το ριζόβιο παρέχει στο φυτό αμμωνιακά ιόντα (Franche *et al.*, 2008). Όμως, για τους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς ελεύθερης διαβίωσης, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αναγωγή του αζώτου, υπάρχουν περιοριστικοί παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα άνθρακα και ενέργειας. Αυτό συμβαίνει διότι: α) οι εκκρίσεις της ρίζας προσφέρουν μεν πηγές άνθρακα αλλά όχι σε μεγάλα ποσά, β) οι συνθήκες μπορεί να μην είναι ιδανικές όπως σε ένα φυμάτιο και γ) δημιουργείται ανταγωνισμός μεταξύ των οργανισμών της ριζόσφαιρας. Οι περιορισμοί αυτοί μπορεί να αντισταθμιστούν με τη μετακίνηση ενός οργανισμού πιο κοντά στη ριζόσφαιρα ή στο ριζοπλάνο (επιφάνεια ρίζας) ή εφόσον έχει την ικανότητα ενδοφυτικού αποικισμού (Tilak *et al.*, 2005). Για παράδειγμα, το

*Azotobacter chroococcum* το οποίο είναι αερόβιο βακτήριο ριζόσφαιρας ωφελείται από άφθονες ποσότητες ανηγμένων οργανικών ενώσεων. Η δραστηριότητα του σε ορυζώνες μπορεί να αυξηθεί με προσθήκη σανού ρυζιού, λόγω της διάσπασης της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Αντίστοιχα, το αναερόβιο σαπροφυτικό *Clostridium* δεν έχει τις δυνατότητες του *A. chroococcum* και είναι αποδοτικό σε ορυζώνες μόνο με προσθήκη σανού ρυζιού (Kennedy *et al.*, 2004). Ο πίνακας που ακολουθεί (πίνακας 1.1), υποδεικνύει την ποικιλότητα ορισμένων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ως προς το περιβάλλον τους και τις πηγές ενέργειας.

Οργανισμοί	Συνθήκες αζωτοδέσμευσης	Περιβάλλον	Πηγή ενέργειας
<i>A.chroococcus</i>	Αερόβιο	Ριζόσφαιρα	Οργανικές ενώσεις εδάφους
<i>Clostridium spp.</i>	Αναερόβιο	Σαπροφυτικό έδαφος	Οργανικές ενώσεις εδάφους
<i>Azospirillum spp.</i>	Μικροαερόβιο	Ριζόσφαιρα, ορισμένες φορές ενδοφυτικό σε ρίζες, βλαστούς και φύλλα	Οργανικές ενώσεις εδάφους, εκκρίσεις ρίζας, φυτικός ιστός
<i>Herbaspirillum seropediacae</i>	Μικροαερόβιο	Ριζόσφαιρα και ενδοφυτικό	Εκκρίσεις ρίζας
<i>Azoarcus spp.</i>	Μικροαερόβιο	Ενδοφυτικό	Εκκρίσεις ρίζας
<i>Burkholderia vietnamensis</i>	-	Ριζόσφαιρα, ενδοφυτικό	Οργανικές ενώσεις εδάφους και εκκρίσεις ρίζας
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolli</i>	-	Ενδοφυτικό στη ρίζα	Εκκρίσεις ρίζας
<i>R eti</i> bv. <i>phaseoli</i>	-	Ενδοφυτικό στη ρίζα	Εκκρίσεις ρίζας
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Μικροαερόβιο	Ενδοφυτικό στη ρίζα	Εκκρίσεις ρίζας

<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Μικροαερόβιο	Ενδοφυτικό στη ρίζα, σε φύλλα και βλαστούς	Εκκρίσεις ρίζας Φυτικός ιστός
---	--------------	--	----------------------------------

**Πίνακας 1.1.** Ποικιλότητα ορισμένων βακτηρίων ως προς το περιβάλλον αζωτοδέσμευσης και τις πηγές ενέργειας.

#### 1.2.4 Παρέμβαση του ανθρώπου

Η εκθετική αύξηση του πληθυσμού καταδεικνύει την ανάγκη για άνοδο της παγκόσμιας αγροτικής παραγωγής. Το γεγονός αυτό οδήγησε αφενός στη χρήση χημικών λιπασμάτων (N, P, K), αφετέρου στην ανάπτυξη προηγμένων καλλιεργητικών μεθόδων.

Στην Ε.Ε., η κύρια πηγή N στα καλλιεργούμενα εδάφη είναι τα ανόργανα λιπάσματα (κυρίως υπό μορφή νιτρικής αμμωνίας), αν και η κοπριά ζώων εξακολουθεί να παίζει σημαντικό ρόλο σε ορισμένες χώρες με αναπτυγμένη κτηνοτροφία, αποτελώντας έτσι τη δεύτερη κατά σειρά εισροή αζώτου στη γεωργία (Vall *et al.*, 1999).

Το εύλογο ερώτημα που δημιουργείται όμως, αφορά τις επιπτώσεις της ανεξέλεγκτης και αλόγιστης χρήσης χημικών λιπασμάτων. Πριν την εκτεταμένη δραστηριότητα του ανθρώπου, εκτιμάται ότι η δέσμευση του N στα χερσαία οικοσυστήματα κυμαινόταν μεταξύ 90-140 Tg (εκατομμύρια τόνοι) N ανά έτος (Vitousek *et al.*, 1997). Η ανθρώπινη δραστηριότητα έχει εμφανώς εμπλουτίσει τους ρυθμούς δέσμευσης του N. Περίπου 98 Tg N ανά έτος δεσμεύονται βιομηχανικά μέσω της διεργασίας Haber-Bosch<sup>1</sup> (85% για γεωργικά λιπάσματα, 15% για τη βιομηχανία), 40 Tg μέσω της καλλιέργειας ψυχανθών, και 22 Tg κατά τη διάρκεια της καύσης, κυρίως για παραγωγή ενέργειας (Jenkinson, 2001).

Η βιομηχανική δέσμευση του αζώτου, από το 1940 που ήταν μηδενική, παρουσίασε εκθετική αύξηση (Vitousek *et al.*, 1997). Η χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων εκτινάχθηκε στα ύψη τη δεκαετία του '70 και στις αρχές της δεκαετίας του '80, ακολουθώντας μία πτωτική τάση από το 1985 και μετά (Vall *et al.*, 1999).

<sup>1</sup> Το ατμοσφαιρικό N<sub>2</sub> ενώνεται με H<sub>2</sub> υπό συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (400-500°C) και πίεσης (200-1000atm), παρουσία καταλύτη (Fe, Os) προς σχηματισμό NH<sub>3</sub>. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι: N<sub>2</sub> + 3H<sub>2</sub> → 2NH<sub>3</sub>.



Από τις αρχές της δεκαετίας του '90, η ολική κατανάλωση αζωτούχων λιπασμάτων έχει υπερβεί την αθροιστική ολική κατανάλωση των καλιούχων και φωσφορικών λιπασμάτων.

Το άζωτο στα εμπορικά σκευάσματα είναι ιδιαίτερα διαλυτό, ώστε να διευκολύνεται η πρόσληψή του από τα φυτά, γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερα ευκίνητο στο έδαφος. Υπολογίζεται όμως, ότι τα φυτά προσλαμβάνουν μόνο το 30-50% του προστιθέμενου λιπασματικού αζώτου (Tilman *et al.*, 2002), και καθώς η διαδικασία μεταβολισμού του από τους μικροοργανισμούς του εδάφους είναι αργή, υπάρχει κίνδυνος επιφανειακής απορροής προς υδάτινους σχηματισμούς μετά από ισχυρή βροχόπτωση, και ρύπανσης των υπόγειων υδροφόρων λόγω διήθησης προς τα κατώτερα στρώματα (Vall *et al.*, 1999).

Η έκπλυση των  $\text{NO}_3^-$  είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αφορούν στη χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων, ειδικά στις περιπτώσεις που ο υδάτινος αποδέκτης χρησιμοποιείται για πόσιμο νερό και απειλείται η δημόσια υγεία. Η έκπλυση παρατηρείται όταν η διαθέσιμη ποσότητα  $\text{NO}_3^- \text{N}$  από τα ανόργανα λιπάσματα ή και από τη χρήση κοπριάς υπερβαίνει τις εποχιακές απαιτήσεις της καλλιέργειας, ενώ η ένταση του φαινομένου εξαρτάται από το κλίμα (θερμοκρασία, ύψος βροχοπτώσεων), τον τύπο του εδάφους, και τον τύπο της καλλιεργητικής εκμετάλλευσης (Αναλογίδης, 2000). Από την άλλη πλευρά, αν αποδέκτες του  $\text{NO}_3^- \text{N}$  είναι υδάτινοι σχηματισμοί μικρής ροής (ποτάμια, λίμνες, παράκτιες περιοχές), τότε το αζωτούχο λίπασμα μπορεί να συνεισφέρει στο φαινόμενο του ευτροφισμού.

Μία από τις κυριότερες οδούς διαφυγής του N στην ατμόσφαιρα είναι η απώλεια αζώτου από το έδαφος, υπό μορφή αέριας αμμωνίας.

Το 95% των εκπομπών  $\text{NH}_3$  στην ατμόσφαιρα αποδίδεται στις γεωργικές πρακτικές, με το 10-20% συγκεκριμένα εκτιμάται ότι προέρχεται από τη χρήση αζωτούχων λιπασμάτων (Sensi, 1999). Η αμμωνία είναι ένας από τους παράγοντες (μαζί με τα  $\text{NO}_x$  και το  $\text{SO}_2$ ) που συνεισφέρουν στο φαινόμενο της όξινης βροχής και της οξίνισης (acidification) των χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων.

Ειδικά στην περίπτωση των εδαφών, η συστηματική χρήση υψηλών δόσεων ανόργανων λιπασμάτων με βάση την  $\text{NH}_3$  (ή  $\text{NH}_4^+$ ), έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της οξύτητας των εδαφών (Šimek *et al.*, 2001), η οποία πέρα του ότι μειώνει τη γονιμότητά τους, συντελεί στην ελευθέρωση κατιόντων όπως Fe, Al, Ca, Mg καθώς και βαρέων μετάλλων, τα οποία μπορούν να καταλήξουν με τη σειρά τους σε υδάτινους σχηματισμούς (Sensi, 1999).

Επιπλέον, η χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων συμβάλλει και στην αύξηση της συγκέντρωσης των εκπεμπόμενων αερίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στη χημεία της ατμόσφαιρας και στην ποιότητα του αέρα. Το κύριο πρόβλημα αφορά στις απώλειες λιπασματικού N υπό μορφή  $N_2O$ , το οποίο συμβάλλει στην καταστροφή του όζοντος στη στρατόσφαιρα και στο φαινόμενο του θερμοκηπίου στην τροπόσφαιρα (Smil, 1997). Αν και το  $N_2O$  παράγεται κατά τη διάρκεια φυσικών διεργασιών στο έδαφος (νιτροποίηση, απονιτροποίηση), οι διεργασίες αυτές εμπλουτίζονται από την προσθήκη των ανόργανων λιπασμάτων, τα οποία μαζί με την κτηνοτροφική παραγωγή και τη χρήση κοπριάς συνεισφέρουν στο 60% των ολικών ανθρωπογενών εκπομπών του αερίου αυτού (Norse, 2003). Η δράση των μικροοργανισμών του εδάφους επί του N των λιπασμάτων είναι υπεύθυνη και για την παραγωγή NO, το οποίο συμβάλλει στο σχηματισμό του φωτοχημικού νέφους (Smil, 1997).

Το περιβαλλοντικό κόστος από τη χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων αυξάνεται σημαντικά, αν συμπεριληφθεί η υψηλή κατανάλωση ενέργειας και η περιβαλλοντική επιβάρυνση που ενδεχομένως εμπλέκεται κατά τη διάρκεια παρασκευής τους.

Συνοψίζοντας, οι συνέπειες της αλόγιστης χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων αφορούν: α) εμφάνιση καρκίνου λόγω δευτεροταγών αμινών, β) μεθεμογλοβιναιμία βρεφών λόγω παρουσίας νιτρικών και νιτρωδών στην τροφή και το νερό, γ) μόλυνση του οικοσυστήματος με νιτρικό οξύ προερχόμενο από βροχοπτώσεις, δ) ευτροφισμό λιμνών, ε) τοξικότητα φυτών από περίσσεια νιτρωδών και αμμωνιακών και άλλα (Saikia & Jain, 2007).

Τέλος εκτός από την οικολογική διάσταση δε μπορεί κανείς να μη συμπεριλάβει και τις οικονομικές συνέπειες. Το 65% του εφαρμοζόμενου αζώτου διαφεύγει από το σύστημα φυτό-έδαφος λόγω αέριων απωλειών, έκπλυσης βροχόπτωσης, διάβρωσης εδαφών και απόπλυσης (Bhattacharjee & Singh, 2008). Οι συγκεκριμένες απώλειες οδηγούν σε οικονομικές απώλειες τριών δισεκατομμυρίων δολαρίων ανά έτος.

Η Ε.Ε., αναγνωρίζοντας τον κίνδυνο μόλυνσης του υδάτινου αποδέκτη, από την έκπλυση των  $NO_3^-$ , έχει ορίσει ως ανώτατο όριο τα 50 mg  $NO_3^-/l$  στο πόσιμο νερό (Οδηγία 80/778/ΕΟΚ), ενώ παράλληλα δεσμεύει τα κράτη-μέλη να υιοθετήσουν τα κατάλληλα μέτρα για περιορισμό της νιτρορύπανσης γεωργικής προέλευσης (Οδηγία 91/676/ΕΟΚ) (Stoate *et al.*, 2001).

Στα πλαίσια της παραπάνω οδηγίας της Ε.Ε. (Παράρτημα II), προβλέπεται η εφαρμογή ενός «Κώδικα Ορθής Γεωργικής Πρακτικής» (Code of Good Agricultural Practice), κατά τον οποίο ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δίνεται στο χρόνο και τον τρόπο προσθήκης των λιπασμάτων, λαμβάνοντας υπόψη τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των αγρών (όπως εδάφη με έντονη κλίση, εδάφη πλημμυρισμένα ή καλυμμένα με χιόνι, εδάφη που γειτνιάζουν με υδάτινους σχηματισμούς). Παράλληλα, προτείνονται και γεωργικές πρακτικές που πρέπει να υιοθετηθούν, όπως η χρήση συστημάτων αμειψισποράς, καλλιεργειών κάλυψης, σχεδίων λιπασματικής διαχείρισης και λήψης μέτρων για την αποφυγή επιφανειακής απορροής και διήθησης του νερού σε αρδευτικά συστήματα.

Με την ανησυχία για το περιβάλλον και την παγκόσμια οικονομία να αυξάνεται, το βλέμμα πλέον στρέφεται σε εναλλακτικές και περισσότερο φιλικές για το περιβάλλον λύσεις (Bhattacharjee & Singh, 2008). Η οικολογική σημασία των αζωτοδεσμευτικών οργανισμών ελεύθερης διαβίωσης για την γεωργική πρακτική έχει κυρίαρχο ρόλο στο πεδίο των μη ψυχανθών φυτών. Παρά την αισθητή διαφορά στην απόδοση αζωτοδέσμευσης, μεταξύ της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών-ριζοβίων (εκατοντάδες Kg N/εκτάριο/έτος) και αζωτοδεσμευτικών οργανισμών ελεύθερης διαβίωσης και μη ψυχανθών φυτών (0-60 Kg) (Hsu & Buckley, 2009), οι δεύτεροι αποκτούν ιδιαίτερη οικολογική σημασία αν συνυπολογιστεί το γεγονός ότι τα φυτά αυτά καταλαμβάνουν πενταπλάσια καλλιεργούμενη έκταση από αυτήν των ψυχανθών σε όλο τον πλανήτη.

### 1.2.5 Ποικιλότητα συστημάτων βιολογικής δέσμευσης αζώτου

Η βιολογική δέσμευση του αζώτου, επιτελείται σε διάφορους βαθμούς και σε πολλά και ποικίλα περιβάλλοντα, όπως το έδαφος, τα τρεχούμενα και αλατώδη νερά και ιζήματα, εκτός ή εντός ριζών, βλαστών και φύλλων συγκεκριμένων ανώτερων φυτών καθώς και σε πεπτικές οδούς ορισμένων ζώων. Η δυνατότητα για αζωτοδέσμευση απαντάται σε κάθε περιβάλλον το οποίο είναι ικανό να υποστηρίξει ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Η αζωτοδεσμευτική ικανότητα είναι ευρέως διαδεδομένη τόσο μεταξύ των βακτηρίων όσο και των αρχαίων. Όλοι οι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί είναι προκαρυωτικοί.

Το φαινόμενο της βιολογικής δέσμευσης του αζώτου συνέβη νωρίς, κατά την εξέλιξη των προκαρυωτικών οργανισμών μιας και η ικανότητα για αζωτοδέσμευση παρουσιάζεται αποκλειστικά μεταξύ μελών των ευβακτηρίων και των αρχαίων (Raymond *et al.*, 2004). Η συγκεκριμένη διαπίστωση στηρίζεται στο γεγονός, ότι στην προϊστορική γη ο προμηθευτής των αβιοτικών πηγών ανηγμένου αζώτου ήταν η ενδογενής αβιοτική σύνθεση, καθώς η εξωγενής προέλευση ήταν περιορισμένη. Απόρροια αυτού, ήταν ότι οι ποσότητες ανηγμένου αζώτου δε θα επαρκούσαν για την επέκταση της μικροβιακής βιομάζας προκαλώντας έτσι, την εξέλιξη της βιολογικής δέσμευσης αζώτου.

Τα βιολογικά συστήματα τα οποία είναι ικανά να δεσμεύουν άζωτο ταξινομούνται ιστορικά σε συμβιωτικά και μη συμβιωτικά, αναφορά των οποίων γίνεται παρακάτω (Hubbell & Kidder, 2003).

#### 1.2.5.1 Συμβιωτικοί οργανισμοί

Ο όρος συμβίωση (μικροοργανισμών και φυτών) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Frank (1885) (Smith & Read, 1997), ως ένας ουδέτερος όρος ο οποίος δε δήλωνε παρασιτισμό, αλλά βασιζόταν απλά στη συνύπαρξη ανόμοιων οργανισμών. Ο De Bary, στον οποίο αποδίδεται η εισαγωγή του όρου, χρησιμοποίησε τον όρο για να δηλώσει την κοινή διαβίωση παρασίτου και ξενιστή καθώς και των σχέσεων κατά τις οποίες οι οργανισμοί προφανώς βοηθούν ο ένας τον άλλο (Smith & Read, 1997, Brundrett, 2004, Govindarajulu *et al.*, 2005).

Αναμφισβήτητα, η μεγαλύτερη συνεισφορά του αζώτου στο έδαφος προέρχεται από τη συμβιωτική σχέση ορισμένων οργανισμών και φυτών, καθώς από μόνη της η συμβίωση ψυχανθών και αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, ευθύνεται για το 20% του δεσμευόμενου αζώτου παγκοσμίως. Τα γνωστά σε όλους μας ριζόβια είναι τα βακτήρια τα οποία δημιουργούν αμοιβαίες σχέσεις με τα ψυχανθή. Η είσοδος των ριζοβίων, με τροποποιημένη μορφή (βακτηριοειδή) (Hubbell & Kidder, 2003), στο φυτό ξενιστή είναι μια ελεγχόμενη μόλυνση. Τα ριζόβια παράγουν ενώσεις λιποολιγосακχαριδικής φύσεως, οι οποίες όταν λαμβάνονται από το φυτό, οδηγούν στο σχηματισμό φυματίων, μέσω μιας σειράς διαδικασιών.

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα ριζόβια υπήρχαν στη γη πολύ πριν την εμφάνιση των ψυχανθών (Franche *et al.*, 2008). Βάσει μοριακών αναλύσεων ακολουθιών

χλωροπλαστών, όλα τα φυτά που παρουσιάζουν το φαινόμενο της συμβίωσης σχηματίζουν έναν μονό κλάδο εντός των αγγειόσπερμων και γι' αυτόν τον λόγο φαίνεται ότι υπάρχει κοινή εξελικτική προέλευση των οικογενειών των φυτών αυτών (Soltis *et al.*, 1995).

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια Leguminosae (Fabaceae), της τάξης Fabales και διακρίνονται σε τρεις υποοικογένειες: Caesalpinioideae, Mimosoideae και Papilionidae. Η υποοικογένεια Caesalpinioideae έχει πολύ λίγα taxa, στα οποία σχηματίζονται φυμάτια, ενώ στην Papilionidae ανήκουν τα περισσότερα σημαντικά καλλιεργούμενα είδη. Πρόσφατα δόθηκε προσοχή στην υποοικογένεια Mimosoideae, μιας και τα βακτήρια που απομονώθηκαν από τα φυμάτιά τους ανήκουν στα β-Πρωτεοβακτήρια, ενώ οι συμβιούντες οργανισμοί της Papilionidae ανήκουν στα α-Πρωτεοβακτήρια (Franché *et al.*, 2008). Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αξιοσημείωτες αλλαγές στην ταξινόμηση των ριζοβίων. Βάσει πρόσφατης ανανέωσης της ταξινόμησης και της ονοματολογίας προκαρυωτικών οργανισμών, τα περισσότερα ριζόβια ανήκουν στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων, σε μία μόνο τάξη (Rhizobiales) στην οποία ανήκουν 9 γένη ριζοβίων. Η κλάση β-Πρωτεοβακτήρια περιλαμβάνει 2 τάξεις (Burkholderiales και Rhodocyclales) στις οποίες ανήκουν 4 γένη ριζοβίων. Ο παρακάτω πίνακας (πίνακας 1.2) περιλαμβάνει τα γένη των βακτηρίων που έχουν τουλάχιστον ένα είδος το οποίο επάγει σχηματισμό φυματίων (Weir, 2008, Euzéby, 1997).

ΚΛΑΣΗ	Τάξη	Οικογένεια	Γένη
α- Proteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	1. <i>Rhizobium</i>
		Brucellaceae	2. <i>Ensifer</i> ( <i>Sinorhizobium</i> )
			3. <i>Ochrobactrum</i>
		Phyllobacteriaceae	1. <i>Phyllobacterium</i> 2. <i>Mesorhizobium</i>
		Bradyrhizobiaceae	1. <i>Bradyrhizobium</i>
		Xanthobacteraceae	1. <i>Azorhizobium</i>

		Methylobacteriaceae	1. <i>Methylobacterium</i>
		Hyphomicrobiaceae	1. <i>Devosia</i>
β- Proteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	1. <i>Burkholderia</i> 2. <i>Cupriavidus</i> (πρώην <i>Wautersia</i> (πρώην <i>Ralstonia</i> ))
		Oxalobacteriaceae	1. <i>Herbaspirillum</i>
	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	1. <i>Shinella</i>

Πίνακας 1.2. Είδη που επάγουν τον σχηματισμό φυματίων.

Παρά το γεγονός ότι τα περισσότερα στελέχη του γένους *Rhizobium* μπορούν να επάγουν το σχηματισμό φυματίων σε περισσότερους από έναν ξενιστές καθώς και πολλά διαφορετικά είδη, απομονώνονται συχνά από ένα ψυχανθές, οι συμβιούντες οργανισμοί που έχουν μελετηθεί σε βάθος προέρχονται από λίγα ψυχανθή.

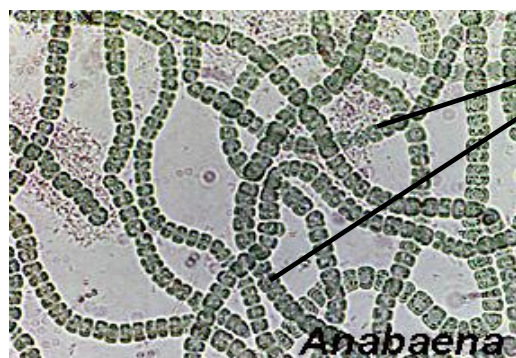
Έχει διαπιστωθεί ότι βακτήρια των γενών *Rhizobium* ή *Bradyrhizobium* σχηματίζουν συμβιωτική σχέση με μόνο δύο μη ψυχανθή φυτά τα οποία είναι είδη των *Parasponia* spp. και *Tremma* spp. (Tilak *et al.*, 2005).

Ξεχωριστή συμβίωση, αποτελεί η δυνατότητα ενός τροπικού ψυχανθούς, του *Sesbania rostrata*, να σχηματίζει φυμάτια όχι μόνο στις ρίζες αλλά και στον βλαστό του. Η ικανότητα αυτή επιτρέπει στο φυτό να δεσμεύει άζωτο, όταν αναπτύσσεται σε υγρές συνθήκες κατά τις οποίες δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός φυματίων στις ρίζες. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι, τα φυμάτια του βλαστού φαίνεται να έχουν την δυνατότητα δέσμευσης αζώτου ακόμη και όταν οι ρίζες απορροφούν νιτρικά από το έδαφος. Το βακτήριο το οποίο εμπλέκεται σε αυτή την διαδικασία ανήκει στο γένος *Azorhizobium* (Paul & Clark, 1989).

Ενώ τα περισσότερα ξυλώδη ψυχανθή απαντώνται κυρίως σε τροπικές περιοχές, μία άλλη περίπτωση συμβίωσης ψυχανθών με βακτήρια, τους ακτινομόκητες, εντοπίζεται σε εύκρατα κλίματα καθώς και σε αρκτικές περιοχές

(Vitousek *et al.*, 2002). Πρόκειται για τα βακτήρια του γένους *Frankia*, τα οποία είναι ινώδους μορφής και αναπτύσσονται ακτινωτά (γεγονός στο οποίο οφείλεται η επωνομασία «ακτινομύκητες», που είναι η ονομασία της οικογένειας στην οποία ανήκουν) (Διαμαντίδης, 1994). Τα μέλη του γένους *Frankia* είναι κατά Gram<sup>+</sup>, ανήκουν στην οικογένεια Frankiaceae της τάξης Actinomycetales και έχουν υψηλό ποσοστό G+C (Franché *et al.*, 2008). Σχηματίζουν φυμάτια σε ρίζες ξυλωδών φυτών κάποιων ειδών, των γενών *Ceanothus*, *Alnus*, *Hippophae*, *Casuarina* και άλλων, μερικά από τα οποία εισβάλλουν εύκολα σε φτωχά εδάφη υπό αντίξοες συνθήκες. Το γεγονός αυτό προσδίδει στα βακτήρια του γένους *Frankia* ιδιαίτερο ενδιαφέρον αν και τα είδη αυτά με τα οποία συμβιώνουν είναι διαδεδομένα, στην Ελλάδα κυρίως, ως καλλωπιστικά. Εκτάσεις με *Alnus glutinosa* αναφέρονται στο δέλτα του ποταμού Σπερχειού, στα όρη Πάικο και Πήλιο, καθώς και σε άλλες περιοχές (Ευθυμίου *et al.*, 2005, Φωτιάδης, 2005, Κοράκης & Αθανασιάδης, 2006). Γενικά, τα βακτήρια του γένους *Frankia* σχηματίζουν φυμάτια σε περισσότερα από 280 είδη ξυλωδών φυτών από 8 διαφορετικές οικογένειες. Ωστόσο, οι διαδικασίες που ορίζουν τη συμβιωτική αυτή σχέση δεν είναι πλήρως κατανοητές και παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε διάφορα επίπεδα σε σχέση με τα ριζόβια (Franché *et al.*, 2008, Tilak *et al.*, 2005). Η συνεισφορά των βακτηρίων του προαναφερθέντος γένους στην αζωτοδέσμευση είναι σημαντική και μπορεί να φτάσει τα 100 kg/h ανά έτος (Hubbell & Kidder, 2003).

Η τελευταία κατηγορία συμβιωτικών αζωτοδεσμευτικών οργανισμών είναι μέλη των κυανοβακτηρίων. Τα κυανοβακτήρια αποτελούν τη μεγαλύτερη και πιο ποικίλη ομάδα Gram<sup>-</sup> προκαρυωτικών οργανισμών (Franché *et al.*, 2008). Τα πιο σημαντικά αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια είναι νηματώδη στελέχη τα οποία διαφοροποιούνται ώστε να δημιουργηθούν ετεροκύστες. Βακτήρια των γενών *Nostoc* και *Anabaena* (Nostocales) είναι οι πιο σημαντικοί εκπρόσωποι των κυανοβακτηρίων. Οι ετεροκύστες είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένα κύτταρα που διαφοροποιούνται εντός του νηματίου όπου εντοπίζεται η αζωτοδέσμευση όταν υπάρχει έλλειψη αζώτου (σχήμα 1.7) (Elmerich, 2007, Franché *et al.*, 2008).



**Ετεροκύστες**

**Σχήμα 1.7.** Στέλεχος *Anabaena* ελεύθερης διαβίωσης σε θρεπτικό μέσο, απουσία αζώτου, όπου οι ετεροκύστες φαίνονται καθαρά μεταξύ των κανονικών κυττάρων (Franché *et al.*, 2008).

Το άζωτο που δεσμεύεται από τις ετεροκύστες διοχετεύεται στα φυτικά κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους, προμηθεύουν τις ετεροκύστες με υδατάνθρακες που προέρχονται από τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Η πιο γνωστή συμβιωτική σχέση κυανοβακτηρίου είναι αυτή που δημιουργείται μεταξύ της υδροχαρούς φτέρης *Azolla* και του είδους *Anabaena azollae* και είναι η μοναδική συμβιωτική σχέση κυανοβακτηρίου με εφαρμογές στην γεωργία (Hove & Lejeune, 2002). Για παράδειγμα, στην Ασία και συγκεκριμένα στο Βιετνάμ και στη Νότια Κίνα, αναφέρεται ότι η χρήση της *Azolla*, ως χλωρή λίπανση, είναι πρακτική που ακολουθείται από τους αρχαίους χρόνους (Elmerich, 2007). Η οργάνωση του οπερονίου του *A. azollae* που κωδικοποιεί για τη νιτρογενάση έχει αρκετές ομοιότητες με αυτήν του *K. oxytoca* και άλλων αζωτοδεσμευτικών οργανισμών (Haselkorn, 2007). Ξεχωριστό ενδιαφέρον παρουσιάζει η παραπάνω σχέση και για έναν επιπρόσθετο λόγο, είναι η μοναδική η οποία διατηρείται και κατά τον αναπαραγωγικό κύκλο του ξενιστή φυτού. Η σχέση *Azolla* - *A. azollae* είναι η μοναδική παρατηρούμενη συμβίωση μεταξύ βακτηρίου και πτεριδόφυτου (Vitousek *et al.*, 2002).

Η συμβίωση που παρατηρείται μεταξύ του κυανοβακτηρίου *Nostoc* με είδη των γενών *Gunnera* ή της ομάδας των κυκαδόφυτων (Cycadophyta), είναι η μοναδική μεταξύ βακτηρίου και αγγειόσπερμου ή γυμνόσπερμου, αντίστοιχα. Το γένος *Gunnera* αποτελείται περίπου από 40 είδη και πιθανότατα, συνεισφέρει σημαντικά ποσά αζώτου σε ορεινές τροπικές περιοχές καθώς και σε περιοχές του νότιου ημισφαιρίου. Η είσοδος των βακτηρίων πραγματοποιείται από ειδικούς αδένες του βλαστού που σχηματίζονται στη βάση των μίσχων. Μετά την προσβολή, δρομολογείται η διαφοροποίηση φυτικών κυττάρων σε ετεροκύστες, όπου πραγματοποιείται η αζωτοδέσμευση (Vitousek *et al.*, 2002, Franche *et al.*, 2008). Στα κυκαδόφυτα η είσοδος των κυανοβακτηρίων (*Nostoc* καθώς και ορισμένα άλλα γένη) πραγματοποιείται μέσω ειδικών πλάγιων ριζών που αναπτύσσονται και ονομάζονται κοραλλοειδείς ρίζες, στις οποίες ένα στρώμα κυττάρων είναι δεκτικό στην προσβολή (Franche *et al.*, 2008). Πολλά κυκαδόφυτα αναφέρονται ως ανθεκτικά στις πυρκαγιές και στην ξηρασία (Vitousek *et al.*, 2002).

Επιπλέον, εκτός από τα αγγειώδη φυτά, παρατηρείται μεγάλη ποικιλία μη αγγειωδών κατώτερων φυτών που σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με κυανοβακτήρια όπως, βρύα (*Blasia*), μεγαπλαγκτόν (υπερυδατικά ή μεσόπλευστα φυτά), άλγες και λειχήνες (Hubbell & Kidder, 2003, Franche *et al.*, 2008).



Ολοκληρώνοντας τις αναφορές σχετικά με τις συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ φυτών και βακτηρίων, αξίζει να σημειωθεί ότι πολλά είδη αυτότροφων οργανισμών που δε σχηματίζουν ριζικά τριχίδια ή ακόμα και ρίζες μπορούν να αναπτύσσονται σε ορισμένες περιοχές, λόγω συμβίωσής τους με μύκητες (Βερεσόγλου, 2002). Φυτά τα οποία διαβιούν σε εδάφη με χαμηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων και κυρίως αφομοιώσιμου φωσφόρου, αναπτύσσονται λόγω δημιουργίας μυκόριζας (δομικό και λειτουργικό σύμπλεγμα μεταξύ ρίζας και μύκητα (Brundrett, 2004)). Οι μυκόριζες διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο, τόσο στη γονιμότητα των εδαφών όσο και στη θρέψη του φυτού, δεδομένου ότι τα δύο μέρη της συμβίωσης αλληλεπιδρούν, προσφέροντας αμοιβαία οφέλη

Η σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού έχει ποσοτικές και ποιοτικές επιδράσεις σε σημαντικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο έδαφος (Hsu & Buckley, 2009), όπως η βιολογική δέσμευση αζώτου. Τη μεγαλύτερη συνεισφορά αζώτου στο έδαφος, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, φαίνεται να έχουν οι συμβιωτικοί οργανισμοί, οι οποίοι όμως αποικίζουν σχεδόν αποκλειστικά ρίζες ψυχανθών. Οι ελεύθερης διαβίωσης ή ενδοφυτικοί οργανισμοί μπορεί να μην έχουν την αζωτοδεσμευτική δύναμη των συμβιωτικών, αλλά η δυνατότητα να προμηθεύουν άζωτο τις καλλιέργειες αγρωστωδών με εναλλακτικό τρόπο (βιολογικό και οικονομικό), τα καθιστά ιδιαίτερος σημαντικά.

Η σπουδαιότητα της συμβίωσης στην εξέλιξη των ευκαρυωτικών κυττάρων των φυτών, ζώων, βακτηρίων και μυκήτων διατηρεί αμείωτο το ενδιαφέρον τα τελευταία έτη. Η συμβίωση σε επίπεδο πιο σύνθετων οργανισμών αποτελεί κανόνα και όχι εξαίρεση. Οι αμοιβαίως επωφελείς σχέσεις μεταξύ οργανισμών διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο, τόσο στα φυτικά οικοσυστήματα όσο και στα αγροοικοσυστήματα.

### **1.3 Μη συμβιωτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια**

Οι μικροοργανισμοί που αποικούν στη ριζόσφαιρα κατατάσσονται σε κατηγορίες ανάλογα, με την επίδρασή τους στα φυτά και τον τρόπο που αλληλεπιδρούν με τις ρίζες.

Ως προς τη επίδραση τους, χωρίζονται σε παθογόνους και μη παθογόνους. Οι μη παθογόνοι, οι οποίοι είναι ταυτόχρονα και ωφέλιμοι, διακρίνονται σε δύο

κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει μύκητες και βακτήρια, τα οποία δημιουργούν αμοιβαίες συμβιωτικές σχέσεις με το φυτό ξενιστή (*Rhizobium*, *Frankia* και άλλα) και η δεύτερη βακτήρια, γνωστά ως PGPB (**P**lant **G**rowth **P**romoting **B**acteria), που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού, μέσω έμμεσων ή άμεσων μηχανισμών, καθώς και βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης, τα οποία επιδρούν θετικά αφενός στην ανάπτυξη του φυτού, αφετέρου στον εμπλουτισμό του εδάφους.

Τα PGPB σχετίζονται με πολλά, αν όχι όλα, είδη φυτών και απαντώνται συχνά, σε πολλά περιβάλλοντα (Mantelin & Touraine, 2004). Στη συγκεκριμένη ομάδα ανήκουν στελέχη των γενών, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* και *Serratia* (Somers *et al.*, 2004). Ορισμένα βακτήρια της κατηγορίας, είναι δυνατό να εισέλθουν στη ρίζα και να πολλαπλασιαστούν ενδοφυτικά. Άλλα πάλι, είναι ικανά να ξεπεράσουν το εμπόδιο της ενδοδερμίδας και να εγκατασταθούν μέσω του αγγειοφόρου συστήματος και σε άλλα όργανα, όπως οι βλαστοί, τα φύλλα, οι βολβοί και άλλα.

Τα υπεύθυνα για την προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών, ριζοβακτηρίδια PGPR (**P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobacteria), τα οποία αποτελούν την πιο καλά μελετημένη ομάδα των PGPB, διεγείρουν την ανάπτυξη των φυτών, είτε με άμεση έκκριση φυτοορμονών είτε υποβοηθώντας τη θρέψη του φυτού, για παράδειγμα με διαλυτοποίηση φωσφόρου και βιολογική δέσμευση αζώτου.

Επιπλέον, τα PGPR διαθέτουν μηχανισμούς προστασίας των φυτών από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς του εδάφους, οι οποίοι περιλαμβάνουν: α) παραγωγή αντιβιοτικών, β) σιδηροφόρων ουσιών, γ) ενζύμων και άλλων μεταβολιτών, που εμποδίζουν τη δράση μικροοργανισμών που βρίσκονται στη ριζόσφαιρα. Κάποια στελέχη φαίνεται να έχουν και προστατευτική δράση έναντι διασυστηματικών και επιφανειακών παθογόνων. Η «ανοσοποίηση», εκδηλώνεται ως καθυστέρηση στην έκφραση των συμπτωμάτων και μείωση στην ένταση και εξέλιξη της ασθένειας, με παράλληλη ενεργοποίηση μηχανισμών που συμβάλλουν στη διασυστηματική προστασία των φυτών έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων και ιών (Τζάμος, 2004, Compant *et al.*, 2005, Zehnder *et al.*, 2001, Kloepper *et al.*, 1999). Η «επαγόμενη διασυστηματική αντοχή» (Induced Systemic Resistance, ISR), όπως καλείται, είναι ένας νέος σχετικά αλλά εξίσου σημαντικός μηχανισμός άμυνας των φυτών (De Meyer & Hofte, 1997, Raupach & Kloepper 1998, Zehnder *et al.*, 2001). Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η επαγόμενη συστηματική ανθεκτικότητα δεν είναι απολύτως ξεκάθαροι, όμως το πιθανότερο είναι να

παράγονται αντιμικροβιακοί παράγοντες όπως οι φυτοαλεξίνες, ενώ φαίνεται να έχουν άμεση σχέση με το σαλικυλικό οξύ (De Meyer & Hofte, 1997), με την αυξημένη δράση χιτινάσης και περοξειδάσης (Nandakumar *et al.*, 2001) και την εναπόθεση λιγνίνης (Koike *et al.*, 2001).

### 1.3.1 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης

Τα βακτήρια, των οποίων η επιβίωση δεν εξαρτάται άμεσα από τις εκκρίσεις των ριζών, καλούνται ελεύθερης διαβίωσης και απαντώνται στο έδαφος. Εν τούτοις, οι βακτηριακοί πληθυσμοί της ριζόσφαιρας έχουν αποδοτικά συστήματα απορρόφησης και καταβολισμού οργανικών ενώσεων που περιέχονται στις εκκρίσεις των ριζών (Tilak *et al.*, 2005).

Όπως οι συμβιωτικοί οργανισμοί έτσι και αυτοί της ελεύθερης διαβίωσης κατέχουν, τα απαραίτητα για την παραγωγή νιτρογενάσης, γονίδια *nif*. Συγκεκριμένα, το γονίδιο *nifH*, το οποίο κωδικοποιεί για μία υπομονάδα της νιτρογενάσης, αποτελεί έναν χρήσιμο δείκτη ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη και την ταξινόμηση αζωτοδεσμευτικών οργανισμών χωρίς αυτοί να χρειάζεται να καλλιεργηθούν. Μελέτες σε σχέση με την ποικιλότητα του *nifH* στο έδαφος, αποκαλύπτουν αλληλουχίες οι οποίες αντιστοιχούν σε διάφορους μη αναγνωρισμένους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς. Έρευνες έχουν δείξει ότι, μεγαλύτερο ποσοστό αποτελούν οι μη καλλιεργήσιμοι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί - κυρίαρχοι οργανισμοί δέσμευσης εδαφικού αζώτου - έναντι των καλλιεργήσιμων (Poly *et al.*, 2001, Zehr *et al.*, 2003 Sarita *et al.*, 2008).

Τα καλλιεργήσιμα βακτήρια, με εξαίρεση την κοινή παρουσία των γονιδίων *nif*, επιδεικνύουν γενετική ποικιλότητα, απεικονίζοντας έτσι το μεγάλο εύρος των οικοσυστημάτων, όπου εντοπίζονται. Τα κυριότερα γνωρίσματα της ποικιλόμορφης φύσης, των περισσότερων γενών αζωτοδεσμευτικών οργανισμών ελεύθερης διαβίωσης, παρουσιάζονται παρακάτω μαζί με ενδείξεις για ευεργετικές επιδράσεις που πιθανώς να παρουσιάζουν ως βιολιπάσματα.

### 1.3.1.1 *Azospirillum*

Κατόπιν εκτεταμένης έρευνας της Johanna Döbereiner, στα μέσα της δεκαετίας του '70, θεωρείτο ότι έγινε η αποκαλούμενη «ανακάλυψη εκ νέου» (“rediscovery”), του γένους *Spirillum*. Κατόπιν έρευνας των Tarrand και συν. (1978), στην οποία συμμετείχε και η Döbereiner, το γένος μετονομάστηκε σε *Azospirillum* (Hartmann & Baldani, 2006, Schmid & Hartmann, 2007). Για πολλά χρόνια, λόγω έλλειψης κατάλληλων μεθόδων και τεχνογνωσιών, τα στελέχη που είχαν απομονωθεί δεν έτυχαν προσοχής. Έπειτα από την ανακάλυψη της συσχέτισης τέτοιου τύπου βακτηρίων και της ρίζας, το επιστημονικό ενδιαφέρον αναζωπυρώθηκε και οδήγησε σε εκτεταμένες ταξινομικές μελέτες. Η πρώτη απομόνωση και παρατήρηση βακτηρίων του γένους *Azospirillum*, σημειώνεται το 1992 από τον Ολλανδό μικροβιολόγο M. Beijerinck (Baldani *et al.*, 2005).

Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί 13 είδη του γένους *Azospirillum* τα οποία αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1.3).

ΓΕΝΟΣ	ΕΙΔΗ
<i>Azospirillum</i>	<i>A. brasilense</i>
	<i>A. lipoferum</i> (Tarrand <i>et al.</i> , 1978)
	<i>A. oryzae</i> (Xie & Yokota, 2005a)
	<i>A. amazonense</i> (Megalhaes <i>et al.</i> , 1983)
	<i>A. halopraeferens</i> (Reinhold <i>et al.</i> , 1987)
	<i>A. irakense</i> (Khammas <i>et al.</i> , 1989)
	<i>A. largimobile</i> (Sly & Stackebrandt, 1999)
	<i>A. doebereineriae</i> (Eckert <i>et al.</i> , 2001)
	<i>A. melinis</i> (Peng <i>et al.</i> , 2006)
	<i>A. canadense</i> (Mehnaz <i>et al.</i> , 2007a)
	<i>A. zaeae</i> (Mehnaz <i>et al.</i> , 2007)
	<i>A. rugosum</i> (Young <i>et al.</i> , 2008)
	<i>A. picis</i> (Lin <i>et al.</i> , 2009)

**Πίνακας 1.3.** Είδη του γένους *Azospirillum*

Τα βακτήρια του γένους *Azospirillum*, ανήκουν στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων, είναι κατά Gram<sup>-</sup>, ελεύθερης διαβίωσης αζωτοδεσμευτικά βακτήρια ριζόσφαιρας. Είναι αερόβιοι, ετερότροφοι οργανισμοί, οι οποίοι δεσμεύουν άζωτο υπό μικροαρόφιλες συνθήκες. Πρόκειται για ραβδόμορφα, ελαφρώς κυρτά ή ευθέα, μεγέθους 0,6-1,7 x 2,1-3,8 μm, τα οποία συχνά έχουν οξείες άκρες.

Σε μη ευνοϊκά περιβάλλοντα, όπως έλλειψη υγρασίας και θρεπτικών συστατικών, αναπτύσσουν ενδοκυτταρικά, κόκκους με β-πολυ-υδροξυβουτυρικό οξύ. Είναι κινητά σε υγρές καλλιέργειες και φέρουν μονό μαστίγιο. Σε στερεά υποστρώματα και θερμοκρασία 30 °C παρατηρούνται αρκετά πλάγια μαστίγια μικρότερου μήκους. Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, ορισμένα στελέχη μπορεί να μετατρέπουν νιτρικά σε νιτρώδη ή σε οξειδίο του αζώτου και αέριο άζωτο. Οι άριστες θερμοκρασιακές και pHμετρικές τιμές ανάπτυξης, κυμαίνονται από 33 έως 41 °C και από 5,5 έως 7,5, αντίστοιχα.

Σε καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα BMSA<sup>2</sup>, θερμοκρασία 33-35 °C, από μία έως δύο εβδομάδες, οι αποικίες των *A. brasilense* και *A. lipoferum* έχουν ροζ χρώμα, είναι αδιαφανείς με ακανόνιστο ή στρογγυλό σχήμα και συχνά παρατηρούνται πτυχές. Ο χρωματισμός στο BMSA είναι καλύτερος όταν η καλλιέργεια γίνεται παρουσία φωτός. Οι αποικίες ορισμένων στελεχών του *A. brasilense* έχουν σκούρο ρόδινο χρώμα, το οποίο αποδίδεται στο σχηματισμό καροτενοειδών που πραγματοποιείται σε αερόβιες συνθήκες και ίσως σχετίζεται με την προστασία της νιτρογενάσης από την οξειδωση. Σε άλλα είδη δεν παρατηρείται κανένας χρωματισμός (Baldani *et al.*, 2005, Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Το *A. brasilense* φέρει και εναλλακτική νιτρογενάση (Betancourt *et al.*, 2008).

Γενικά, μεταβολίζουν με την ίδια ευκολία τόσο πηγές άνθρακα όσο και αζώτου, γεγονός το οποίο, τα καθιστά ιδιαίτερος προσαρμοσμένα στα ανταγωνιστικά περιβάλλοντα των ριζοσφαιρών.

Στελέχη του γένους *Azospirillum* (α-Proteobacteria), απαντώνται στη ριζόσφαιρα ορισμένων φυτών και προάγουν την ανάπτυξή τους. Είναι ευρέως διαδεδομένα στο εδαφικό υπόστρωμα και έχουν απομονωθεί από πολλά είδη φυτών, που περιλαμβάνουν αγρωστώδη έως κακτοειδή (Hatmann & Baldani, 2006).

<sup>2</sup> **BMS agar:** 200g κόνδυλοι πατάτας, 2,5 g L-μηλικό οξύ, 2,0g KOH, 2,6g ακατέργαστη ζάχαρη, διάλυμα βιταμινών (0,01g βιοτίνη, 0,02g πυριδοξίνη, 1000ml αποσταγμένο νερό), 1 ml Bromothymol Blue (0,5% αλκοολικό διάλυμα) 15g άγαρ (pH: 7,0) (Baldani *et al.*, 2005).

Αναπτύσσονται τόσο σε τροπικά όσο και σε εύκρατα κλίματα, σε συνθήκες τόσο συμβατικής καλλιέργειας όσο και σε θερμοκήπια (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Τα βακτήρια του γένους *Azospirillum* είναι διαδεδομένα σε όλη την υφήλιο και εντοπίζονται σε υψηλούς πληθυσμούς (μέχρι  $10^7/g$ ) στη ριζόσφαιρα.

Τόσο το *A. brasilense* όσο και το *A. lipoferum*, μπορεί να απομονωθούν από το 30-90% των δειγμάτων εδάφους και ριζόσφαιρας από όλον τον κόσμο (Hartmann & Baldani, 2006).

Εκτός του εδάφους, απαντώνται σε πολλά μέρη του φυτού. Αποικούν κυρίως στην επιφάνεια του ριζικού συστήματος, αλλά ορισμένα στελέχη εισχωρούν στη ρίζα έχοντας ενδοφυτική δράση (Kennedy *et al.*, 2004). Για παράδειγμα, το *A. brasilense* στέλεχος Sp7, εντοπίζεται κυρίως στην επιφάνεια ριζών, ενώ το *A. brasilense* στέλεχος Sp245, παρουσιάζει κυρίως ενδοφυτική δράση σε κύτταρα της επιδερμίδας της ρίζας (Elmerich, 2007).

Λόγω του γεγονότος ότι οι απομονώσεις, οι οποίες είχαν πραγματοποιηθεί τα προηγούμενα έτη, προέρχονταν από τροπικά και υποτροπικά αγρωστώδη, είχε δοθεί η εντύπωση ότι τα βακτήρια αυτά αποικούν μόνο στα αγρωστώδη φυτά.

Έρευνες ανέτρεψαν την παραπάνω διαπίστωση, αποδεικνύοντας την παρουσία τους και σε άλλα είδη φυτών (μπανάνα, κακτοειδή, σακχαροκάλαμο), καθώς και σε μη στάσιμα νερά λιμνών και σε φυτά που μεγαλώνουν κοντά στην αρκτική περιοχή του Καναδά (Baldani *et al.*, 2005). Τα *A. brasilense* και *A. lipoferum*, είναι ευρέως διαδεδομένα ανά τον κόσμο και έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτά, όπως ψυχανθή και οπωροκηπευτικά. Το *A. lipoferum* είναι το κυρίαρχο είδος σε ρίζες φυτών ρυζιού. Απομονώνεται επίσης, από ρίζες, βλαστούς και φύλλα σακχαροκάλαμου, ενώ το *A. amazonense* μόνο από τις ρίζες και φύλλα του. Τα συγκεκριμένα βακτήρια είναι προαιρετικά αζωτοδεσμευτικά (Kennedy *et al.*, 2004). Το *A. amazonense* έχει απομονωθεί, επίσης, από ρίζες καλαμποκιού, σόργου, ρυζιού, σιταριού και φοινίκων σε περιοχές της Βραζιλίας, της Χαβάης και της Ταϊλάνδης. Το *A. zea* έχει επίσης απομονωθεί από αραβόσιτο (Mehnaz *et al.*, 2007). Το *A. halopraeferens* έχει παρατηρηθεί σε ρίζες του φυτού *Leptochloa fusca* στο Πακιστάν. Το *A. doebereinae* έχει απομονωθεί από το C<sub>4</sub>-αγρωστώδες φυτό *Miscanthus* (Baldani *et al.*, 2005) και το *A. rugosum* απομονώθηκε από έδαφος μολυσμένο με πετρέλαιο (Young *et al.*, 2008).

Το ποσοστό G+C του DNA των βακτηρίων του γένους *Azospirillum*,

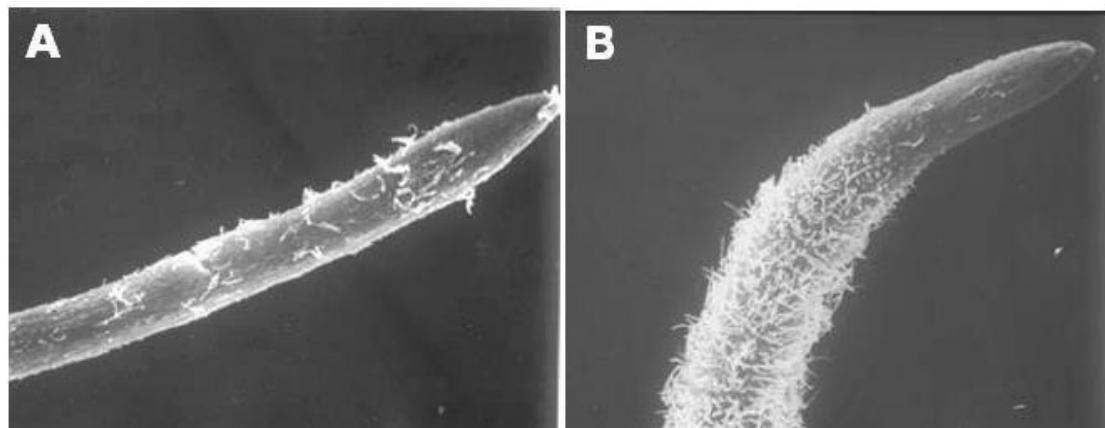
κυμαίνεται από 64 έως 71% (Ben Dekhil *et al.*, 1997). Όλα τα στελέχη *A. brasilense* και *A. lipoferum* φέρουν, τόσο πλασμίδια 90 MDa (p90), τα οποία μοιράζονται σε συντηρημένες περιοχές, όσο και γονίδια που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση της ρίζας με *A. brasilense*. Εν κατακλείδι, το μέγεθος γονιδιώματος των ειδών του γένους *Azospirillum*, εκτιμάται από 4,8 έως 9,7 Mbp, με πολύπλοκη οργάνωση και κατανεμημένες τις γενετικές πληροφορίες σε πολλά πλασμίδια. (Holguin *et al.*, 1999, Martin-Didonet *et al.*, 2000).

Όσον αφορά τις εφαρμογές των βακτηρίων του συγκεκριμένου γένους σε καλλιέργειες, θεωρούνται κατάλληλα ως βιολιπάσματα. Βιολιπάσματα ονομάζονται τα υλικά τα οποία περιέχουν ζωντανούς οργανισμούς οι οποίοι, όταν εφαρμόζονται σε σπέρματα, επιφάνειες φυτών ή στο έδαφος, αποικίζουν το συγκεκριμένο φυτό και προωθούν την ανάπτυξή του, αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών. Αναφέρονται συχνά μελέτες εμβολιασμού του *Azospirillum*, κυρίως σε σιτηρά, με αποτέλεσμα την προώθηση της ανάπτυξής τους. Μάλιστα, κυκλοφορεί και εμπορικό σκεύασμα το οποίο περιέχει *A. lipoferum* με την ονομασία Azogreen-m (Mehnaz & Lazarovits, 2006). Βάσει πολλών δημοσιεύσεων, συμπεραίνεται ότι εμβολιασμός διαφόρων φυτών με *Azospirillum* έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης από 5-30% στο 60-70% των πειραμάτων. Επιπροσθέτως, εμβολιασμός καλλιέργειας ψυχανθών με *Azospirillum* συγχρόνως με *Rhizobium*, απέδωσε αύξηση κατά 15-30% από αντίστοιχο εμβολιασμό μόνο με το ριζόβιο (Dobbelaere, *et al.*, 2001). Τα πιο ευεργετικά αποτελέσματα παρουσιάστηκαν σε ελαφρά εδάφη με μέτρια λίπανση και σε υδατοκαλλιέργειες. Τα αποτελέσματα σε συνθήκες θερμοκηπίου ήταν καλύτερα από αυτά στον αγρό, αν και ορισμένες μελέτες αντικρούουν αυτά τα στοιχεία (Bashan & Holguin, 1997, Holguin *et al.*, 1999, Kennedy *et al.*, 2004, Dobbelaere & Okon, 2007). Δεν πρέπει να υποτιμηθεί το γεγονός ότι, παρόλο που η συνεισφορά του *Azospirillum* είναι σχετικά μικρή (φτάνει μόλις το 10% των συνολικών αναγκών του σιταριού), πιθανώς να αυξάνει την ικανότητα του φυτού να αφομοιώνει εδαφικό άζωτο (Kennedy *et al.*, 2004).

Παρά την αζωτοδεσμευτική ικανότητά του, ένα εξίσου σημαντικό πλεονέκτημα του γένους *Azospirillum* αποτελεί η βελτίωση της απόδοσης σε πολλά φυτά, η οποία αποδίδεται κυρίως στην αύξηση του ριζικού συστήματος λόγω παραγωγής αυξινών και συνεπακόλουθα, αυξημένους ρυθμούς απορρόφησης νερού και θρεπτικών συστατικών (Tilak *et al.*, 2005).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι έπειτα από εμβολιασμό του φυτού με

*Azospirillum*, παρατηρείται αλλαγή στη μορφολογία της ρίζας, η οποία αποδίδεται στην παραγωγή ρυθμιστών ανάπτυξης, από το βακτήριο (Dobbelaere & Okon, 2007). Η αύξηση των πλάγιων ριζών και των ριζικών τριχιδίων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της επιφάνειας της ρίζας και επομένως αύξηση της απορρόφησης θρεπτικών συστατικών (σχήμα 1.8).



**Σχήμα 1.8.** Φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Μορφολογία ριζικού τριχιδίου τομάτας 48h μετά από εμβολιασμό με *A. brasilense* A. Μάρτυρας χωρίς εμβολιασμό B. Εμβολιασμός με 108cfu/ml (Dobbelaere & Okon, 2007).

Σε εργαστηριακές καλλιέργειες του βακτηρίου εντοπίζονται τρεις τύποι ρυθμιστών ανάπτυξης: αυξίνες, κυτοκινίνες και γιβερελλίνες. Η αυξίνη ινδολοξικό οξύ, παράγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με τις άλλες αυξίνες. Η παραγωγή της πραγματοποιείται μέσω τριών βιοσυνθετικών μονοπατιών, εκ των οποίων μόνο το ένα είναι ανεξάρτητο από την τρυπτοφάνη (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Ο μηχανισμός της αζωτοδέσμευσης ίσως πρέπει να θεωρηθεί ότι έχει περισσότερο καταλυτικό ρόλο στην ανάπτυξη του φυτού παρά ότι αποτελεί την κύρια πηγή αζώτου (Kennedy *et al.*, 2004).

Ολοκληρώνοντας, αξίζει να σημειωθεί ότι ο εμβολιασμός φυτών με *Azospirillum* μπορεί να συμβάλει στη διασυστηματική προστασία των φυτών έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων και ιών. Σε δοκιμές, που πραγματοποιήθηκαν με φυτά ρυζιού, περιόρισε την προσβολή του βακτηρίου *Xanthomonas oryzae*, αυξάνοντας την παραγωγή σημαντικά. Στο βαμβάκι παρατηρήθηκε παραγωγή ρυθμιστών ανάπτυξης, αντιμυκητιακών, αντιβακτηριακών και σιδηροφόρων ενώσεων (Kennedy *et al.*, 2004).

Τέλος, τα βακτήρια *Azospirillum* έχουν την ικανότητα να ενισχύσουν την αποκατάσταση μολυσμένων υδάτων από μικροάλγες, βοηθώντας τον



πολλαπλασιασμό και τον καταβολισμό των αλγών. Ακόμα, μπορούν να ενισχύσουν την αναδάσωση συγκεκριμένων παράκτιων τροπικών δέντρων (*Avicennia sp*), να αποτρέψουν τη διάβρωση ερημοποιημένων περιοχών και να προωθήσουν την επαναβλάστησή τους (Bashan Y., Environmental applications for *Azospirillum sp.*, <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/envirionapp.pdf>).

Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα διαφοροποιητικά χαρακτηριστικά του γένους *Azospirillum*, εν συγκρίσει με γένη άλλων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (πίνακας 1.4) (Baldani *et al.*, 2005).

Οργανισμός/ Χαρακτηριστικά	<i>Azospirillum</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	<i>Beijerinckia</i>
Σχήμα κυττάρου: Καμπυλωτό Ελικοειδές	+ _2	- +	- +	- -	- -	_1 -
Διάμετρος κυττάρου (μm)	0,6-1,7	0,8-1,0	0,2-0,4	0,5-0,6	0,4-0,8	0,5-1,5
Κινητικότητα	+	+	+	+	_3	Δ
Επικρατών τύπος μαστιγίων	ΜΠ,Π	ΔΠΘ	ΔΠ	ΠΤ,Π	Δ	ΠΤ
Δραστηριότητα νιτρογενάσης	+	+	+	+	+	+
Δέσμευση αζώτου μόνο υπό μικροαρόφιλες συνθήκες	+	+	+	+	+	-
Αζωτοδέσμευση προς όφελος φυτών	+	-	-	+	+	-
Φυτοαυτότροφα	-	+	-	-	-	-

Παραγόμενες βλαστικές ή ριζικές υπερτροφίες	-	-	-	+	-	-
% mol G+C του DNA	64-71	64-64	65	66-68	65-70	55-61

**Πίνακας 1.4.** Διαφοροποιητικά χαρακτηριστικά του γένους *Azospirillum* σε σχέση με γένη άλλων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων.

Σύμβολα:       +: συνήθως θετικό  
 -: συνήθως αρνητικό  
 Δ: διαφέρει ανάμεσα στα είδη  
 ΜΠ: μονοπολικό μαστίγιο  
 ΔΠ: διπολικό μαστίγιο  
 ΔΠΘ: διπολικός θύσανος  
 ΠΤ: περιτρίχιο  
 Π: πλευρικά μαστίγια

Το *Beijerinckia* μπορεί να έχει ίσιο, ελαφρώς καμπυλωτό σχήμα ή σχήμα απιδιού.  
 Ενδέχεται να παρατηρούνται ορισμένα ελικοειδή κύτταρα  
 Η κινητικότητα εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης (υπόστρωμα, ηλικία)

### 1.3.1.2 *Pseudomonas*

Το γένος των ψευδομονάδων αποτελεί την πλέον ποικιλόμορφη και οικολογικά σημαντική, ομάδα βακτηρίων στον πλανήτη (Spiers *et al.*, 2000). Μορφολογικά, οι ψευδομονάδες περιγράφονται ως Gram αρνητικά βακτήρια, τα οποία δεν παράγουν σπόρια, κινούνται με μια ή περισσότερες πολικές βλεφαρίδες και έχουν σώμα ευθύ ή ελαφρά κεκαμμένο (Αρσένη 1996). Τα χαρακτηριστικά αυτά όμως, είναι κοινά γνωρίσματα πολλών βακτηρίων και δεν αποτελούν ιδιαίτερα κριτήρια στην απομόνωση και ταυτοποίηση των ψευδομονάδων.

Τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* απαντώνται σε όλα τα περιβαλλοντικά διαμερίσματα (έδαφος, νερό, θάλασσα) και δημιουργούν άμεσους συνδέσμους με φυτά και ζώα. Η παγκόσμια κατανομή των ψευδομονάδων υποδεικνύει προσαρμοστικότητα, όσον αφορά τη φυσιολογία και τη γενετική αυτών, σε αρκετά μεγάλο βαθμό (Spiers *et al.*, 2000). Η προσαρμοστικότητά τους οφείλεται στις λιγιστές διατροφικές απαιτήσεις, το μεγάλο αριθμό οργανικών ενώσεων που μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως πηγή ενέργειας και την ποικιλότητα στο μεταβολισμό τους, που εκτείνεται από αυτοτροφία έως λιθοτροφία (Todar 2004a). Ως επακόλουθο, οι ψευδομονάδες επικρατούν στο χώμα και στο νερό υπό αερόβιες, μεσόφιλες και ουδέτερες συνθήκες. Οι συνθήκες του εδάφους που ευνοούν την

ανάπτυξή τους, είναι ευνοϊκές και για την ανάπτυξη ακτινομυκήτων του γένους *Streptomyces*. Οι στρεπτομύκητες αποικοδομούν τα οργανικά σύμπλοκα και προσφέρουν στις ψευδομονάδες τα οργανικά μονομερή που χρειάζονται ως πηγή άνθρακα. Η παραπάνω συμβίωση, μπορεί ίσως να αποτελέσει μια πιθανή εξήγηση της ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν οι ψευδομονάδες στα αντιβιοτικά των στρεπτομυκήτων. Συχνά, ορισμένα στελέχη *Pseudomonas* παρουσιάζουν ανθεκτικότητα εκτός από τα αντιβιοτικά, σε βαρέα μέταλλα, οργανικούς διαλύτες απορρυπαντικά και άλλες ουσίες (Moore *et al.*, 2006).

Ψευδομονάδες έχουν απομονωθεί από αρκετά, διαφορετικού τύπου περιβάλλοντα: χώμα (Amy *et al.*, 1992, Sørensen *et al.*, 1992, Haase *et al.*, 1995a,) νερό (Bankrouf *et al.*, 1988, Elomari *et al.*, 1995, Morais *et al.*, 1997), φυτά (Clerc *et al.*, 1998), λύματα (Geuenich & Muller, 1984, Sallal *et al.*, 1989) και από τον πεπτικό σωλήνα ανθρώπων και κατοικίδιων ζώων (Rhame, 1980).

Σύμφωνα με την ταξινόμηση της Bergey (Palleroni, 1984), οι ψευδομονάδες ανήκουν στην οικογένεια των Pseudomonadaceae. Στην ίδια οικογένεια ανήκουν και τα γένη *Xanthomonas*, *Flateuria* και *Zoogloea*. Το γένος *Pseudomonas* αποτελείται από τουλάχιστον 183 είδη (Euzéby, 1996). Τα κοινά χαρακτηριστικά των παραπάνω γενών είναι κυρίως ο αερόβιος μεταβολισμός, η έλλειψη ικανότητας ζύμωσης, η απουσία φωτοσυνθετικής ικανότητας και η ικανότητα ανάπτυξης σε διάφορα οργανικά υποστρώματα.

Ο Palleroni (1973) ταξινόμησε το γένος των ψευδομονάδων, όπως αυτό είχε προταθεί από τον Migula (1894), με βάση την ομολογία του ριβοσωμικού RNA σε πέντε ομάδες, τα “RNA homology groups” (πίνακας 1.5).

RNA homology groups	Είδη ψευδομονάδων
I	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> (several biovars), <i>P. putida</i> , <i>P. chlororaphis</i> , <i>P. syringae</i> (many pathovars), <i>P. cichorii</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. alcaligenes</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>P. agarici</i> , <i>P. angulata</i> , <i>P. fragi</i> , <i>P. synxantha</i> , <i>P. taetrolens</i> , <i>P. mucidolens</i> , <i>P. oleovorans</i> , <i>P. resinovorans</i>

II	<i>P. cepacia</i> , <i>P. gladioli</i> , <i>P. caryophylli</i> , <i>P. pseudomallei</i> , <i>P. mallei</i> , <i>P. solanacearum</i> , <i>P. pickettii</i> , <i>P. pyrrocinia</i> , <i>P. andropogonis</i>
III	<i>P. (Comamonas) acidovorans</i> , <i>P. (Comamonas) testosteroni</i> , <i>P. saccharophila</i> , <i>P. facilis</i> , <i>P. delafieldii</i> , <i>P. alboprecipitans</i> , <i>P. palleronii</i>
IV	<i>P. diminuta</i> , <i>P. vesicularis</i>
V	<i>Xanthomonas</i> spp., περιλαμβάνει <i>X. (Pseudomonas) maltophilia</i> , <i>P. geniculata</i> , <i>P. gardneri</i>

**Πίνακας 1.5.** Ταξινόμηση των ψευδομονάδων σε πέντε ομάδες με βάση την ομολογία του ριβοσωμικού RNA (Palleroni *et al.*, 1973).

Η φυλογενετική απόσταση μεταξύ των πέντε ομάδων καθορίστηκε αργότερα με περισσότερη ακρίβεια, με τη χρήση πιο εξελιγμένων μεθόδων, όπως ο υβριδισμός rRNA:DNA (DeVos & DeLey, 1983, DeVos *et al.*, 1985, 1989) και ο προσδιορισμός της ακολουθίας (sequencing) της 16S rRNA μονάδας αντιπροσωπευτικών στελεχών (Woese 1987, Vandamme *et al.*, 1996). Επακόλουθο των ευρημάτων των παραπάνω ερευνών, ήταν η ανακατάταξη στην ταξινόμηση και την ονοματολογία των ψευδομονάδων λόγω του υψηλού βαθμού ποικιλομορφίας που βρέθηκε στα μέλη του γένους. Στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 1.6), παρουσιάζεται τη σύγχρονη ταξινόμηση των ψευδομονάδων.

Σύγχρονη ταξινόμηση του γένους <i>Pseudomonas</i>	
Γένη	Είδη
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	<i>P. agarici</i>
	<i>P. alcaligenes</i>
	<i>P. asplenii</i>
	<i>P. aureofaciens</i>
	<i>P. cichorii</i>

<i>Burkholderia</i>	<i>P. chloraphis</i>
	<i>P. fluorescens</i>
	<i>P. mendocina</i>
	<i>P. pseudoalcaligenes</i>
	<i>P. putida</i>
	<i>P. stutzeri</i>
	<i>P. syringae</i>
<i>Comamonas</i>	<i>P. viridiflava</i>
	<i>B. caryophylli</i>
	<i>B. cepacia</i>
	<i>B. gladioli</i>
	<i>B. mallei</i>
	<i>B. pickettii</i>
	<i>B. pseudomallei</i>
<i>Hydrogenophaga</i>	<i>B. solanacearum</i>
	<i>C. acidovorans</i>
<i>Brevundimonas</i>	<i>C. testosteroni</i>
	<i>H. facilis</i>
	<i>H. flava</i>
	<i>H. palleronii</i>
	<i>H. pseudoflava</i>
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>H. saccharophila</i>
	<i>B. diminuta</i>
	<i>B. vesicularis</i>
	<i>S. maltophilia</i>

Πίνακας 1.6. Σύγχρονη ταξινόμηση των ψευδομονάδων. Γένη και είδη

Το γένος *Pseudomonas* έχει πλέον περιορισθεί στο rRNA I group, που ανήκει στην γ-υποκλάση των Πρωτεοβακτηρίων και περιλαμβάνει 30 είδη ψευδομονάδων - «αληθινές» ψευδομονάδες (δηλαδή *Pseudomonas sensu stricto*) (Moore *et al.*, 2006), οι οποίες εμφανίζουν γονοτυπικές και φαινοτυπικές ομοιότητες με το τυπικό είδος του γένους *P. aeruginosa* (Moore *et al.*, 1996).

Η πλειονότητα των rRNA group II ψευδομονάδων, ανήκει στη β-υποκλάση των Πρωτεοβακτηρίων και μεταφέρθηκε στα νέα γένη *Burkholderia*, με τυπικό είδος την *B. ceparacia* (Yabuuchi *et al.*, 1992) και *Ralstonia*, με τυπικό είδος την *R. pikettii* (Yabuuchi *et al.*, 1995). Το γένος *Burkholderia* αποτελείται κυρίως από παθογόνα είδη φυτών και ζώων (Palleroni *et al.*, 1984). Ένα από τα σημαντικότερα μέλη του, η *B. ceparacia*, είναι παθογόνος φυτών και ζώων και ένα από τα πλέον ευπροσάρμοστα είδη, όσον αφορά τις διατροφικές ιδιότητες. Άλλα δύο είδη είναι η *B. pseudomallei* και η *B. mallei*.

Το rRNA group III, που επίσης ανήκει στην κλάση των β- Πρωτεοβακτηρίων, μετονομάστηκε σε οικογένεια Comamonadaceae (Willems *et al.*, 1991), η οποία περιλαμβάνει τα γένη *Acidovorax*, *Comamonas*, και *Hydrogenophaga*. Μέλη της οικογένειας Comamonadaceae, χρησιμοποιούν πολύ λίγους υδατάνθρακες ως πηγή ενέργειας, αλλά μπορούν να αναπτυχθούν σε διάφορα οργανικά οξέα και αμινοξέα (Willems *et al.*, 1991). Το τυπικό γένος *Comamonas*, περιέχει ως τυπικό είδος το *C. terrigena* καθώς και τα *C. acidovorans* και *C. testosteroni*, είδη αρκετά διαφοροποιημένα από τα άλλα μέλη της οικογένειας των ψευδομονάδων. Το γένος *Hydrogenofaga*, περιλαμβάνει ψευδομονάδες που παράγουν κίτρινη χρωστική και οξειδώνουν το υδρογόνο (Willems, 1989), ενώ το γένος *Acidovorax* αποτελείται από μερικά κλινικά στελέχη και αρκετά φυτοπαθογόνα (Willems *et al.*, 1990).

Οι ψευδομονάδες του rRNA group IV (*P. diminuta* και *P. vesicularis*), ανήκουν στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων και μεταφέρθηκαν στο νέο γένος *Brevundimonas* (Segers *et al.*, 1994), ενώ οι ψευδομονάδες του V rRNA group, πρώτα μεταφέρθηκαν στο γένος *Xanthomonas* (Swings *et al.*, 1983) και αργότερα στο νέο γένος *Stenotrophomonas* (Palleroni & Bradbury, 1993). Το γένος *Brevundimonas* (*B. diminuta* και *B. vesicularis*) μπορεί να διακριθεί από τις άλλες ψευδομονάδες, μέσω των βιοχημικών του χαρακτηριστικών (διατροφικές ιδιότητες και αντοχή σε οξέα) και τη σύνθεση των βάσεων του DNA (Kerstens *et al.*, 1996). Το γένος *Stenotrophomonas* περιλαμβάνει φυτοπαθογόνα είδη και την *S. maltophilia*, η οποία μπορεί να επιβιώνει σαπροφυτικά σε διάφορα φυσικά περιβάλλοντα, ενώ έχει απομονωθεί και από κλινικά δείγματα.

Το γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνει φθορίζοντα είδη (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*) και μη-φθορίζοντα είδη (*P. stutzeri*, *P. mendocina*). Τα περισσότερα είναι σαπροφυτικά (*P. fluorescens*) ή φυτοπαθογόνα (Kerstens *et al.*, 1996). Η *P. aeruginosa* είναι το τυπικό είδος του γένους. Είναι το είδος που έχει αποτελέσει

αντικείμενο πληθώρας ερευνών και το γονιδίωμά του έχει πλέον χαρτογραφηθεί (Stover *et al.*, 2000). Η *P. fluorescens* είναι ετερογενές είδος που μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω, βάσει διαφόρων ταξινομικών χαρακτηριστικών σε υποείδη, γνωστά ως βιότυποι (biotypes ή biovars). Λεπτομερείς φαινοτυπικές, χημειοταξινομικές και γονοτυπικές έρευνες, υποδεικνύουν ότι τα είδη *P. fluorescens*, *P. marginalis*, *P. putida*, *P. stanieri* και *P. stutzeri* είναι ιδιαίτερος ετερογενή (Vancanneyt *et al.*, 1996).

Ένα από τα προαναφερθέντα είδη του γένους *Pseudomonas* που παρουσιάζει περιβαλλοντική σημασία, λόγω της ικανότητάς του να αζωτοδεσμεύει, είναι το απονιτροποιητικό βακτήριο *Pseudomonas stutzeri* (μοναδικό είδος του γένους με αυτή τη ιδιότητα). Για πρώτη φορά οι Krotzky και Warner (1987), διαπίστωσαν ότι το *P. stutzeri* μπορεί να δεσμεύει ατμοσφαιρικό άζωτο. Η πρώτη απομόνωση του στελέχους *P. stutzeri*, πραγματοποιήθηκε από τους Burri και Stutzer (1895), ως *Bacillus denitrificans* II και ονομάστηκε *P. stutzeri* από τους Van Niel και Allen (1952). Η μορφολογία της αποικίας του είναι ασυνήθιστη, διότι είναι πτυχωτή, ξηρή και ιδιαίτερος συνεκτική (Rius *et al.*, 2001). Έχει περιγραφεί είτε ως κοραλλοειδής κατασκευή, είτε ως κρατήρας με ραβδώσεις οι οποίες διακλαδίζονται και ενώνονται (σχήμα 1.9). Όσον αφορά τη μορφολογία της αποικίας του συγκεκριμένου στελέχους, αξίζει να σημειωθεί ότι δεν είναι κοινή και αμετάβλητη σε όλες τις περιπτώσεις. Υπό εργαστηριακές συνθήκες, κι έπειτα από ανακαλλιέργειες, οι αποικίες παρουσιάζονται ομαλές, λιγότερο συνεκτικές και με πιο ωχρο χρώμα.



**Σχήμα 1.9.** Μορφολογία αποικίας *Pseudomonas stutzeri* (Lalucat *et al.*, 2006).

Το *P. stutzeri* είναι κατά Gram<sup>-</sup> βακτήριο, ραβδόμορφο και κινητό, μέσω μονού πολικού μαστιγίου. Διαθέτει τριχίδια IV, τα οποία πιστεύεται ότι συμμετέχουν στην κινητικότητα του βακτηρίου. Η θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι 4-45°C, με βέλτιστη θερμοκρασία στους 35°C. Το περιεχόμενο των G+C των στελεχών κυμαίνεται από 60,7%-66,3%. Τα βακτήρια *P. stutzeri* χωρίζονται σε δύο ομάδες, οι οποίες περιλαμβάνουν: α) στελέχη με G+C κοντά στο 62% που δεν ανέχονται θερμοκρασία 43°C και άνω, και β) στελέχη με G+C 65-66% που αντέχουν σε θερμοκρασίες 43°C και άνω. Το γονιδίωμα αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα, το οποίο εκτιμάται ότι έχει μέγεθος από 3,75-4,64 Mb και έως τέσσερα πλασμίδια (Lalucat *et al.*, 2006). Είναι ευρέως διαδεδομένο, απαντάται κυρίως, σε

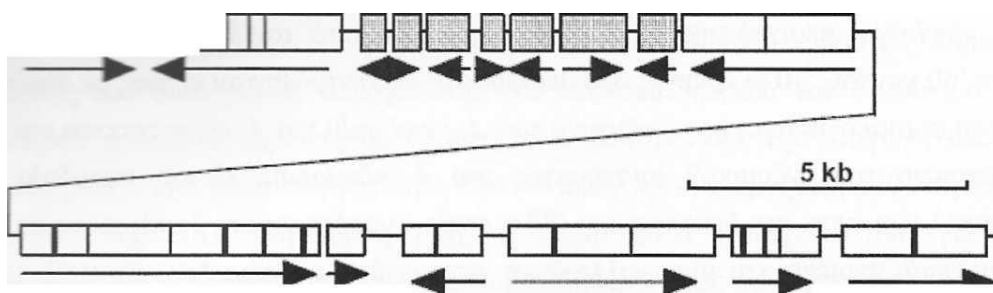
εδάφη και νερά, ενώ ορισμένα στελέχη έχουν απομονωθεί από κλινικά δείγματα (Rius *et al.*, 2001).

Ταξινομικά, το είδος *P. stutzeri* χωρίζεται σε 18 genomovar μέσω DNA – DNA υβριδισμού, RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA –PCR) και αναλύσεων αλληλουχιών που κωδικοποιούν για το γονίδιο 16S (Sikorski *et al.*, 2005). Ο όρος genomovar καθιερώθηκε για πρώτη φορά για το *P. stutzeri* και χρησιμοποιείται για στελέχη τα οποία παρουσιάζουν γενετική απόκλιση αλλά έχουν φαινοτυπικές ομοιότητες. Αντίστροφα, όταν ένα στέλεχος έχει όμοια γενετική σύσταση αλλά διαφορετικό φαινότυπο από ένα ορισμένο είδος, τότε αποτελεί υποείδος του (Lalucat *et al.*, 2006).

Ορισμένα είδη στα οποία αποδίδεται η ιδιότητα της αζωτοδέσμευσης και ανήκαν στο γένος *Pseudomonas*, έχουν μεταφερθεί σε γένη των α- και β-Πρωτεοβακτηρίων (“*Pseudomonas paucimobilis*”, “*P. diazotrophicus*”, “*P. saccharophila*” και άλλα). Το *P. azotofigens* αναφέρεται ως αζωτοδεσμευτικό αλλά αντιπροσωπεύεται μόνο από ένα στέλεχος. Το στέλεχος *P. stutzeri* A15 (πρωτότερα γνωστό ως *Alcaligenes faecalis*) αποτελεί μοντέλο για τη μελέτη της αζωτοδέσμευσης και ανήκει στο genomovar I. Έχει απομονωθεί από φυτά ρυζιού στα οποία αναπτύσσεται ενδοφυτικά και έχει διαπιστωθεί ότι προάγει την ανάπτυξή τους, δεσμεύοντας άζωτο (Lalucat *et al.*, 2006). Επίσης, διαθέτει τρεις διαφορετικές αναγωγάσες νιτρικών οι οποίες καθιστούν δυνατή την μετατροπή νιτρικών σε νιτρώδη, μέσω τριών ξεχωριστών φυσιολογικών διαδικασιών: α) αφομοίωση νιτρικών, β) αναπνοή μέσω νιτρικών και γ) απελευθέρωση νιτρικών. Πιθανώς, στην περίπτωση του *P. Stutzeri* A15, όπως και σε αυτήν των βακτηρίων *Rhizobium*, η αναγωγή νιτρικών να προωθεί την αζωτοδέσμευση διότι η παρουσία νιτρικών έχει ανασταλτική δράση προς αυτήν (Rediers *et al.*, 2007). Άλλα στελέχη του *P. stutzeri* έχουν απομονωθεί από ρίζες σόργου, σιτάρι, ριζόσφαιρα κάπαρης (*Capparis spinosa*) και από εδαφικά δείγματα (Lalucat *et al.*, 2006, Yan *et al.*, 2008). Σε γενικές γραμμές, τα στελέχη του *P. stutzeri* αναπτύσσονται ικανοποιητικά, παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Ωστόσο, προκειμένου να αζωτοδεσμεύσουν απαιτούνται μικροαερόφιλες συνθήκες (Lalucat *et al.*, 2006).

Στο *P. stutzeri* A15 μία περιοχή 30 kb περιέχει τα οπερόνια *nif* και τα γειτονικά προς αυτή γονίδια (σχήμα 1.10).





### *Pseudomonas stutzeri* A1501

**Σχήμα 1.10.** Οργάνωση των γονιδίων *nif* και σχετικών γονιδίων του *P. stutzeri* A1501. Τα οριζόντια βέλη υποδεικνύουν τη διεύθυνση της μεταγραφής. Τα σκιασμένα ορθογώνια υποδεικνύουν γονίδια τα οποία δε σχετίζονται με την αζωτοδέσμευση. Τα νούμερα αντιστοιχούν σε μη ταυτοποιημένα αναγνωστικά πλαίσια (Pedrosa & Elmerich, 2007).

Σε αυτήν την περιοχή έχουν εντοπιστεί 37 ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια. Όπως και σε άλλα γ-Πρωτεοβακτήρια, έτσι και στο *P. stutzeri* A15 υπάρχουν τα ρυθμιστικά γονίδια *nifL* και *nifA*. Μεταξύ του *nifLA* και του οπερονίου *nifHDK* περιλαμβάνεται μία ομάδα γονιδίων *rnfABCDGEH*, τα οποία αρχικά έχουν αναγνωρισθεί στο *Rhodobacter capsulatus*. Τα γονίδια αυτά πιθανώς να έχουν ρόλο στη μεταφορά ηλεκτρονίων στη νιτρογενάση αλλά έχουν εντοπιστεί και σε μη αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Η οργάνωση των *nif* και *rnf* γονιδίων είναι παρόμοια με αυτήν του *A. vinelandii*, αν και στο *A. vinelandii* τα *rnf* δεν βρίσκονται κοντά στο *nifHDK* (Pedrosa & Elmerich, 2007). Επίσης, η αμινοξική ακολουθία του οπερονίου *nifHDK* του *P. stutzeri* A15 έχει πολύ υψηλή ομολογία (87-91%) με το αντίστοιχο του *A. vinelandii*. Επιπροσθέτως, η οργάνωση των γονιδίων *nifH* είναι πανομοιότυπη στα 2 αυτά στελέχη, Τα παραπάνω στοιχεία υποδηλώνουν ότι το *A. vinelandii* πιθανώς να ανήκει στο γένος *Pseudomonas sensu stricto* (Rediers *et al.*, 2004).

Το γονιδίωμα του στελέχους *P. stutzeri* A1501 (προέρχεται από το A15) αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα το οποίο έχει μέγεθος 4.567.418 bp και δεν παρατηρείται παρουσία πλασμιδίου. Έχουν εντοπιστεί τέσσερις περιοχές με μη τυπικό ποσοστό G+C, οι οποίες διαθέτουν ένθεν και ένθεν γονίδια που κωδικοποιούν για tRNA. Τα χαρακτηριστικά αυτά, χαρακτηρίζουν τις περιοχές ως γονιδιωματικές νησίδες, οι οποίες πιθανώς να έχουν αποκτηθεί πρόσφατα. Επιπλέον, μία πέμπτη περιοχή με μέγεθος 49 kb και μη τυπικό ποσοστό G+C, περιέχει 59 γονίδια μεταξύ των οποίων και τα γονίδια της αζωτοδέσμευσης (*nif*). Πιθανώς, πρόκειται για νησίδα αζωτοδέσμευσης η οποία αποκτήθηκε μέσω οριζόντιας μεταφοράς και έχει

παρατηρηθεί και σε άλλους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς όπως το *Rhizobium leguminosarum* (Yan *et al.*, 2008). Η άποψη ότι τα γονίδια αζωτοδέσμευσης στο *P. stutzeri* έχουν αποκτηθεί μέσω οριζόντιας μεταφοράς ενισχύεται από τη φυλογένεια του γονιδίου *nifH* (Lalucat *et al.*, 2006).

Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιόσφαιρα, στη διατήρηση της φυσικής ισορροπίας και κατ' επέκταση στην ανθρώπινη οικονομία. Αίτιο της μεγάλης σημασίας τους, είναι ο ρόλος-κλειδί που κρατούν στον κύκλο του άνθρακα. Έχουν την ικανότητα να παράγουν ένζυμα που υπεισέρχονται στον καταβολισμό οργανικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους. Ουσίες όπως αρωματικοί και αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, ακόμα και συνθετικά χημικά γεωργικών και βιομηχανικών δραστηριοτήτων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα οξειδωτικής διάσπασης από τις ψευδομονάδες. Τις μόνες οργανικές ενώσεις που δε μπορούν οι ψευδομονάδες να καταβολίσουν είναι το πολυτετραφθοροαιθυλένιο (teflon), το πολυστυρένιο (styrofoam) και οι μονανθρακικές οργανικές (μεθάνιο, μεθανόλη, φορμαλδεΐδη, και άλλες) (Tobar 2004a).

Στη δεκαετία του 1950 οι βιοχημικοί Hayaishi (Hayaishi *et al.*, 1950) και Mason (Mason *et al.*, 1955), ανακάλυψαν και απομόνωσαν από ψευδομονάδες τις οξυγονάσες, τα υπεύθυνα ένζυμα για την εισαγωγή μοριακού οξυγόνου σε καταβολικές οδούς οργανικών δακτυλίων (Hayaishi, 1996). Έκτοτε, η εξέλιξη ήταν ραγδαία. Επιβεβαιώθηκε ο ρόλος των οξυγονασών στο μεταβολισμό της τρυπτοφάνης, της καμφοράς, του στυρολίου, των ξυλολίων και άλλων αλκυλοβενζολίων. Οι βακτηριακές οξυγονάσες που υπεισέρχονται στην βιομετατροπή μη-πολικών ενώσεων είναι βιομηχανικού και οικονομικού ενδιαφέροντος, γιατί καταλύουν την στερεοειδική προσθήκη του οξυγόνου σε αδρανοποιημένα οργανικά υποστρώματα, μία αντίδραση που παραμένει δύσκολη με την κλασική συνθετική χημεία (Van Beilen *et al.*, 1996). Το βενζόλιο, τολουόλιο, ξυλόλια, αιθυλοβενζόλιο και το στυρόλιο, αποτελούν βιομηχανικά χημικά που παράγονται με ρυθμούς, πάνω από εκατομμύρια τόνους ετησίως. Είναι καύσιμα και διαλύτες που χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες στην παραγωγή πολυμερών, πλαστικών, εκρηκτικών, αγροχημικών και φαρμακευτικών προϊόντων. Η εύρεση οδού βιοαποικοδόμησης αυτών των οργανικών ενώσεων, όχι μόνο είναι σημαντικό μέρος της διαδικασίας απολιθοποίησης στη φύση, αλλά αποτελεί λύση της απομάκρυνσης των επιβαρυντικών ενώσεων από το περιβάλλον, με επακόλουθο την

προστασία του (Galli, 1994). Η οδός της βιοαποικοδόμησης ξεκινά με τη μετατροπή των αρωματικών υδρογονανθράκων σε ο-διφαινόλες πριν τη διάσπαση του δακτυλίου. Τέτοιου είδους αντιδράσεις καταλύονται από τις ψευδομονάδες, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιήσουν τους αρωματικούς δακτυλίους ως την μόνη πηγή άνθρακα (Smith, 1990).

Το γ-εξαχλωροκυκλοεξάνιο (γνωστό με την εμπορική ονομασία lindane), εφαρμοζόταν παγκοσμίως, τα παλιότερα χρόνια, ως εντομοκτόνο. Στην Ελλάδα επιτρέπεται ακόμα η χρήση του σε συγκεκριμένες καλλιέργειες. Ένα μέλος του γένους των ψευδομονάδων (*Shingomonas paucimobilis*) μπορεί να βιοαποικοδομήσει το lindane, μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο την συγκέντρωσή του στο περιβάλλον και τις επακόλουθες τοξικές του συνέπειες, (Senoo & Wada, 1989).

Ολοκληρώνοντας, πέραν των προαναφερθέντων πλεονεκτημάτων, που σχετίζονται με την αζωτοδεσμευτική ικανότητα, την ανθεκτικότητα σε διάφορες ουσίες (όπως αντιβιοτικά) και τη σημασία του ρόλου τους στο οικοσύστημα, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* αποτελούν παθογόνα των φυτών, ζώων και ανθρώπου. Η παθογόνος δράση των στελεχών του γένους, είναι υπεύθυνη για πρόκληση: ωτίτιδας, βακτηριαιμίας, ενδοκαρδίτιδας, λοιμώξεως του αναπνευστικού, κεντρικού νευρικού συστήματος, γαστρεντερικού σωλήνα, ουροποιητικού συστήματος, καθώς και λοιμώξεων δέρματος μαλακών ιστών, οφθαλμών, οστών και συνδέσμων.

### 1.3.1.3 *Paenibacillus* και *Bacillus*

Το γένος *Bacillus* είναι εξαιρετικά ετερογενές και περιλαμβάνει κατά Gram θετικά, αερόβια, ραβδόμορφα, ενδοσποριογονικά βακτήρια.

Τα μέλη του γένους, απαντώνται σε ποικίλα περιβάλλοντα, τόσο στη ριζόσφαιρα και στις ρίζες αγρωστωδών φυτών (Ma *et al.*, 2007), όσο και σε υδροβιότοπους (Parvathi *et al.*, 2009). Πολλά στελέχη έχουν απομονωθεί από ακραία περιβάλλοντα λόγω της ανθεκτικότητάς τους στη UV και γ ακτινοβολία, στο υπεροξειδίο, καθώς και σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Τα σπόρια του βακίλου είναι περισσότερο ανθεκτικά στη UV ακτινοβολία εν συγκρίσει με τα φυτικά κύτταρα, λόγω παρουσίας μικρών, διαλυτών, όξινων πρωτεϊνικών συμπλόκων, τα οποία αντισταθμίζουν τις βλάβες που προκαλούνται στο DNA των βακτηρίων. Οι

βάκιλοι χρησιμοποιώντας ένζυμα, συμπεριλαμβανομένων της καταλάσης και της ρεδουκτάσης, αντιστέκονται στα τοξικά αποτελέσματα του υπεροξειδίου (Gioia *et al.*, 2007).

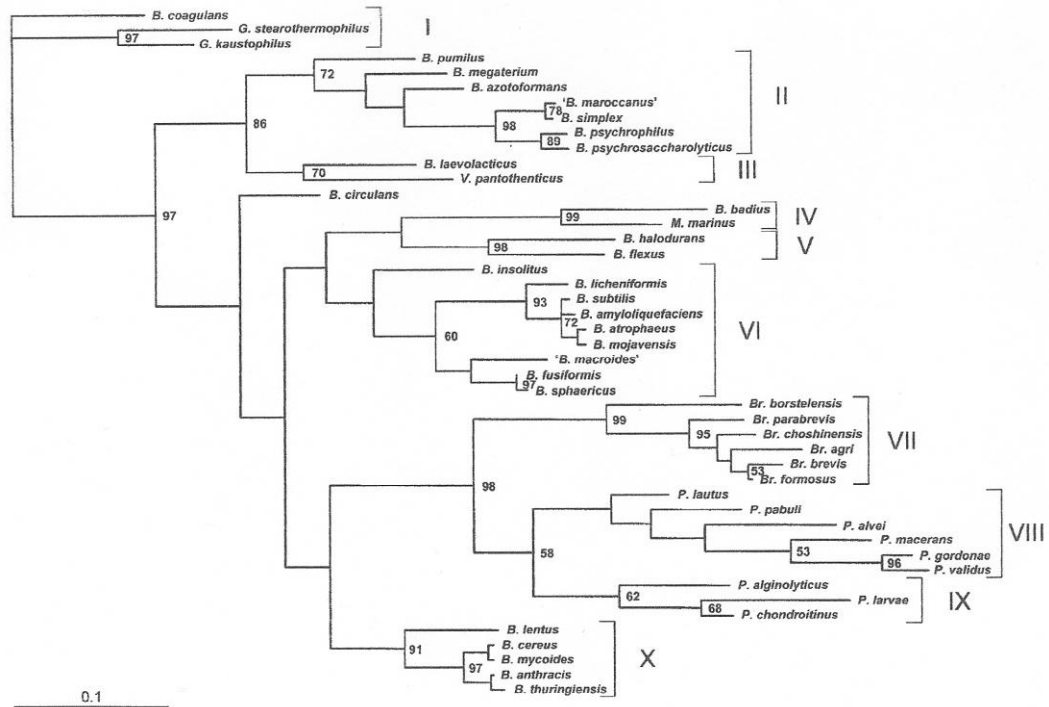
Από μοριακές αναλύσεις του γονιδίου 16S rRNA, έχουν προσδιοριστεί 10 φυλογενετικές ομάδες *Bacillus* (πίνακας 1.7), εκ των οποίων, η μία αποτελεί πλέον το γένος *Paenibacillus* (Shida *et al.*, 1997a). Συνεχώς στο γένος *Bacillus* και *Paenibacillus* προστίθενται νέα είδη. Κατά το 2004 το γένος *Paenibacillus* αριθμούσε πάνω από 50 είδη (<http://www.bacterio.cict.fr/p/paenibacillus>). Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί 124 είδη και 4 υποείδη *Paenibacillus*, που σημαίνει ότι τα τελευταία έξι χρόνια ο αριθμός των ειδών του γένους έχει σχεδόν διπλασιαστεί (Euzéby, 1997, Ding *et al.*, 2005).

Φυλογενετικές ομάδες του γένους <i>Bacillus</i>	Είδη <i>Bacillus</i>
I	<i>Bacillus coagulans</i> <i>Geobacillus kaustophilus</i> <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
II	<i>Bacillus azotoformans</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus maroccanus</i> <i>Bacillus simplex</i> <i>Bacillus psychrophilus</i> <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>
III	<i>Bacillus laevolacticus</i> <i>Virgibacillus pantothenicus</i>
IV	<i>Bacillus badius</i> <i>Marinibacillus marinus</i>
V	<i>Bacillus flexus</i> <i>Bacillus halodurans</i>
VI	<i>Bacillus insolitus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus macroides</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus atrophaeus</i>

	<i>Bacillus mojavenis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus fusiformis</i> <i>Bacillus sphaericus</i>
VII	<i>Brevibacillus agri</i> <i>Brevibacillus borstelensis</i> <i>Brevibacillus choshinensis</i> <i>Brevibacillus parabrevis</i> <i>Brevibacillus brevis</i> <i>Brevibacillus formosus</i>
VIII	<i>Paenibacillus alvei</i> <i>Paenibacillus lautus</i> <i>Paenibacillus macerans</i> <i>Paenibacillus pabuli</i> <i>Paenibacillus gordonae</i> <i>Paenibacillus validus</i>
IX	<i>Paenibacillus alginolyticus</i> <i>Paenibacillus chondroitinus</i> <i>Paenibacillus larvae</i>
X	<i>Bacillus lentus</i> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus mycoides</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>
ΜΗ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΜΕΝΑ	<i>Bacillus circulans</i>

**Πίνακας 1.7.** Ταξινόμηση της οικογένειας Bacilaceae με βάση την ομολογία του ριβοσωμικού RNA (Xu *et al.*, 2003).

Παρακάτω παρουσιάζεται η φυλογενετική ανάλυση του γένους *Bacillus* σύμφωνα με την παραπάνω ομαδοποίηση (σχήμα 1.11).



**Σχήμα 1.11.** Φυλογενετική ανάλυση 46 ειδών της οικογένειας Bacillaceae, κατηγοριοποιημένα σε δέκα φυλογενετικές ομάδες του γένους (Xu *et al.*, 2003).

Βάσει δραστηριότητας νιτρογενάσης, έχουν αναφερθεί αρκετά είδη του γένους *Bacillus* τα οποία έχουν ικανότητα αζωτοδέσμευσης. Ορισμένα από αυτά είναι τα: *B. megaterium*, *B. alkalidiazotrophicus*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. brevis* και *B. firmus* (Ding *et al.*, 2005, Sorokin *et al.*, 2008). Ωστόσο, ενίσχυση του γονιδίου *nifH* δεν έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία σε πολλά στελέχη που θεωρούνται αζωτοδεσμευτικά. Ενδεικτικά, αναφέρονται ορισμένα στελέχη στα οποία έχει ανιχνευθεί το *nifH*: *B. cereus*, *B. megaterium* και *B. marisflavi* (Ding *et al.*, 2005). Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό, ότι η αζωτοδέσμευση περιορίζεται σε ένα υποσύνολο των ειδών του γένους *Bacillus*. (Heulin *et al.*, 1994).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα μέλη του γένους *Bacillus* απαντώνται σε ποικίλα περιβάλλοντα. Το στέλεχος *B. circulans*, μαζί με τα *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella terrigena*, και *Pseudomonas* sp., έχει απομονωθεί από ριζόσφαιρα αραβοσίτου στη Γαλλία (Berge *et al.*, 1991). Επιπλέον τα *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. azotoformans*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. brevis*, *B. megaterium* και *B. firmus*, απομονώθηκαν από την κοιλάδα Yangzi (Xie *et al.*, 1998). Σε πρόσφατη έρευνα, το πιο συχνά αναφερόμενο είδος, από 311 απομονώσεις από ριζόσφαιρα σιταριού στη Ν.

Βραζιλία, ήταν το στέλεχος *Bacillus borealis*, ακολουθούμενο από το *Paenibacillus graminis*, και οι υπόλοιπες άνηκαν στο γένος *Paenibacillus* sp. (Beneduzi *et al.*, 2008).

Αζωτοδεσμευτικό στέλεχος *Bacillus* sp. έχει επίσης απομονωθεί από εκτομυκόρριζα δέντρου *Pseudotsuga* sp. (ψευδοτσούγκα) (Li *et al.*, 1992).

Εκτός της ριζόσφαιρας, μέλη του γένους *Bacillus* απαντώνται και σε υδρόβιο περιβάλλον. Τα στελέχη *B. pumilus*, *B. cereus* και *B. sphaericus* έχουν απομονωθεί από το παράκτιο περιβάλλον Cochín στην Ινδία (Parvathi *et al.*, 2009). Αρκετά είδη του γένους *Bacillus* που απαντώνται στα θαλάσσια περιβάλλοντα, είναι δύσκολο να ταξινομηθούν. Μερικά από τα στελέχη του γένους τα οποία απομονώνονται από θαλάσσιες κοινότητες είναι τα: *B. cereus*, *B. subtilis*, και *B. pumilus*.

Πρόσφατα, το *B. pumilus* έχει ανιχνευτεί σε ακραία περιβάλλοντα όπως στο εσωτερικό του βασάλτη στην έρημο Sonoran, καθώς και σε διαστημικά σκάφη (Gioia *et al.*, 2007). Το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντοχή σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως χαμηλή ή ακόμα και απουσία διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών, αποξήρανση, χημική απολύμανση, υπεροξείδιο, UV και γ ακτινοβολία.

Το γένος *Paenibacillus* προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Ash (1993), βάσει φυλογενετικών δεδομένων από την ανάλυση του γονιδίου 16s rRNA. Εκείνη την εποχή το γένος *Paenibacillus* περιελάμβανε 11 είδη συμπεριλαμβανομένων και των αζωτοδεσμευτικών ειδών: *Paenibacillus polymyxa* (Grau & Wilson, 1962), *Paenibacillus macerans* (Witz *et al.*, 1967), και *Paenibacillus azotofixans* (Seldin *et al.*, 1984). Έκτοτε, μελέτες έχουν αναγνωρίσει και άλλα μέλη του γένους *Paenibacillus* (Tcherpakov *et al.*, 1999; Van der Maarel *et al.*, 2000, Elo *et al.*, 2001).

Εκτός από τα προαναφερθέντα αζωτοδεσμευτικά στελέχη, έχουν περιγραφεί και τα εξής αζωτοδεσμευτικά μέλη του γένους, βάσει δραστηριότητας νιτρογενάσης: *P. peoriae* και *P. borealis* (Elo *et al.*, 2001), *P. graminis* και *P. odorifer* (Berge *et al.*, 2002), *P. brasiliensis* (Von der Weid *et al.*, 2002), *P. wynnii* (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2005) και *P. massiliensis* (Ding *et al.*, 2005).

Ενίσχυση αλληλουχιών του γονιδίου *nifH* έχει πραγματοποιηθεί για στελέχη, ορισμένων αζωτοδεσμευτικών ειδών *Paenibacillus* (Ding *et al.*, 2005). Συγκεκριμένα το γονίδιο *nifH* ανιχνεύτηκε μόνο στα : *P. azotofixans*, *P. macerans*, *P. polymyxa.*, *P. graminis* και *P. odorifer* (Achouak *et al.*, 1999, Berge *et al.*, 2002).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το στέλεχος *Paenibacillus azotofixans* παρουσιάζει την υψηλότερη αζωτοδεσμευτική ικανότητα μεταξύ των στελεχών του γένους (Achouak *et al.*, 1999, Berge *et al.*, 2002). Είναι κατά Gram+ βακτήριο, σχηματίζει ενδοσπόρια και παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό G+C (40-54 mol %). Είναι ραβδόμορφο, αερόβιο ή προαιρετικά αερόβιο και παράγει καταλάση.

Το *P. azotofixans* απαντάται στο έδαφος και στη ριζόσφαιρα. Πρόσφατα έχει απομονωθεί και από ριζόσφαιρα στη Βραζιλία και Χαβάη (Berge *et al.*, 2002). Το οπερόνιο το οποίο είναι υπεύθυνο για την καθήλωση του αζώτου και τη μετατροπή του σε αμμωνία στο στέλεχος *Paenibacillus azotofixans*, είναι το *nifHDK*.

Στέλεχος του γένους *Paenibacillus*, το οποίο απομονώθηκε από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Zanthoxylum simulans* στο Πεκίνο, παρουσίασε υψηλή ομολογία με τα *Paenibacillus azotofixans* (97.8–98.5%) και *Paenibacillus stellifer* (95.4–96.3%). Βάσει όμως χαρακτηριστικών γνωρισμάτων, διαφοροποιείται από τα προαναφερθέντα μέλη του γένους, με αποτέλεσμα να του δοθεί η ονομασία *Paenibacillus zanthoxyli* sp. (Berge *et al.*, 2002).

Αργότερα, σε σχετική έρευνα, υψηλή ομολογία (96,2-98,2%) με το *P. azotofixans* παρουσίασαν πέντε στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα των φυτών του είδους *Sabina squamata*, *Weigela florida* και *Zanthoxylum simulans*. Η φυλογενετική ανάλυση, βάσει του γονιδίου 16s rRNA, έδειξε ότι τα συγκεκριμένα στελέχη ανήκουν στο γένος *Paenibacillus*. Ωστόσο, η συγγένεια μεταξύ των στελεχών αυτών και του *P. azotofixans* ήταν μόλις 12,9-29,5%. Φαινοτυπικές αναλύσεις έδειξαν ότι ένα χαρακτηριστικό που διαφοροποιεί τα συγκεκριμένα στελέχη από το *P. azotofixans* και τα άλλα είδη του γένους *Paenibacillus*, είναι η μη παραγωγή οξέος και αερίου από διάφορους υδατάνθρακες όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, σουκρόζη, λακτόζη. Βάσει δεδομένων, τα πέντε αυτά στελέχη αντιπροσωπεύουν ένα νέο είδος του γένους, το *P. sabinae* sp. (Ma *et al.*, 2007).

Την ίδια χρονιά, στέλεχος του γένους *Paenibacillus* (βάσει ανάλυσης της ακολουθίας του συντηρημένου γονιδίου 16s rRNA), απομονώθηκε από τη ριζόσφαιρα του *Forsythia mira* (Ma *et al.*, 2008). Παρουσίασε υψηλή ομολογία με τα *Paenibacillus durus* (97.0%), *Paenibacillus sabinae* (98.3%) και *Paenibacillus zanthoxyli* (96.8%). Στηριζόμενοι, στους φαινοτυπικούς χαρακτηρισμούς και DNA-DNA υβριδισμό, του δόθηκε η ονομασία *Paenibacillus forsythiae* sp. Είναι κατά Gram θετικό ή μεταβλητό, προαιρετικά αερόβιο και ραβδόμορφο βακτήριο. Οι αποικίες του είναι κυκλικές και κυρτές. Το περιεχόμενο G+C είναι 50,4% mol. Η



θερμοκρασία και το pH ανάπτυξης του κυμαίνονται, από 10-40 °C (άριστη 30 °C) και 4-10 (άριστο 7-7,2), αντίστοιχα. Αναπτύσσεται τόσο σε συγκέντρωση NaCl 3% (w/v) όσο και σε απουσία, αλλά όχι σε συγκέντρωση NaCl 5% (w/v). Η ανάπτυξη του εμποδίζεται παρουσία λυσοζύμης 0,001% (w/v) (Ma *et al.*, 2008).

Το στέλεχος *Paenibacillus brasiliensis*, το οποίο έχει απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα αραβοσίτου στη Βραζιλία, παρουσιάζει υψηλή ομολογία με τα *P. polymyxa* και *P. peoriae*. (Seldin *et al.*, 2002).

Ένα άλλο εξίσου σημαντικό αζωτοδεσμευτικό μέλος της οικογένειας *Paenibacillus*, το οποίο έχει αναφερθεί ήδη, είναι το στέλεχος *P. durus*. Το συγκεκριμένο στέλεχος επιδεικνύει γενετική ποικιλομορφία και συγκεκριμένοι γενότυποι αποικίζουν τη ριζόσφαιρα σιταριού και σακχαροκάλαμου. Κατόπιν ερευνών, εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές σε πληθυσμούς του *P. durus* από ριζόσφαιρα και ριζοπλάνο καλαμποκιού, οι οποίες αποδίδονται στον διαφορετικό τύπο εδάφους απ' όπου απομονώθηκαν (Baldani & Baldani, 2005). Η οργάνωση των γονιδίων *nif* του στελέχους *P. durus*, περιλαμβάνει τρεις ομάδες, α) *nifB nifHDK*, β) *nifB nifH* και γ) *nifH*, καθεμία από τις οποίες περιέχει ένα αντίγραφο του γονιδίου *nifH* (Pedrosa & Elmerich, 2007).

Πολλά μέλη του γένους *Paenibacillus* έχουν απομονωθεί, τόσο από ριζόσφαιρα όσο και από έδαφος σιταριού στη Ν. Βραζιλία (Beneduzi *et al.*, 2008)

Τέλος, σε πρόσφατη μελέτη, στέλεχος του γένους *Paenibacillus*, απομονώθηκε από το χώμα ριζόσφαιρας του *Sophora japonica* (Jin *et al.*, 2010).

Όσον αφορά την οικολογική σημασία τόσο του γένους *Bacillus* όσο και του *Paenibacillus*, αναφέρεται ότι μπορούν να επηρεάσουν ευνοϊκά την ανάπτυξη των φυτών. Αυτό μπορεί να γίνει είτε άμεσα, μέσω παραγωγής φυτοορμονών και θρεπτικών συστατικών, είτε έμμεσα, με ανταγωνιστική δράση έναντι παθογόνων. Για παράδειγμα, το *P. polymyxa* παράγει πολυμυξίνη, ένα αντιβιοτικό με αντιμυκητιακή και αντιβακτηριακή δράση. Το ίδιο βακτήριο έχει ανασταλτική δράση στο παθογόνο του σιταριού *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, ενώ επάγει τη διασυστηματική ανοσοποίηση ορισμένων φυτών στο παθογόνο *Pectobacterium carotovorum* (πρώην *Erwinia carotovora*) (Bally & Elmerich, 2007, Van Dommelen & Vanderleyden, 2007). Τέλος, έμφαση δίνεται στον οικολογικό ρόλο του *B. pumilus*, εξαιτίας της ικανότητας που παρουσιάζει στην παραγωγή ανταγωνιστικών ενώσεων ως προς τους μύκητες και τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Επομένως, το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αφού πρώτα γίνει κατανοητή η

ποικιλομορφία του, η γενετική συγγένεια με άλλους βακίλους, και η πιθανή παρουσία τοξιγενών παραγόντων (Parvathi *et al.*, 2009).

#### 1.3.1.4 *Azotobacter*

Το γένος *Azotobacter* ανήκει στην τάξη Pseudomonadales, περιλαμβάνει αρνητικούς κατά Gram, υποχρεωτικά αερόβιους και ελεύθερα διαβιούντες (μη συμβιωτικούς) οργανισμούς, οι οποίοι φυλογενετικά ανήκουν στη γ- κλάση των Πρωτεοβακτηρίων, ικανούς να δεσμεύουν  $N_2$ . Το συγκεκριμένο γένος περιλαμβάνονται 7 είδη: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. armeniacus*, *A. paspali*, *A. Salinestris* (Kennedy *et al.*, 2005). Ο πλειομορφισμός είναι συνήθης και έχουν περιγραφεί πολλά σχήματα (από ευθεία ραβδία με στρογγυλές άκρες έως ελλειπτικές ή ακόμα και κοκκοειδείς μορφές, ανάλογα με το υπόστρωμα και την ηλικία) και μεγέθη κυττάρων. Τα κύτταρά τους έχουν σχεδόν το μέγεθος ζυμομύκητα, με διαμέτρους από 2-4 $\mu$ m ή και περισσότερο. Το *A. paspali* είναι συνήθως πιο επίμηκες σε σχέση με τα άλλα είδη. Τα βακτήρια του γένους *Azotobacter* μπορεί να είναι κινητά με πλευρικά μαστίγια ή μη κινητά (Kennedy *et al.*, 2005). Πλευρικά μαστίγια φέρουν τα είδη *A. vinelandii*, *A. paspali* και *A. chroococcum* (Vanbleu & Vanderleyden, 2007). Μερικά στελέχη είναι αυτοκινούμενα, διαθέτοντας περίτριχα μαστίγια (Brock, 2005). Το εύρος pH για την ανάπτυξη τους κυμαίνεται από 4,8-8,5 και το άριστο pH για αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα από 7,0 έως 7,5.

Τα περισσότερα είδη έχουν απομονωθεί από το έδαφος, ενώ ένα μικρό ποσοστό από νερό (Kennedy *et al.*, 2005). Το είδος *A. paspali* παρουσιάζει εξειδίκευση καθώς έχει απομονωθεί μόνο από τη ριζόσφαιρα του *Paspalum notatum*, ενός υποτροπικού τετραπλοειδούς αγρωστώδους φυτού, και επιδεικνύει αζωτοδέσμευση της τάξης 15-90 kg N/εκτάριο/έτος (Tilak *et al.*, 2005, Elmerich, 2007).

Η πρώτη δημοσίευση απομόνωσης αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων του γένους *Azotobacter* πραγματοποιήθηκε από τον Ολλανδό μικροβιολόγο Beijerinck (1901), ο οποίος αναφέρει τα είδη *A. chroococcum* και *Azomonas agilis*. Δύο χρόνια αργότερα περιγράφηκε το είδος *A. vinelandii* από τον Lipman. Τις δεκαετίες '60 και '70, οι έρευνες σχετικά με το *Azotobacter* επικεντρώθηκαν κυρίως σε δύο πεδία: α) τη

φυσιολογία ανοχής σε οξυγόνο των *A. vinelandii* και *A. chroococcum* και β) τη βιοχημεία του ενζυμικού συστήματος του *A. vinelandii*.

Η πιο σπουδαία ίσως ανακάλυψη έγινε τη δεκαετία '80, η οποία αναφέρεται στη διαπίστωση ότι το *A. vinelandii* έχει τρία γενετικά διαφορετικά ενζυμικά συστήματα νιτρογενάσης (Chisnell, Premakumar & Bishop, 1988). Ένα εξ αυτών, ως αναμενόταν, περιέχει Mo στο ενεργό του κέντρο και ονομάστηκε νιτρογενάση-1, εκφράζεται δε όταν ο οργανισμός αναπτύσσεται σε μέσο που περιέχει Mo. Το δεύτερο περιέχει βανάδιο (V) και ονομάστηκε νιτρογενάση-2 (Hales *et al.*, 1986, Robson *et al.*, 1984), ενώ εκφράζεται κατά την ανάπτυξη του οργανισμού σε μέσο το οποίο δεν περιέχει Mo αλλά V. Το τρίτο περιέχει Fe και ονομάστηκε νιτρογενάση-3, εκφράζεται δε κατά την διαζωτροφική ανάπτυξη του οργανισμού σε μέσο το οποίο παρουσιάζει έλλειψη σε Mo και V (Chisnell *et al.*, 1988).

Περαιτέρω έρευνες τις δεκαετίες '80 και '90 απέδειξαν ότι, όπως το *A. vinelandii* έτσι και το *A. paspali* φέρει τρία διαφορετικά, από γενετική άποψη, ένζυμα νιτρογενάσης και ότι το *A. chroococcum* φέρει δύο ξεχωριστά ένζυμα για αζωτοδέσμευση (Kennedy & Bishop, 2004). Το *A. salinestrus* φέρει εναλλακτική νιτρογενάση (Betancourt *et al.*, 2008).

Τις τελευταίες δεκαετίες, με τα εργαλεία τόσο της μοριακής βιολογίας όσο και της γενετικής να προοδεύουν, το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί σε μοριακές αναλύσεις οι οποίες οδήγησαν στην πρώτη δημοσίευση του γονιδιώματος του *A. vinelandii* (2002). Το στέλεχος *Azotobacter vinelandii* AvOP (ή στέλεχος UW ή CA) (σχήμα 1.12), αποτελεί το μοντέλο του γένους λόγω της δεκτικότητάς του σε γενετικούς χειρισμούς, δεδομένου ότι είναι εξαιρετικός δέκτης DNA, που προέρχεται από άλλους οργανισμούς, είτε μέσω μετασχηματισμού (Transformation), είτε μέσω σύζευξης (Conjugation) (Kennedy & Bishop, 2004).



**Σχήμα 1.12.** Βλαστικά κύτταρα του στελέχους *Azotobacter vinelandii*

Το συγκεκριμένο στέλεχος μπορεί να δεχθεί πλασμίδια σε μεγάλο αριθμό από το *E.coli* ή από άλλα στελέχη του γένους *Azotobacter* και μπορεί να μετασχηματιστεί είτε με γραμμικό είτε με πλασμιδιακό DNA. Το *A. vinelandii* AvOP δεν περιέχει ενδογενή πλασμίδια, σε σχέση με το *A. chroococcum* το οποίο περιέχει οκτώ (Robson *et al.*, 1984, Kennedy *et al.*, 2003). Προς το παρόν δεν υπάρχουν αναφορές για πλασμίδια σε άλλα είδη του *Azotobacter*.

Η αζωτοδέσμευση υπό αερόβιες συνθήκες αποτελεί το βασικό χαρακτηριστικό όλων των μελών του γένους *Azotobacter*. Όπως έχει προαναφερθεί, στο *Azotobacter* εντοπίζονται και οι τρεις μορφές ενζυμικών συστημάτων νιτρογενάσης Nif, Vnf και Anf, οι οποίες χρησιμοποιούνται από το βακτήριο για δέσμευση αζώτου ανάλογα με την παρουσία μετάλλων στο περιβάλλον. Τα γονίδια *nifHDK* κωδικοποιούν για βασικές δομικές πρωτεΐνες του συστήματος νιτρογενάσης. Τα υπόλοιπα γονίδια του οπερονίου *nif* εκφράζουν πρωτεΐνες σχετικές με τη μεταφορά ηλεκτρονίων, την αναγωγή και άλλα. Το ρόλο του ενεργοποιητή των γονιδίων *nif*, έχει η πρωτεΐνη NifA, ενώ αρνητική ρύθμιση στην παραγωγή της NifA παρέχει η πρωτεΐνη NifL, η οποία είναι χαρακτηριστική για τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια των γ-Πρωτεοβακτηρίων, όπως το *Azotobacter* και το *Klebsiella oxytoca* (Kennedy *et al.*, 2005). Εκτός από την αζωτοδέσμευση, τα βακτήρια του γένους *Azotobacter* είναι ικανά να χρησιμοποιούν νιτρικά ως πηγή αζώτου, με αναγωγή των τελευταίων σε νιτρώδη και έπειτα σε αμμωνιακά. Το γονίδια που κωδικοποιούν για την αναγωγή των νιτρικών και των νιτρωδών έχουν απομονωθεί από το στέλεχος *Azotobacter vinelandii* AvOP και είναι τα *nasB* και *nasA*, αντίστοιχα (Kennedy & Bishop, 2004).

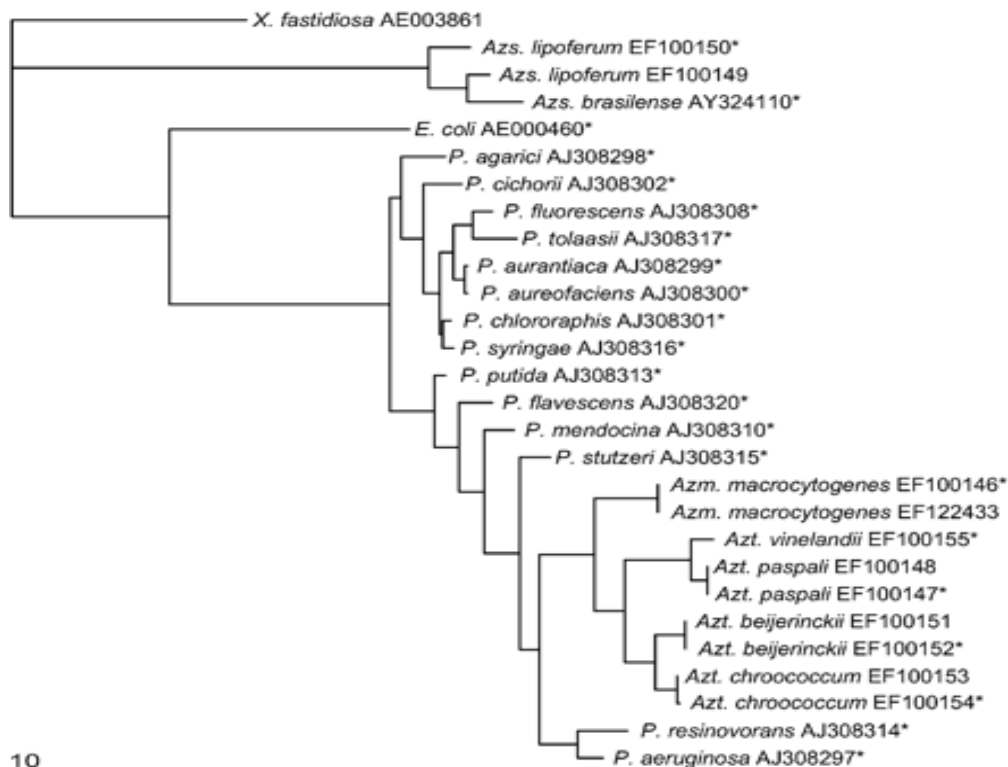
Παρά το γεγονός ότι το *Azotobacter* είναι υποχρεωτικά αερόβιο, το ενζυμικό σύστημα που διαθέτει για τη βιολογική δέσμευση  $N_2$ , είναι ευαίσθητο στο  $O_2$ . Πιστεύεται ότι ο χαρακτηριστικός για το *Azotobacter*, υψηλός ρυθμός αναπνοής και η πλούσια γλοιώδης στοιβάδα της κάψας, βοηθούν στην προστασία του ενζυμικού αυτού συστήματος από το  $O_2$ . Σε ορισμένα στελέχη όλων των ειδών, παρατηρείται παραγωγή υδατοδιαλυτών ή μη υδατοδιαλυτών χρωστικών. Τα βακτήρια του γένους *Azotobacter* χρησιμοποιούν ως πηγές άνθρακα σάκχαρα, αλκοόλες και άλατα οργανικών οξέων, ενώ ως πηγές αζώτου αξιοποιούν αμμωνιακά άλατα, νιτρικά και ουρία (Brock, 2005). Όλα τα στελέχη του *Azotobacter* είναι θετικά στη δοκιμή της ουρίας, μία ιδιότητα που τα διαχωρίζει από τα στελέχη του *Azomonas*. Το γεγονός αυτό είναι σύμφωνο με την ικανότητα του *Azotobacter vinelandii* και του *Azotobacter chroococcum* να χρησιμοποιούν ουρία ως πηγή αζώτου (Thompson & Skerman, 1979, Kennedy *et al.*, 2003). Ο μεταβολισμός ενώσεων του άνθρακα είναι αυστηρά οξειδωτικός και σπάνια παράγονται οξέα ή άλλα προϊόντα ζύμωσης. Τα βακτήρια του γένους *Azotobacter* παράγουν ορισμένες ενώσεις, οι οποίες παρουσιάζουν ξεχωριστό ενδιαφέρον για διαφορετικούς λόγους. Υπό συνθήκες περιβαλλοντικού στρες, ορισμένα είδη έχουν την ικανότητα να δημιουργούν

ληθαργικές μορφές, οι οποίες ονομάζονται κύστες, αυξάνοντας σημαντικά την πιθανότητα επιβίωσης του βακτηρίου. Τα βακτηριακά κύτταρα διαφοροποιούνται σε μη κινητές κύστες οι οποίες περιέχουν κόκκους β-πολύ-υδροξυβουτυρικού οξέος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη συγκέντρωση κυττάρων σε ένα πλέγμα πολυσακχαριτών και τον σχηματισμό μακροσκοπικών όγκων, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν άζωτο και επιπλέον, παρουσιάζουν υψηλή δραστικότητα της αναγωγής του νιτρικού και της συνθάσης του γλουταμινικού (Vanbleu & Vanderleyden, 2007). Όπως και τα ενδοσπόρια των βακτηρίων, οι κύστες του *Azotobacter* έχουν αμελητέα ενδογενή αναπνοή και είναι ανθεκτικές στην αποξήρανση, τη μηχανική αποδόμηση και την υπεριώδη και την ιονίζουσα ακτινοβολία. Αντίθετα με τα ενδοσπόρια, δεν είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές στη θερμότητα και δεν βρίσκονται σε απόλυτο λήθαργο, διότι οξειδώνουν ταχύτατα εξωγενείς πηγές ενέργειας (Brock, 2005).

Το *A. vinelandii* παράγει αλγινικό οξύ, έναν πολυσακχαρίτη ο οποίος είναι συστατικό των κύστεων. Το αλγινικό οξύ παρουσιάζει ενδιαφέρον για τη βιομηχανία και μπορεί να παραχθεί σε ικανοποιητικές ποσότητες ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας (Kennedy *et al.*, 2005). Το *A. vinelandii* παράγει επίσης, τουλάχιστον δώδεκα φερρεδοξίνες εκ των οποίων οι τέσσερις πιθανώς να εμπλέκονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων προς τη νιτρογενάση (Kennedy & Bishop, 2004). Ορισμένα είδη *Azotobacter* παράγουν σιδηροφόρες ενώσεις. Ο σίδηρος είναι απαραίτητο στοιχείο και ο ανταγωνισμός για αυτόν στη ριζόσφαιρα είναι ιδιαίτερα έντονος. Σε αερόβιες συνθήκες, ο σίδηρος λαμβάνει αδιάλυτες μορφές και αφομοιώνεται με δυσκολία από τα βακτήρια. Οι σιδηροφόροι είναι μόρια μικρού μοριακού βάρους που παράγονται υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου, προκειμένου να δεσμεύουν σίδηρο και να το μεταφέρουν στο μικροβιακό κύτταρο (Bally & Elmerich, 2007, Vanbleu & Vanderleyden, 2007). Επιπλέον, αναφέρεται η παραγωγή κυτοκινινών για τα *A. chroococcum* και *A. beijerinckii* σε ριζόσφαιρα του αγρωστώδους *Festuca* sp. (Baca & Elmerich, 2007). Το είδος *A. paspali* συνθέτει και εκκρίνει ινδολοξικό οξύ, τρεις γιβερελλίνες και δύο κυτοκινίνες (Kennedy *et al.*, 2005). Τέλος, πολλά είδη *Azotobacter* παράγουν ουσίες οι οποίες θεωρούνται ότι έχουν ανασταλτική δράση έναντι παθογόνων όπως το *Botrytis cinerea* (Vanbleu & Vanderleyden, 2007), ενώ έχει βρεθεί ότι σε συνδυασμό με τα *Azospirillum* και *Klebsiella*, τα *Azotobacter* περιορίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων *Fusarium*

*oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia* και *Pythium* sp. στο αγγούρι (Bally & Elmerich, 2007).

Το ποσοστό του περιεχομένου G+C του γένους κυμαίνεται από 63,2 έως 67,5% και το τυπικό είδος του γένους είναι το *A. chroococcum*. Το μέγεθος του γονιδιώματος των ειδών του *Azotobacter* κυμαίνεται από 3,10Mb (*A. chroococcum* NCIB 9043) έως 5,3Mb (*A. chroococcum* στέλεχος M4). Η διαφορά στο μέγεθος του γονιδιώματος του ίδιου είδους, ενισχύει την άποψη περί γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ στελεχών του *A. chroococcum*. Επίσης, όλα τα είδη έχουν από έξι ως οκτώ αντίγραφα του γονιδίου *rrn*. Το *Azotobacter* ταξινομείται, πλέον, ως γένος της οικογένειας Pseudomonadaceae, ενώ παλαιότερα άνηκε στην οικογένεια Azotobacteriaceae, η οποία, ταξινομικά, δεν είναι αποδεκτή (Euzéby, 1997). Μοριακές αναλύσεις του γονιδίου 16S rRNA, καθώς και άλλων συντηρημένων γονιδίων υποδεικνύουν την τοποθέτηση των ειδών του *Azotobacter* στο γένος *Pseudomonas sensu stricto*. Επαναπροσδιορισμός του γένους ως *Pseudomonas* θα οδηγήσει στη τοποθέτησή του στην ομάδα του *P. aeruginosa* (σχήμα 1.13).



**Σχήμα 1.13.** Συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών του γονιδίου 16S rRNA ορισμένων ειδών των *Azomonas* (*Azm.*), *Azospirillum* (*Azs.*), *Azotobacter* (*Azt.*), και *Pseudomonas* μέσω του αλγορίθμου Neighbor. Η μπάρα αντιστοιχεί σε υποκαταστάσεις ανά θέση. Αλληλουχίες σημειωμένες με αστερίσκο (\*) προέρχονται από τα τυπικά στελέχη. Οι αλληλουχίες AY324110\*, EF100150\*, EF100149 και EP100150\* αναφέρονται στα *Azospirillum brasilense* (ATCC 29145T) *Azospirillum lipoferum* (8672 και ATCC 29707T), αντίστοιχα (Young & Park, 2007).

Για το εν λόγω γεγονός, αρχικά είχαν διατυπωθεί ορισμένες αμφιβολίες, εξαιτίας της απουσίας αναφορών σχετικά με την αζωτοδέσμευση μεταξύ των ειδών του *Pseudomonas*. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια έχουν απομονωθεί στελέχη *Pseudomonas*, τα οποία αζωτοδεσμεύουν. Πιθανώς, η ικανότητα αυτή να αποκτήθηκε μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Rediers *et al.*, 2004, Young & Park, 2007).

Η τεχνική εμβολιασμού σιτηρών και λαχανικών με *Azotobacter* και βακίλους (*Bacillus megaterium*), η οποία είναι γνωστή ως “bacterization”, ήταν πολύ συνηθισμένη στη Ρωσία κατά τη δεκαετία του '50 και οι ευεργετικές της επιδράσεις έχουν αναφερθεί εκτενώς κατά το παρελθόν. Το κατά πόσο το πλεονέκτημα που αποκτούν τα φυτά οφείλεται στην αζωτοδέσμευση, εξαρτάται από το σύστημα καλλιέργειας, το καλλιεργούμενο είδος, το έδαφος και άλλες παραμέτρους (Franche *et al.*, 2008). Ευεργετικές επιδράσεις έχουν αναφερθεί και σε εμβολιασμό φυτών βίκου με συνδυασμό βακτηρίων *Azotobacter/Rhizobium* (Rodelas *et al.*, 1999). Δύο στελέχη του *A. chroococcum* επέδειξαν προώθηση της ανάπτυξης σε φυτάρια σιταριού μέσω παραγωγής ινδολοξικού και γιββερελλινών. Σε σχετική έρευνα, φυτάρια καλαμποκιού αναπτυσσόμενα σε θρεπτικό υλικό παρουσία *A. chroococcum*, είχε ως αποτέλεσμα αύξηση - μέσω συνεργισμού - των συγκεντρώσεων των φυτοορμονών σε σχέση με το άθροισμα των ορμονών που παρήχθησαν ξεχωριστά από μη εμβολιασμένα φυτά και καλλιέργειες βακτηρίων. Ωστόσο, είναι δύσκολο να διαχωριστεί ποιές ορμόνες παράγονται από το φυτό ως απόκριση στην επίδραση με *Azotobacter* και ποιες συντίθενται από το ίδιο το *Azotobacter* (Dobbelaere & Okon, 2007). Επιπλέον, έχει αναφερθεί προώθηση της ανάπτυξης της τομάτας και του *Paspalum notatum* από το *A. paspali*, χωρίς όμως να επηρεάζεται ο αριθμός των ανθέων (Kennedy *et al.*, 2005). Τέλος, θετικές επιδράσεις διατυπώθηκαν με εφαρμογές *Azotobacter* σε καλλιέργειες ρυζιού και βαμβακιού (Kennedy *et al.*, 2004). Αν και η παρατηρούμενη αύξηση έπειτα από εμβολιασμό με *Azotobacter* ήταν της τάξης 10-20%, η πρακτική του εμβολιασμού καλλιεργειών με το συγκεκριμένο βακτήριο έχει εγκαταλειφθεί λόγω ανακόλουθων αποτελεσμάτων (Kennedy *et al.*, 2005).

### 1.3.1.5 *Xanthobacter*

Τα στελέχη του γένους *Xanthobacter*, είναι Gram<sup>-</sup>, αν και μερικές φορές κατά τη χρώση παρουσιάζουν την όψη των Gram<sup>+</sup>, κίτρινα, ραβδόμορφα βακτήρια, τα οποία περιέχουν τη χρωστική ζεαξανθίνη (καροτενοειδές). Ανήκουν στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων και το ποσοστό G+C του γένους κυμαίνεται από 60-70%. Θεωρούνται και μεθυλοτροφικά. Επιπλέον, όλα τα στελέχη δεσμεύουν άζωτο υπό χημειοετεροτροφικές και χημειολιθο-αυτοτροφικές συνθήκες, αλλά μόνο υπό μικροαερόφιλες συνθήκες και απουσία αμμωνίας.

Περιβάλλοντα στα οποία απαντώνται στελέχη *Xanthobacter* είναι: έδαφος μολυσμένο με πετρέλαιο ή/και απόβλητα, θαλάσσια ιζήματα, ύδατα και ιζήματα λιμνών, έδαφος και ριζόσφαιρα πλημμυρισμένων ορυζώνων, ριζόσφαιρα κατηφέ (*Marigold* sp.), έδαφος κήπων, υπόνομοι και φύλλα δέντρων (Wiegel, 2006).

Τα είδη που περιλαμβάνει το γένος είναι τα: *Xanthobacter autotrophicus*, (τυπικό είδος), *Xanthobacter flavus*, *Xanthobacter agilis*, *Xanthobacter tagetidis*, *Xanthobacter amonoxidans* και *Xanthobacter viscosum*.

Τα *Xanthobacter*, πιστεύεται ότι συνεισφέρουν σημαντικές ποσότητες αζώτου στα φυτά. Τα στελέχη που έχουν κυρίαρχο ρόλο στην αλληλεπίδραση *Xanthobacter* και φυτών, ανήκουν στα *X. autotrophicus* και *X. flavus*. Το *X. autotrophicus* δεσμεύει άζωτο ετεροτροφικά σε τιμές που ανέρχονται σε 20-25 mg αζώτου/g σακχαρόζης. Η πιο σημαντική ιδιότητα του *Xanthobacter* είναι η αυτοτροφική αζωτοδέσμευση αλλά δεν έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες επ' αυτού. Μέχρι σήμερα, δεν έχουν απομονωθεί από τη ρίζα κάποιου φυτού αλλά, πιθανώς, να επηρεάζουν την ανάπτυξη του φυτού μέσω της ριζόσφαιρας. Επιπλέον, σύμφωνα με αποτελέσματα ερευνών, το *X. flavus* δεσμεύει άζωτο στην επιφάνεια φύλλων ρυζιού και σιταριού. Ίσως, τα βακτήρια αυτά να καταβολίζουν τα συστατικά του κηρού του φύλλου ώστε να παραχθεί η απαιτούμενη ενέργεια για την αζωτοδέσμευση.

Ως προς τη νιτρογενάση, έχει διαπιστωθεί ότι περιέχουν την τυπική νιτρογενάση (Nif) που παρουσιάζουν και τα περισσότερα αερόβια αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Υπάρχουν ενδείξεις για την ύπαρξη και της εναλλακτικής νιτρογενάσης βαναδίου (Vnf), αλλά το ερώτημα αυτό δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως. Αξίζει να αναφερθεί ότι μελλοντικά, το γένος των ριζοβίων *Azorhizobium*, πιθανώς να ενσωματωθεί στο γένος *Xanthobacter* (Wiegel, 2006).



### 1.3.1.6 *Beijerinckia*

Τα βακτήρια του γένους *Beijerinckia* είναι κατά Gram<sup>-</sup>, υποχρεωτικά αερόβια, κινητά με πλευρικά μαστίγια, τα οποία όμως δε διαθέτουν ορισμένα στελέχη. Τα κύτταρα τους είναι μικρότερα από αυτά των *Azotobacter* και *Azomonas* (1,7-4,5 x 0,5-1,5 μm) και έχουν σχήμα ραβδίων με στρογγυλές άκρες και ελαφρώς στενότερα στη μέση. Ένα άλλο χαρακτηριστικό των κυττάρων είναι η παρουσία λιποειδών σωμάτων - ενός σε κάθε πόλο- τα οποία περιέχουν β-πολύ-υδροξυβουτυρικό οξύ. Έχουν την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν σε θρεπτικά υποστρώματα απουσία αζώτου υπό αυστηρά όξινες συνθήκες, έως και pH 3,0.

Στελέχη του παραπάνω γένους, απομονώθηκαν για πρώτη φορά από χαλαζιακά εδάφη στο Μπαγκλαντές, το 1936. Αργότερα διαπιστώθηκε η παρουσία τους κυρίως σε όξινα εδάφη τροπικών περιοχών. Απαντώνται κυρίως στο ριζοπλάνο αλλά και στη ριζόσφαιρα.

Τα είδη του γένους είναι τα *B. indica* (συνώνυμα: *Azotobacter acida*, *Beijerinckia acida*, και *Beijerinckia congensis*), *B. fluminensis* και *B. derxii* (με δύο υποείδη) (Becking, 2006α).

Το ποσοστό G+C του γένους κυμαίνεται από 54,7-60,7%. Πολλά στελέχη καταβολίζουν νιτρικό είτε ελάχιστα είτε καθόλου. Επίσης, για δέσμευση αζώτου απαιτείται παρουσία μολυβδαινίου ενώ δεν χρειάζεται ασβέστιο και βανάδιο. Το γεγονός ότι η απουσία μολυβδαινίου δεν αντικαθίσταται από την παρουσία βαναδίου υποδηλώνει ότι τα *Beijerinckia* δεν περιέχουν τη νιτρογενάση Vnf (Becking, 2006α).

Η αποδοτικότητα αζωτοδέσμευσης του *Beijerinckia*, κυμαίνεται συνήθως από 10-13 mg αζώτου/g καταναλισκόμενης γλυκόζης σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς άζωτο (1 ή 2% υδατάνθρακες). Η αποδοτικότητα των στελεχών εξαρτάται από την ηλικία της καλλιέργειας του βακτηρίου και από τη συγκέντρωση υδατανθράκων στο υπόστρωμα, όπου χαμηλή συγκέντρωση υδατανθράκων έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη απόδοση (Becking, 2006α). Σε πειράματα σε θερμοκήπια και σε υπαίθριες καλλιέργειες με ρύζι και σακχαροκάλαμο, ο εμβολιασμός με στελέχη *Beijerinckia* αύξησε την απόδοση των συγκεκριμένων φυτών. Σε καλλιέργειες σακχαροκάλαμου, η συνεισφορά του *Beijerinckia* στο σύστημα φυτό-έδαφος είναι 50kg αζώτου/εκτάριο/έτος (Baldani & Baldani, 2005).

Έχουν διαπιστωθεί οι ωφέλιμες επιδράσεις του γένους σε ρίζες σακχαροκάλαμου, ρυζιού και άλλων αγρωστωδών φυτών.

### 1.3.1.7 *Derxia*

Το γένος *Derxia* αντιπροσωπεύεται από ένα μόνο είδος, το *Derxia gummosa*. Πολλές φορές αναφέρεται και το είδος *D. indica*, αλλά δεν είναι αποδεκτό λόγω του γεγονότος, ότι δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία ώστε να το διαφοροποιούν από το *D. gummosa*.

Το γένος *Derxia* περιλαμβάνει κατά Gram<sup>-</sup> βακτήρια, τα οποία ανήκουν στην κλάση των β-Πρωτεοβακτηρίων (Becking, 2006β, Schmid & Hartmann, 2007). Τα κύτταρά του είναι ευθέα ραβδία (3,0-6,0x1,0-1,2μm) με πολυάριθμα λιποειδή σώματα και στρογγυλές άκρες τα οποία είναι κινητά και φέρουν μικρό πολικό μαστίγιο.

Στελέχη του γένους *Derxia* εντοπίζονται κυρίως σε εδάφη τροπικών περιοχών και παρουσιάζουν αντοχή σε χαμηλό pH (Becking, 2006b). Προς το παρόν, δεν έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές έρευνες που να αποδεικνύουν την σημασία του *Derxia* ως PGPR σε καλλιέργειες φυτών, αν και έχει απομονωθεί από ριζόσφαιρα σακχαροκάλαμου (Peng *et al.*, 2006) και έχει επιδείξει μικρή συνεισφορά στην προώθηση της ανάπτυξης του *Pennisetum purpureum* σε συνδυασμό με στελέχη *Azotobacter* σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια (Baldani & Baldani, 2005).

Η αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται υπό αερόβιες ή μικροαερόφιλες συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιούν υδρογόνο τόσο ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη τους, όσο και ως αναγωγική δύναμη για αναγωγή CO<sub>2</sub>. Η αποδοτικότητα αζωτοδέσμευσης κυμαίνεται συνήθως από 9-25 mg αζώτου/g καταναλισκόμενης γλυκόζης σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς άζωτο, αλλά για τα περισσότερα στελέχη είναι χαμηλότερη από αυτήν των *Azotobacter* και *Beijerinckia*.

Σε εργαστηριακές καλλιέργειες, το νιτρικό δεν ανάγεται σε νιτρώδες ή N<sub>2</sub> και δεν παράγεται ινδολοξικό από τρυπτοφάνη. Για δέσμευση αζώτου απαιτείται μολυβδαίνιο, ενώ το βανάδιο δεν μπορεί να υποκαταστήσει το μολυβδαίνιο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα *Derxia* δεν περιέχουν την εναλλακτική νιτρογενάση Vnf (Becking, 2006b).

### 1.3.1.8 *Clostridium*

Βάσει της πιο πρόσφατης αναφοράς (*List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature*), το γένος *Clostridium* ανήκει στο φύλο Firmicutes (πρώην Gram<sup>+</sup>,

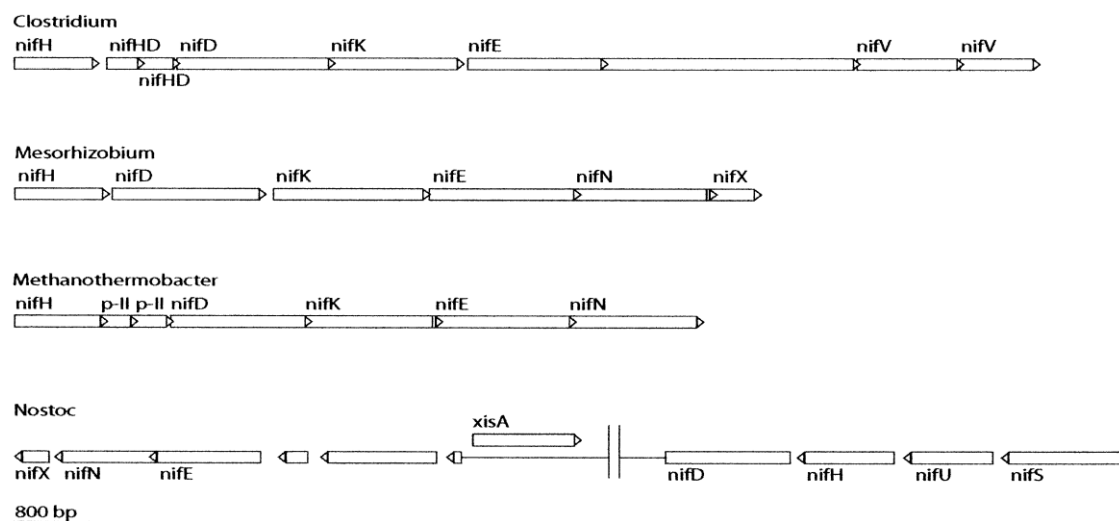
χαμηλού ποσοστού G+C) και περιλαμβάνει 199 είδη και υποείδη (Euzéby, 1997). Πρόκειται για υποχρεωτικά αναερόβια, θετικά κατά Gram, σποριογονικά, ραβδόμορφα βακτήρια, με χαμηλό ποσοστό G+C, τα οποία δεν ανάγουν θειικό οξύ.

Τα μέλη του γένους *Clostridium* απαντώνται κυρίως στο έδαφος, στο φυτικό περιβάλλον, στη σκόνη αλλά και στα περιττώματα, καθώς τα σπόρια του, παρουσιάζουν ανθεκτικότητα εντός του πεπτικού συστήματος.

Η πρώτη απομόνωση βακτηρίου *Clostridium* πραγματοποιήθηκε από τον Ρώσο μικροβιολόγο Winogradsky (1983) και επρόκειτο για το *Clostridium pasteurianum* (Elmerich, 2007). Το *Clostridium pasteurianum* παρουσιάζει την ικανότητα να δεσμεύει άζωτο και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως μοντέλο για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό του ενζυμικού συμπλόκου της νιτρογενάσης. Σε στέλεχος του συγκεκριμένου βακτηρίου, διαπιστώθηκε για πρώτη φορά το 1965, ότι η νιτρογενάση αποτελείται από δύο πρωτεΐνες και όχι από μία, όπως θεωρείτο ως τότε (Evans & Burris, 1992). Μέχρι σήμερα, έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί πλήθος στελεχών του γένους, τα οποία παρουσιάζουν αζωτοδεσμευτική ικανότητα. Ορισμένα από αυτά είναι τα: *C. aceticum*, *C. acetobutylicum*, *C. acidisoli*, *C. akagii*, *C. arcticum*, *C. beijerinckii*, *C. cellobioparum*, *C. butyricum*, *C. felsineum*, *C. formiaceticum*, *C. hungatei*, *C. kluyveri*, *C. tetanomorphum*, *C. thermosaccharolyticum* (αζωτοδέσμευση ακόμα και στους 60 °C) και *C. tyrobutyricum*. Πιθανώς, το εύρος της ιδιότητας της αζωτοδέσμευσης εντός του γένους *Clostridium* να έχει υποτιμηθεί (Young, 1992, Wahlund & Madigan, 1993, Euzéby, 1997, Lovell *et al.*, 2000). Πολλοί αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα των γονιδίων που κωδικοποιούν για τη νιτρογενάση ή ομόλογα γονίδια νιτρογενάσης. Το *Clostridium pasteurianum* έχει μία οικογένεια γονιδίων *nifH* η οποία αποτελείται από πέντε γονίδια *nifH* (Wang *et al.*, 1988, Zehr *et al.*, 2003). Επιπλέον, κατέχει και εναλλακτική νιτρογενάση (ανεξάρτητη του μολυβδαινίου) (Kennedy & Bishop, 2004). Γενικά, η ομάδα γονιδίων *nif* δεν έχει το γονίδιο *nifA*, το οποίο σε άλλα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια ενεργοποιεί τη μεταγραφή των υπόλοιπων γονιδίων *nif*. Οι περιοχές του *Clostridium pasteurianum* οι οποίες θεωρούνται ως προαγωγείς της μεταγραφής, παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με αντίστοιχες περιοχές του *Escherichia coli* (Enkh-Amgalan *et al.*, 2006). Αναμφισβήτητα, πληροφορίες για το γονιδίωμα ενός οργανισμού δεν παρέχουν μόνο οι ακολουθίες των βάσεων αλλά και η δομή των οπερονίων. Για παράδειγμα, στο *C. acetobutylicum* φαίνεται η διαφοροποίηση στη διάταξη των γονιδίων *nif* και η

απουσία ή η παρουσία τους σε σύγκριση με αυτήν των βακτηρίων *Mesorhizobium loti*, *Nostoc* sp. Strain 7120 και *Chlorobium tepidum* TLS (σχήμα 1.14) (Zehr *et al.*, 2003).

Ένα άλλο εξίσου ενδιαφέρον στοιχείο αποτελεί το γεγονός, ότι στελέχη του γένους *Clostridium* με αζωτοδεσμευτική ικανότητα, έχουν εντοπιστεί ενδοφυτικά σε consortium με μη αζωτοδεσμευτικά βακτήρια σε διάφορα αγρωστώδη. Σε τέτοιου είδους consortia, θεωρείται ότι η δέσμευση αζώτου υπό αναερόβιες συνθήκες, υποστηρίζεται από την κατανάλωση και την εξάλειψη του οξυγόνου από τα υπόλοιπα βακτήρια του consortium (Van Dommelen & Vanderleyden, 2007). Τα consortia ευνοούν και την ανταλλαγή γονιδίων μέσω οριζόντιας μεταφοράς, λόγω της συγκέντρωσης πληθυσμών βακτηρίων σε τόσο μικρό χώρο και με τόσο στενή εξάρτηση (Raymond *et al.*, 2004). Μέχρι πρόσφατα, τα μέλη του γένους *Clostridium* δεν θεωρούνταν ενδοφυτικά (Kennedy *et al.*, 2004). Πράγματι, η ιδιότητα της εισχώρησης αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων σε φυτά, αποδιδόταν κυρίως είτε σε Gram- αερόβια, είτε σε προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Όμως, ύστερα από τη διαπίστωση της ύπαρξης *Clostridium* σε αγρωστώδη, πρέπει να αναθεωρηθεί αυτή η άποψη και τα στελέχη του γένους να αναγνωριστούν ως υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια με ικανότητα για ενδοφυτική αζωτοδέσμευση, η οποία ωστόσο πρέπει να υποστηρίζεται από εξάλειψη του οξυγόνου από μη αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (Miyamoto *et al.*, 2004).



**Σχήμα 1.14.** Σύγκριση διάταξης γονιδίων *nif* των *Mesorhizobium loti* (NC 002678), *Clostridium acetobutylicum* (NC 003030), *Nostoc* sp. Strain 7120 (NC 003272) και *Chlorobium tepidum* TLS (NC 002932) (Zehr *et al.*, 2003).

Σχετικά με την επίδραση εμβολιασμού του *Clostridium* σε καλλιέργειες, αναφέρεται ότι το *Clostridium butyricum*, συνέβαλε στην ανάπτυξη χειμερινού σιταριού προμηθευόντάς το, με επιπλέον άζωτο, σε ελαφριά εδάφη της δυτικής Αυστραλίας. Στελέχη του *Clostridium* απομονώνονται συχνά από εδάφη ορυζώνων και έχει διαπιστωθεί ότι η δραστηριότητα τους αυξάνεται έπειτα από την επιστροφή των στελεχών ρυζιού, που αποκόπηκαν, στους ορυζώνες προκειμένου να αυξηθεί η αναλογία C/N. Εμβολιασμός με *Clostridium* σε καλλιέργειες ρυζιού έχει βρεθεί ότι αυξάνει την απόδοση των ορυζώνων όταν έχουν ενσωματωθεί στο έδαφος πηγές C. Ωστόσο, δεσμεύουν μόνο 5-10 mg αζώτου/g καταναλισκόμενου C, το οποίο ισοδυναμεί με 10-20 kg αζώτου/ εκτάριο από 20 τόνους διαθέσιμου C. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την απαραίτητη, για επιπλέον ενέργεια, ανάγκη προκειμένου να πραγματοποιηθεί αζωτοδέσμευση υπό αναερόβιες συνθήκες (Kennedy *et al.*, 2004).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι τα μέλη του γένους *Clostridium*, παρουσιάζουν κλινικό ενδιαφέρον διότι αποτελούν σημαντικά παθογόνα του ανθρώπου όπως το *C. tetani*, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη γνωστή σε όλους, σοβαρή ασθένεια τέτανος. Λόγω του σχηματισμού ανθεκτικών σπορίων (ανοχή ακόμα και σε βραστό νερό), μπορούν να απομονωθούν σχεδόν από κάθε είδος περιβάλλοντος, από λιωμένο πάγο της Ανταρκτικής, από όξινες ή αλκαλικές θερμές πηγές ακόμα και από άμμο ερημικών περιοχών. Το τυπικό είδος του γένους είναι το *Clostridium butyricum* (Wiegel *et al.*, 2006).

### 1.3.1.9 Φωτοσυνθετικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια

Οι Gest και Kammen (1949), διαπίστωσαν για πρώτη φορά την ικανότητα ορισμένων βακτηρίων, τόσο να φωτοσυνθέτουν όσο και να αζωτοδεσμεύουν. Έκτοτε, έχει αναγνωριστεί πλήθος αζωτοδεσμευτικών φωτοσυνθετικών βακτηρίων, τα οποία ανήκουν κυρίως στη ομάδα των πορφυρών μη θειικών βακτηρίων, ενώ ορισμένα μέλη ανήκουν στις ομάδες των πορφυρών θειοβακτηρίων (*Chromatium*), των πράσινων θειοβακτηρίων (*Chlorobium*) και της οικογένειας Heliobacteriaceae (Madigan, 1995).

Το μοναδικό διαθέσιμο ενζυμικό σύστημα των φωτοσυνθετικών βακτηρίων με την ικανότητα της δέσμευσης αζώτου, θεωρείτο για πολλά χρόνια η τυπική νιτρογενάση (Nif). Είναι πλέον όμως γνωστό, ότι η αζωτοδέσμευση μπορεί να

πραγματοποιηθεί και μέσω εναλλακτικής νιτρογενάσης απουσία μολυβδαινίου. Η νιτρογενάση σιδήρου (Anf) έχει χαρακτηριστεί στα πορφυρά μη θειικά βακτήρια *Rhodobacter capsulatus* και *Rhodospirillum rubrum*. Επίσης, φυσιολογικές ενδείξεις για την λειτουργία της υπάρχουν και για τα *Phaeospirillum fulvum* και *Leliobacterium gestii* (Madigan, 1995).

Κατά την αναερόβια αζωτοδέσμευση, η νιτρογενάση προφανώς να προστατεύεται από την επίδραση του O<sub>2</sub>, κατά την ίδια διαδικασία σε αερόβιες συνθήκες και απουσία φωτός, προκύπτει το πρόβλημα της προστασίας του ενζυμικού συμπλόκου από το O<sub>2</sub>. Συνεπώς, τα φωτοσυνθετικά βακτήρια πρέπει να προμηθεύονται με επαρκή ποσότητα οξυγόνου προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αναπνοή (παραγωγή ATP) και ταυτόχρονα να εμποδίζεται η ανασταλτική δράση του οξυγόνου επί της νιτρογενάσης (Madigan, 1995).

Τα φωτοσυνθετικά πορφυρά βακτήρια επιδεικνύουν αξιοσημείωτη μεταβολική ποικιλότητα. Είναι ικανά να αναπτύσσονται τόσο φωτοτροφικά (αναερόβια/παρουσία φωτός) όσο και στο σκοτάδι, είτε μέσω αναπνοής είτε μέσω ζύμωσης. Όλα τα πορφυρά μη θειικά βακτήρια αζωτοδεσμεύουν υπό φωτοετεροτροφικές συνθήκες, ωστόσο, ορισμένα πορφυρά βακτήρια αζωτοδεσμεύουν και ως αυτότροφα (Moreno, 1998). Η αναερόβια δέσμευση αζώτου, απουσία φωτός έχει παρατηρηθεί για πορφυρά μη θειικά βακτήρια και βακτήρια *Heliobacterium*, τα οποία σε συνθήκες σκότους συνεχίζουν να δεσμεύουν άζωτο και αναπτύσσονται αργά. Αντίθετα, δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι αναερόβια δέσμευση αζώτου απουσία φωτός συμβαίνει στα πορφυρά βακτήρια, στα *Chlorobium* και τα πράσινα θειοβακτήρια.

## I. Πορφυρά μη θειικά βακτήρια

Οι Madigan και συν. (1984) αναγνώρισαν ως αζωτοδεσμευτικά, 17 στελέχη τριών γενών της οικογένειας Rhodospirillaceae. Βάσει αποτελεσμάτων παλαιότερων μεθόδων ταξινόμησης προκαρυωτικών οργανισμών, όλα τα πορφυρά θειικά βακτήρια άνηκαν στην προαναφερθείσα οικογένεια. Με τις σύγχρονες όμως μοριακές μεθόδους τα περισσότερα, είτε έχουν μετονομαστεί, είτε έχουν μεταφερθεί σε άλλα γένη και οικογένειες (πίνακας 1.8).

Παλαιά ταξινόμηση Rhodospirillaceae	Νέα ταξινόμηση	Οικογένεια
<i>Rhodopseudomonas capsulate</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Rhodobacteriaceae
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Rhodobacteriaceae
<i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i>	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	-
<i>Rhodopseudomonas viridis</i>	<i>Blastochloris viridis</i>	Hyphomicrobiaceae
<i>Rhodopseudomonas blastica</i>	<i>Rhodobacter blasticus</i>	Rhodobacteraceae
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Bradyrhizobiaceae
<i>Rhodopseudomonas acidophila</i>	<i>Rhodoblastus acidophilus</i>	Bradyrhizobiaceae
<i>Rhodopseudomonas sulphidophila</i>	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>	Rhodobacteraceae
<i>Rhodopseudomonas globiformis</i>	<i>Rhodopila globiformis</i>	Acetobacteraceae
<i>Rhodopseudomonas sulfoviridis</i>	<i>Blastochloris sulfoviridis</i>	Hyphomicrobiaceae
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Rhodospirillaceae
<i>Rhodospirillum fulvum</i>	<i>Phaeospirillum fulvum</i>	Rhodospirillaceae
<i>Rhodospirillum molischianum</i>	<i>Phaeospirillum molischianum</i>	Rhodospirillaceae
<i>Rhodospirillum photometricum</i>	<i>Rhodospirillum photometricum</i>	Rhodospirillaceae
<i>Rhodospirillum salexigens</i>	<i>Rhodothalassium salexigens</i>	Rhodospirillaceae
<i>Rhodospirillum tenue</i>	<i>Rhodocyclus tenuis</i>	Rhodospirillaceae
<i>Rhodomicrobium vannielii</i>	<i>Rhodomicrobium vannielii</i>	Hyphomicrobiaceae

**Πίνακας 1.8.** Η παλιά και η νέα ταξινόμηση των 17 στελεχών πορφυρών μη θεικών βακτηρίων που αναφέρονται ως αζωτοδεσμευτικά φωτοσυνθετικά στελέχη στη δημοσίευση των Madigan και συν. Το *Rubrivivax gelatinosus* δεν έχει ταξινομηθεί ακόμα σε κάποια οικογένεια. (Madigan *et al.*, 1984, Euzéby, 1997: List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Last full update on January 12, 2011 by <http://www.bacterio.net>).

Αρχικά, τα πορφυρά μη θειικά βακτήρια, όντας μέλη της οικογένειας Rhodospirillaceae, ανήκαν στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων. Έπειτα, όμως, από τη μεταφορά ορισμένων στελεχών σε νέα taxa, ορισμένα πορφυρά μη θειικά βακτήρια περιλαμβάνονται πλέον, στην κλάση των β-Πρωτεοβακτηρίων. Κάποια από αυτά είναι τα *Rhodocyclus tenuis* (Rhodocyclaceae) (πρώην *Rhodospirillum tenue*), *Rhodoferax fermentans*, *Rhodoferax antarcticus* (Comamonadaceae) και το *Rubrivivax gelatinosus* (Burkholderiales) (Euzéby, 1997, Imhoff, 2006).

Τα πιο καλά μελετημένα φωτοσυνθετικά αλλά ταυτόχρονα και αζωτοδεσμευτικά είδη βακτηρίων, είναι τα *Rhodospirillum rubrum* (τυπικό είδος της οικογένειας Rhodospirillaceae) και το *Rhodobacter capsulatus* (τυπικό είδος της

οικογένειας Rhodobacteraceae). Και τα δύο αυτά είδη ανήκουν στην ομάδα των πορφυρών μη θεικών βακτηρίων (Roberts & Ludden, 1992, Euzéby, 1997). Επιπλέον, αζωτοδεσμευτικά φωτοσυνθετικά είδη χαρακτηρίζονται και τα *Rhodocista centenaria* (πρώην *Rhodospirillum centenum*) (Hartmann & Baldani, 2006) και το *Rhodobacter azotoformans* (Hsu & Buckley, 2009). Τα παραπάνω είδη ανήκουν στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων.

Το *Rba. capsulatus*, αποτελεί βακτήριο μοντέλο για τα φωτοσυνθετικά είδη που αζωτοδεσμεύουν. Το *Rba. capsulatus* είναι ικανό να αναπτύσσεται με πέντε διαφορετικούς τρόπους: φωτοαυτοτροφικά, φωτοετεροτροφικά, χημειοοργανοτροφικά μέσω αερόβιας αναπνοής, χημειοοργανοτροφικά μέσω ζύμωσης και χημειολιθοτροφικά με δότη ηλεκτρονίων το H<sub>2</sub> (δέκτης ηλεκτρονίων το O<sub>2</sub>). Αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται τουλάχιστον σε τέσσερις από τις παραπάνω συνθήκες (Madigan, 1995). Αναμφισβήτητα, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, η παρουσία μολυβδαινίου, το φως και το οξυγόνο, επηρεάζουν την αζωτοδεσμευτική ικανότητα που μπορούν να επιδείξουν τα βακτήρια (Maserohl *et al.*, 2002). Επιπλέον το στέλεχος *Rba. capsulatus* παρουσιάζει την ικανότητα ανάπτυξης, παρουσία πολλών πηγών αζώτου, όπως η αμμωνία, τα περισσότερα αμινοξέα, πουρίνες, ουρία, πολυαμίνες και μοριακό άζωτο (Maserohl *et al.*, 2002). Η αμμωνία είναι η προτιμώμενη πηγή αζώτου καθώς η δέσμευσή του, μια διαδικασία που απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας, εξαρτάται από τη διαθεσιμότητά της.

Ολοκληρώνοντας, διαθέτει δύο συστήματα νιτρογενάσης, την τυπική νιτρογενάση και μία εναλλακτική νιτρογενάση σιδήρου (Anf) (Betancourt *et al.*, 2008), όπως παρατηρείται στο *Rhodospirillum rubrum* και το *Rhodopseudomonas palustris*.

## II. Πορφυρά θειοβακτήρια (Chromatiaceae και Ectothiorhodospiraceae)

Τα μέλη της οικογένειας Chromatiaceae είναι κατά Gram<sup>-</sup>, κινητά φωτοσυνθετικά βακτήρια, τα οποία περιέχουν εσωτερικές φωτοσυνθετικές μεμβράνες. Ως φωτοσυνθετικές χρωστικές εντοπίζονται οι βακτηριοχλωροφύλλες α και β και ορισμένα καροτενοειδή. Απαντώνται κυρίως σε υδατικά περιβάλλοντα.

Παρόμοια χαρακτηριστικά παρουσιάζουν και τα μέλη του γένους *Ectothiorhodospira* (Ectothiorhodospiraceae, γ-Πρωτεοβακτήρια) (Imhoff, 2005). Η ιδιότητα της δέσμευσης αζώτου παρουσιάζεται σε ορισμένα taxa της οικογένειας



Chromatiaceae της κλάσης των γ-Πρωτεοβακτηρίων.

Ως αζωτοδεσμευτικά μέλη του γένους *Chromatium*, αναφέρονται τα: *Allochromatium vinosum*, *Allochromatium minutissimum* και *Allochromatium warmingii*, *Marichromatium gracile*, *Thiocystis minor*, *Thiocystis violascens* και *Thiocystis violacea*, *Thiocapsa roseopersicina* (το πιο διαδεδομένο στέλεχος, (Madigan, 1995, Euzéby, 1997)), *Thiocapsa rosea*, *Thiococcus pfennigii* και *Lamprobacter modesohalophilus*.

Το στέλεχος *Allochromatium vinosum* (πρώην *Chromatium vinosum*) έχει μελετηθεί εκτενώς για τις αζωτοδεσμευτικές του ικανότητες και είναι το πρώτο φωτοσυνθετικό βακτήριο στο οποίο έχουν παρατηρηθεί διαρκώς ενεργά αζωτοδεσμευτικά εκχυλίσματα άνευ κυττάρων. Σε *in vivo* μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι ο οργανισμός αυτός είναι εξοπλισμένος με το σύστημα “switch off”, παρουσία αμμωνίας, προκειμένου να ελέγχεται αποτελεσματικά η δραστηριότητα της νιτρογενάσης, όπως συμβαίνει και στα πορφυρά μη θειικά βακτήρια.

Τα είδη της οικογένειας Ectothiorhodospiraceae που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν άζωτο ανήκουν στο γένος *Ectothiorhodospira*. Τα στελέχη στα οποία η αζωτοδεσμευτική τους ικανότητα είναι επιβεβαιωμένη είναι τα: *Ectothiorhodospira mobilis* (στο οποίο έχει ενσωματωθεί το *Ect.marismortui*) και *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* (στο οποίο έχει ενσωματωθεί το *Ect. vacuolata*).

### III. Πράσινα θειοβακτήρια (οικογένεια Chlorobiaceae, φύλο Chlorobi)

Τα πράσινα θειοβακτήρια είναι υποχρεωτικά αναερόβια, αυστηρά φωτοτροφικά και ικανά για φωτολιθοαυτοτροφική ανάπτυξη με ενώσεις που περιέχουν θείο ως δότη ηλεκτρονίων (Overmann, 2005). Απομονώνονται κυρίως από υδατικά περιβάλλοντα και αναπτύσσονται φωτοσυνθετικά υπό ανοξικές συνθήκες. Οι δότες ηλεκτρονίων για τη φωτοσυνθετική αφομοίωση CO<sub>2</sub> είναι, είτε ανηγμένες θειώδεις ενώσεις, είτε μοριακό υδρογόνο. Τα πράσινα θειοβακτήρια διαθέτουν, όπως και τα πορφυρά βακτήρια, το σύστημα “switch off”, παρουσία αμμωνίας, για τη ρύθμιση της δραστηριότητας της νιτρογενάσης, το οποίο είναι αντιστρέψιμο. Ορισμένα από τα είδη της οικογένειας Chlorobiaceae, στα οποία έχει διαπιστωθεί η αζωτοδεσμευτική τους ικανότητα, είναι τα: *Chlorobium phaeobacteroides*, *Chl. limicola*, *Chl. limicola f. sp. thiosulfatophilum*, *Chl. luteonum*, *Chl. clathratiforme*, *Prosthecochloris aestaurii*, *Chlorobaculum tepidum* και *Chloroherpeton thalassium*

(Madigan, 1995, Euzéby, 1997, Overmann, 2005).

Το θερμοφίλο πράσινο θειοβακτήριο *Chlorobaculum tepidum* (πρώην *Chlorobium tepidum*), επιδεικνύει εξαιρετικές αζωτοδεσμευτικές ικανότητες και ο χρόνος που απαιτείται για μία γενιά, παρουσία αμμωνίας, είναι μόλις δύο ώρες (Madigan, 1995). Δεσμεύει άζωτο σε πολύ μεγάλες θερμοκρασίες, μέχρι 60 °C, αλλά η βέλτιστη θερμοκρασία για τη δραστηριότητα της νιτρογενάσης είναι 48 °C (Wahlund & Madigan, 1993). Επίσης, σε δημοσιεύσεις για το στέλεχος *Chl. limicola*, αναφέρεται υψηλή δραστηριότητα νιτρογενάσης *in vivo*, ενώ όταν πηγή αζώτου είναι το γλουταμικό παρατηρείται αναστολή της νιτρογενάσης και δεν φωτοπαράγεται H<sub>2</sub> (Madigan, 1995).

#### IV. Πράσινα μη θειικά βακτήρια

Τα πράσινα μη θειικά βακτήρια δεν παρουσιάζουν στενή φυλογενετική σχέση με τα πράσινα θειοβακτήρια, παρά τις ομοιότητες που έχουν, όσον αφορά το φαινότυπο και την παραγωγή χλωροσωμάτων

Η αζωτοδεσμευτική ικανότητα δεν είναι διαδεδομένη στο φύλο Chloroflexi. Αζωτοδέσμευση έχει διαπιστωθεί μόνο στο στέλεχος *Oscillochloris trichoides* (Oscillochloridaceae), ενώ ενδείξεις για δραστηριότητα νιτρογενάσης υπάρχουν για το *Chloroflexus aurantiacus* (“Chloroflexaceae”) (Madigan, 1995).

#### V. Heliobacteriaceae (ηλιοβακτήρια)

Τα ηλιοβακτήρια είναι αυστηρώς αναερόβια, γνωστά ως οι μοναδικοί φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που ανήκουν στα ενδοσποριογονικά, κατά Gram<sup>+</sup> βακτήρια χαμηλού ποσοστού G+C. Αναπτύσσονται κυρίως σε εδάφη ορυζώνων, ενώ ταυτόχρονα έχουν απομονωθεί και από θερμές πηγές και λίμνες.

Εκτός από τις μοναδικές φωτοσυνθετικές ιδιότητές τους, τα ηλιοβακτήρια έχουν αρκετές διαφορές από άλλους αναερόβιους, ανοξικούς, φωτότροφους οργανισμούς. Όσον αφορά στον μεταβολισμό άνθρακα, είναι υποχρεωτικά ετερότροφα. Αναπτύσσονται, είτε φωτοετεροτροφικά (ανοξικά παρουσία φωτός) σε ορισμένα οργανικά υποστρώματα, είτε μέσω ζύμωσης πυρουβικού σε σκότος. Η αυτότροφη ανάπτυξη, η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό των φωτοσυνθετικών οργανισμών, δεν έχει παρατηρηθεί σε καμία καλλιέργεια ηλιοβακτηρίων ως τώρα. Τέλος, τα ηλιοβακτήρια είναι τα μοναδικά βακτήρια του φύλου Firmicutes που

ταυτόχρονα φωτοσυνθέτουν και παράγουν ενδοσπόρια (Matthew & Sattley *et al.*, 2008).

Παρουσιάζουν εξαιρετική απόδοση δέσμευσης αζώτου και θεωρείται ότι συμβάλλουν, σε μέγιστο βαθμό, στον εφοδιασμό των ορυζώνων με άζωτο (Enkh-Amagalan *et al.*, 2006). Η αζωτοδέσμευση στα ηλιοβακτήρια ρυθμίζεται επιπλέον από το σύστημα “switch off” παρουσία αμμωνίας (Leigh, 2000).

Η οικογένεια Heliobacteriaceae περιλαμβάνει τέσσερα γένη των οποίων τα στελέχη είναι όλα αζωτοδεσμευτικά. Τα είδη ηλιοβακτηρίων είναι τα εξής: *Heliobacterium chlorum*, *Hbt. gestii*, *Hbt. modesticaldum*, *Heliobacillus mobilis*, *Heliophilum fasciatum* και *Heliorestis daurensis*.

Το *Hbt. gestii* περιέχει μία εναλλακτική νιτρογενάση και συγκεκριμένα τη νιτρογενάση σιδήρου (Anf) (Betancourt *et al.*, 2008). Πιθανώς, η εναλλακτική νιτρογενάση να προσδίδει πλεονέκτημα στο *Hbt. gestii*, διότι το έδαφος των ορυζώνων είναι πλούσιο σε σίδηρο, ενώ άλλα στοιχεία, όπως το μολυβδαίνιο και το βανάδιο, αποπλένονται (Madigan, 2006).

Πρόσφατα, απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε η ομάδα γονιδίων *nif*, του τυπικού είδους των ηλιοβακτηρίων, του *Hbt. chlorum*. Η ομάδα αποτελείται από έντεκα γονίδια με τον ίδιο προσανατολισμό εντός μιας περιοχής 10kb και παρουσιάζει ομοιότητες με άλλους, αυστηρά αναερόβιους, αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς (Enkh-Amagalan *et al.*, 2006).

#### 1.3.1.10 Archaea (Αρχαιοβακτήρια)

Πιστεύεται ότι σχηματίστηκαν στην ηφαιστιογενή περίοδο για να προστατέψουν μικρές μορφές γενετικού υλικού. Έχουν χαρακτηριστεί περίπου 500 είδη αρχαιοβακτηρίων, αλλά πιστεύεται ότι υπάρχουν πολλά ακόμη.

Είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί με μεγάλες φυλογενετικές διαφορές από τα βακτήρια. Το κυτταρικό τοίχωμα, η κυτταρική μεμβράνη και το rRNA τους, είναι διαφορετικά. Επιπλέον, η κυτταρική τους μεμβράνη έχει λιπίδια που δεν βρίσκονται σε άλλους οργανισμούς. Δεν έχουν πεπτιδογλυκάνη. Δεν αναστέλλονται από αντιβιοτικά. Τέλος, ζουν σε ακραίες θερμοκρασίες και περιβαλλοντικές συνθήκες.

Είναι αβιοτικά και δεν αναπτύσσονται παρουσία O<sub>2</sub>. Εντοπίζονται σε ποικίλα ανοξικά περιβάλλοντα, όπως ιζήματα, πλημμυρισμένα εδάφη, γαστροεντερικές οδοί ζώων, αναερόβιοι βιοαντιδραστήρες και γεωθερμικές πηγές (Lobo & Zinder, 1992)

Διακρίνονται σε 3 ομάδες με βάση το περιβάλλον στο οποίο ζουν.

- 1) *Thermoacidophiles*: Ζουν σε εξαιρετικά υψηλές θερμοκρασίες (>100 °C!) και όξινο περιβάλλον (pH <2).
- 2) *Methanogens* (αυστηρά αναερόβια, παράγουν μεθάνιο). Χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία στον καθαρισμό λημμάτων και νερού.
- 3) *Extreme Halophiles*: Αναπτύσσονται σε ιδιαίτερα υπέρτονες συνθήκες (χρησιμοποιούν αλάτι για την παραγωγή ATP)

Στην κατηγορία των αρχαιοβακτηρίων περιλαμβάνονται βακτήρια τα οποία έχουν την ικανότητα να παράγουν μεθάνιο χρησιμοποιώντας ορισμένα απλά υποστρώματα, η πρώτη αναφορά της οποίας έγινε στις αρχές της δεκαετίας του '90 (Lobo & Zinder, 1992). Παρόλα αυτά, πέρασαν αρκετά χρόνια μέχρι να ανακαλυφθεί, ότι ορισμένα μεθανογόνα της κατηγορίας των αρχαιοβακτηρίων είναι αζωτοδεσμευτικά (Kessler *et al.*, 1997). Σχεδόν όλα τα μεθανογόνα μπορούν να χρησιμοποιήσουν H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> και τα περισσότερα μυρμηγκικό, ως δότη ηλεκτρονίων για την αναγωγή CO<sub>2</sub>.

Τα μεθανογόνα βακτήρια ανήκουν στη συνομοταξία Euryarchaeota και παρουσιάζουν συγγένεια, τόσο με βακτήρια του ίδιου φύλου, όπως βακτήρια της τάξης Halobacteria τα οποία επιβιώνουν σε ακραίες συγκεντρώσεις άλατος, όσο και με ορισμένα θερμόφιλα είδη τα οποία δεν αζωτοδεσμεύουν.

Έρευνες έχουν δείξει ότι μόνο τα *Methanococcus maripaludis* και *Methanococcus thermolithotrophicus*, της τάξης των Methanococcales, αζωτοδεσμεύουν. Εν αντιθέσει, στα *Methanococcus voltae* και *Methanocaldococcus jannaschii*, παρόλο που έχουν ομόλογες *nifH* ακολουθίες, δεν έχει παρατηρηθεί αζωτοδεσμευτική ικανότητα. Οι τάξεις Methanomicrobiales, Methanosarcinales και Methanobacteriales, περιλαμβάνουν τα εξής αζωτοδεσμευτικά βακτήρια: *Methanospirillum hungatei*, *Methanosarcina barkeri* και *Methanobacterium bryantii* αντίστοιχα (Leigh 2000). Τέλος, έχει αναφερθεί και η ανάλυση του γονιδίου *nifD* για ορισμένα είδη βακτηρίων, όπως τα *Methanothermobacter thermautotrophicus*, *Methanosarcina acetivorans* και *Methanosarcina mazei* (Henson *et al.*, 2004).

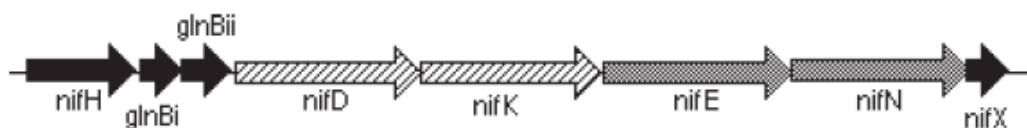
Η νιτρογενάση των αρχαιοβακτηρίων παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με αυτή των ευβακτηρίων, καθώς και ορισμένα ευρήματα στη δομή των οπερονίων τους φανερώνει την εξελικτική τους σχέση. Πέραν των ομοιοτήτων τους, εμφανίζουν ορισμένες σημαντικές διαφορές, αναφορά των οποίων γίνεται παρακάτω.

Η αναγωγή της νιτρογενάσης (*nifH*) είναι ομοτετραμερές και όχι ομοδιμερές (Leigh, 2000). Μια άλλη εξίσου σημαντική διαφορά εντοπίζεται στην οργάνωση των έξι γονιδίων *nif*, κατά την οποία τα γονίδια αυτά είναι συγκεντρωμένα σε ένα οπερόνιο. Ανάμεσα στο *nifH* και τα άλλα *nif*, παρεμβάλλονται δύο γονίδια *glnBi* και *glnBii* τα οποία κωδικοποιούν για τη ρυθμιστική πρωτεΐνη ΡΙΙ (σχήμα 1.15).

Επιπλέον, η μεταγραφή των γονιδίων *nif* πραγματοποιείται από προαγωγείς οι οποίοι είναι τυπικοί των αρχαίων και δεν παρουσιάζουν ομοιότητες με αυτούς των ευβακτηρίων (Kessler *et al.*, 1998).

Πρόσφατες έρευνες, αποκάλυψαν την παρουσία και της εναλλακτικής νιτρογενάσης βαναδίου (*Vnf*) στο στέλεχος *Methanosarcina barkeri* 227, γεγονός που ήρθε να ανατρέψει τη μέχρι τότε θεωρία, ότι η νιτρογενάση η οποία είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του αζώτου στα αρχαιοβακτήρια ήταν μόνο η τυπική νιτρογενάση (*Nif*), όπως και στα ευβακτήρια. Για τα γονίδια *nifH1* και *nifH2*, τα οποία είχαν αναγνωριστεί στο οπερόνιό του - όπως και σε αυτό των άλλων μεθανογόνων, προτάθηκε η μετονομασία τους σε *nif* και *vnf*, αντίστοιχα (Chien *et al.*, 2000). Εναλλακτική νιτρογενάση επίσης αναφέρεται και για το *Methanosarcina acetivorans* (Betancourt *et al.*, 2008).

Η ρύθμιση της μεταγραφής δεν αφορά ρύθμιση του γονιδίου *nifA*, όπως εντοπίζεται στα περισσότερα Πρωτεοβακτήρια. Η ρύθμιση της μεταγραφής πραγματοποιείται μέσω καταστολής στο *M. Maripaludis* (Leigh, 2000). Όσον αφορά στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της αζωτοδέσμευσης, το σύστημα ρύθμισης “switch off” παρουσία αμμωνίας, είναι παρόν και στα αζωτοδεσμευτικά αρχαία. Όμως, στα μεθανογόνα βακτήρια δε φαίνεται να εμπλέκεται ADP-ριβοςυλίωση όπως συμβαίνει στα ευβακτήρια (Leigh, 2000, Enkh-Amgalan *et al.*, 2006).



Σχήμα 1.15. Οργάνωση οπερονίου *nif* του *Methanococcus maripaludis* (Leigh, 2000).

### 1.3.1.11 Θειοαναγωγικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια

Θειοαναγωγικά βακτήρια, καλούνται οι μικροοργανισμοί οι οποίοι ανάγουν θειικά ιόντα ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) προς θειούχα ( $\text{S}^{2-}$ ). Πρόκειται για υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια τα οποία εντοπίζονται κυρίως σε λιμνάζοντα ύδατα και ιζήματα θαλάσσιων περιοχών καθώς και σε μολυσμένα περιβάλλοντα (Gibson, 1990). Τα βακτήρια αυτά έχουν ιδιαίτερη περιβαλλοντική σημασία και δεν αποτελούν παθογόνα του ανθρώπου.

Τα θειοαναγωγικά βακτήρια που παρουσιάζουν αζωτοδεσμευτικές ιδιότητες ανήκουν σε δύο κλάσεις: τα δ-Πρωτεοβακτήρια και την κλάση Firmicutes (πρώην Gram<sup>+</sup> χαμηλού ποσοστού G+C). Τα βακτήρια τα οποία ανήκουν στην πρώτη αναφερθείσα κλάση και παρουσιάζουν τη δραστηριότητα της νιτρογενάσης είναι τα: *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio salexigens*, *Desulfovibrio gigas* (απομόνωση από ριζόσφαιρα ρυζιού), *Desulfobacter latus*, *Desulfobacter curvatus*, *Desulfomicrobium baculatum*, *Desulfonema limicola* (απομόνωση από ρίζες παραθαλάσσιων τροπικών δέντρων). Τα θειοαναγωγικά βακτήρια που ανήκουν στην κλάση Firmicutes (τάξη Clostridiales) και παρουσιάζουν δραστηριότητα νιτρογενάσης είναι τα: *Desulfotomaculum reducens* και *Desulfosporosinus orientis* (Lovell *et al.*, 2000, Zehr *et al.*, 2003, Flores-Mireles *et al.*, 2007, Sarita *et al.*, 2008). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα *Desulfosporosinus orientis* και *Desulfotomaculum*, αν και ανήκουν στα Firmicutes, είναι Gram<sup>-</sup> (Spring & Rosenzweig, 2006, Widdel, 2006).

### 1.3.1.12 Μεθανοτροφικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια

Τα μεθανοτροφικά βακτήρια είναι μία ομάδα οργανισμών που κατέχουν έναν υψηλά εξειδικευμένο μεταβολισμό, περιορισμένο στο να καταβολίζει μόνο μεθάνιο και μεθανόλη.

Εξ ορισμού, είναι υποχρεωτικά μεθυλοτροφικοί οργανισμοί και δεν έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσονται σε υποστρώματα οργανικών ενώσεων με δεσμούς C-C. Περιβάλλοντα στα οποία εντοπίζεται η παρουσία μεθανοτροφικών βακτηρίων είναι, τα λασπώδη έλη, ιζήματα γλυκών υδάτων, εδάφη λειμώνων και φυλλοβόλων δασών καθώς και οι ορυζώνες, ενώ σε γενικές γραμμές δεν έχουν απομονωθεί από ακραία περιβάλλοντα όπως είναι τα υπεραλκαλικά (Bowman, 2006).

Τα μεθανοτροφικά βακτήρια χωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες, την I και II. Η πρώτη περιλαμβάνει δύο επιμέρους ομάδες, την τύπου I και X, τα μέλη των οποίων ανήκουν στην οικογένεια Methylococcaceae, στη  $\gamma$  κλάση των Πρωτεοβακτηρίων. Αζωτοδεσμευτικά μεθανοτροφικά βακτήρια εντοπίζονται σε ορισμένα μέλη της ομάδας I, τα οποία είναι: *Methylococcus*, *Methylosphaera* και σε ορισμένα είδη του *Methylomonas* (*M. fodinarum*, *M. aurantiaca* και *M. methanica* - ορισμένα στελέχη) (Bowman, 2005, Bowman, 2006). Η ομάδα II περιλαμβάνει βακτήρια της οικογένειας Methylocystaceae, η οποία ανήκει στα  $\alpha$ -Πρωτεοβακτήρια. Αζωτοδέσμευτική ικανότητα παρατηρείται και στα δύο γένη της οικογένειας Methylocystaceae, στο *Methylosinus* και στο *Methylocystis*.

### 1.3.1.13 *Vibrio*

Το πολυμελές γένος *Vibrio*, το οποίο ανήκει στα  $\gamma$ -Πρωτεοβακτήρια, περιλαμβάνει μικρά, κατά Gram<sup>-</sup>, ευθέα ή κυρτά, ραβδόμορφα βακτήρια με μονά ή πολλαπλά πολικά μαστίγια και σε στερεά μέσα, ορισμένα είδη αναπτύσσουν και πλευρικά. Πρόκειται για προαιρετικά αναερόβιους οργανισμούς, με δυνατότητα μεταβολισμού με ζύμωση ή αναπνοή. Απομονώνονται κυρίως από ύδατα, ανάλογα με τη συγκέντρωση Na<sup>+</sup>, τα διαθέσιμα θρεπτικά στοιχεία και τη θερμοκρασία.

Σε λίγα μόνο είδη του γένους *Vibrio*, έχει παρατηρηθεί αζωτοδεσμευτική ικανότητα, τα οποία είναι τα: *Vibrio diazotrophicus*, *Vibrio natriegens*, *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio pelagius* (έχει προταθεί το όνομα *Listonella pelagia*) (Urdaci *et al.*, 1988, Farmer *et al.*, 2005), *V. campbellii* (Holguin *et al.*, 1992), *Vibrio posteresiae* (Rameshkumar *et al.*, 2008) και *Vibrio parahaemolyticus* (Criminger *et al.*, 2007). Δώδεκα από τα είδη του γένους αποτελούν κλινικές απομονώσεις, εκ των οποίων τα έντεκα αντιπροσωπεύουν σημαντικά παθογόνα του ανθρώπου όπως τα *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cincinnatiensis* και *Vibrio cholerae* (τυπικό είδος), το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρόκληση της ασθένειας χολέρας (Farmer *et al.*, 2005).

### 1.3.1.14 *Magnetospirillum* και *Geobacter*

Ικανότητα αζωτοδέσμευσης παρουσιάζουν ορισμένα μέλη των μεταλλοαναγωγικών βακτηρίων των γενών *Magnetospirillum*, οικογένεια Rhodospirillaceae (α-Πρωτεοβακτήρια) και *Geobacter*, οικογένεια Geobacteraceae (δ-Πρωτεοβακτήρια).

Το είδος *Magnetospirillum magnetotacticum* ήταν γνωστό ως *Aquaspirillum magnetotacticum* και είναι ικανό να δεσμεύει ατμοσφαιρικό άζωτο. Το έτερο είδος του γένους, το *Magnetospirillum gryphiswaldense* είναι επίσης αζωτοδεσμευτικό. Το γένος παρουσιάζει συγγένεια με τα *Rhodospirillum* και, πιθανώς, να έχουν ομόλογα *nifHDK*. Αξίζει επίσης να σημειωθεί, ότι τα αζωτοδεσμευτικά, αναερόβια *Geobacter metallireducens* και *Geobacter sulfurreducens*, αποτελούν μοντέλα για την έρευνα αναγωγής τρισθενούς σιδήρου σε ιζηματογενή περιβάλλοντα (Bazylinski *et al.*, 2000, Methé *et al.*, 2005).

Τα *Magnetospirillum* και *Geobacter* απαντώνται σε ιζηματογενή περιβάλλοντα τα οποία περιλαμβάνουν, τόσο όρια οξικών-ανοξικών νερών, εκβολών ποταμών και αλατούχα έλη, όπου τα μαγνητοτακτικά βακτήρια είναι κοινά, όσο και εδαφικά διαλύματα μολυσμένα με πετρελαϊκά παράγωγα, όπου βακτήρια αναγωγής τρισθενούς σιδήρου είναι πολύ σημαντικά στην αποδόμηση αρωματικών υδρογονανθράκων (Bazylinski, *et al.*, 2000).

Η αζωτοδεσμευτική ικανότητα των *Magnetospirillum* και *Geobacter* πιθανώς να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε βιογεωχημικές διαδικασίες, όπως η παραγωγή  $Fe_3O_4$  (μαγνητίτης) και  $Fe_3S_4$  και η οξείδωση οργανικής ύλης σε συνδυασμό με αναγωγή τρισθενούς σιδήρου και τετρασθενούς ουρανίου ή άλλων μετάλλων, σε περιβάλλοντα πτωχά σε άζωτο.

Για παράδειγμα, σε υδροφόρους ορίζοντες μολυσμένους με πετρελαϊκά παράγωγα δεν παρατηρείται ανηγμένο άζωτο, οπότε δεν ευνοείται και η ανάπτυξη βακτηρίων. Η παρουσία (ως 80%) όμως στελεχών *Geobacter* σε τέτοια περιβάλλοντα, υποδεικνύει ότι αυτά τα βακτήρια έχουν αποκτήσει το πλεονέκτημα της αζωτοδέσμευσης και μπορούν να ανταγωνιστούν ικανοποιητικά άλλα μεταλλοαναγωγικά είδη που δεν αζωτοδεσμεύουν σε αυτές τις συνθήκες (όπως είναι τα *Shewanella oneidensis* και *Geothrix fermentans*) (Holmes *et al.*, 2004, Methé *et al.*, 2005). Αυτό μπορεί να ισχύει και για την περίπτωση των μαγνητοτακτικών βακτηρίων, τα οποία αποκτούν πλεονέκτημα σε όρια οξικών-ανοξικών περιβαλλόντων και είναι οι κυρίαρχοι



οργανισμοί λόγω του επιτυχούς ανταγωνισμού για άζωτο και άλλα στοιχεία (Bazylinski *et al.*, 2000).

#### 1.3.1.15 *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*)

Παλαιότερα, τα στελέχη του γένους *Thiobacillus*, ταξινομούνταν ως α-, β- ή γ-Πρωτεοβακτήρια. Σήμερα, με τη βοήθεια μοριακών αναλύσεων, βάσει του γονιδίου 16S rRNA, διαπιστώθηκε ότι το *Acidithiobacillus ferrooxidans* ανήκει στα γ-Πρωτεοβακτήρια (Kelly & Wood, 2000). Αποτέλεσμα αυτού, ήταν η μεταφορά (σχετικά πρόσφατα) του συγκεκριμένου στελέχους στο γένος *Acidithiobacillus*, με νέα πλέον ονομασία *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Πρόκειται για κατά Gram<sup>-</sup>, ραβδόμορφο, κινητό με πολικό μονό μαστίγιο, υποχρεωτικά οξύφιλο και αερόβιο βακτήριο. Αναπτύσσεται σε pH από 1,3-4,5 (άριστο 2,5). Είναι αυτοτροφικό και υπό συνθήκες έλλειψης CO<sub>2</sub> είναι υποχρεωτικά χημειολιθοαυτοτροφικό (Kelly & Wood, 2005). Εξασφαλίζει τον απαιτούμενο άνθρακα μέσω δέσμευσης ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> και η απαιτούμενη ενέργεια προέρχεται, είτε από οξείδωση δισθενούς σιδήρου προς τρισθενή, είτε από οξείδωση ανηγμένων θειούχων ενώσεων προς θειικό οξύ (Pretorius *et al.*, 1987).

Η πρώτη αναφορά περί αζωτοδεσμευτικής ικανότητας του *Acidithiobacillus ferrooxidans*, εντοπίζεται το 1978 και η πρώτη αλληλούχηση γονιδίων *nif*, το 1987 (Pretorius *et al.*, 1987). Μέχρι σήμερα, τα μόνα οξύφιλα βακτήρια στα οποία εντοπίζεται η ικανότητα αζωτοδέσμευσης, είναι το *A. ferrooxidans*, το *Leptospirillum ferrooxidans* και το *Leptospirillum ferrodiazotrophum* (κλάση Nitrospiral) (Tyson *et al.*, 2005).

Το στέλεχος *A. ferrooxidans* απαντάται σε πολλά περιβάλλοντα παγκοσμίως, όπου διατίθενται σίδηρος και θείο προς οξείδωση και, κυρίως, σε όξινα στραγγιζόμενα νερά μεταλλωρυχείων και ανθρακωρυχείων, τα οποία έχουν εγκαταλειφθεί (σχήμα 1.16α). Λόγω των ακραίων συνθηκών που απαιτεί για την ανάπτυξή του, το *Acidithiobacillus ferrooxidans* δεν έχει μεγάλη σημασία για την γεωργία. Αντίθετα, βρίσκει ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται σε ανάκτηση μετάλλων, κυρίως από υδατικά διαλύματα στον τομέα της μεταλλουργίας. Η τεχνική αυτή ονομάζεται βιοεκχύλιση (bioleaching) και ευθύνεται για το 10% της παραγωγής χαλκού παγκοσμίως (σχήμα 1.16β). Η βιοεκχύλιση, μέρος

της επιστήμης της βιοϋδρομεταλλουργίας, χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάκτηση και άλλων μετάλλων, όπως μολυβδαινίου, ψευδαργύρου και λοιπών.



**Σχήμα 1.16.** α. Όξινα στραγγιζόμενα νερά προερχόμενα από πυριτικά μεταλλεύματα εγκαταλειμμένου ορυχείου προ-ρωμαϊκής εποχής (Rio Tinto, Ισπανία), β. Εμπορική εφαρμογή βιοεκχύλισης σε σωρό για ανάκτηση χαλκού (Valdés *et al.*, 2008).

Λόγω του γεγονότος ότι η αζωτοδέσμευση είναι μια ενεργοβόρος διαδικασία, πρέπει να γίνουν κατανοητές οι διαδικασίες και η φυσιολογία της αζωτοδέσμευσης στο *A. ferrooxidans*, προκειμένου να διευκρινιστεί κατά πόσο εμποδίζει και ανταγωνίζεται η δέσμευση ατμοσφαιρικού αζώτου την βιοεκχύλιση (Valdés *et al.*, 2008).

### 1.3.1.16 Άλλοι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί

Εκτός των προαναφερθέντων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, υπάρχουν στελέχη στα οποία εντοπίζεται η ικανότητα της αζωτοδέσμευσης, στοιχεία των οποίων είναι περιορισμένα, είτε λόγω περιορισμένων δημοσιεύσεων, είτε λόγω έλλειψης ιδιαίτερης σημασίας για τη γεωργία.

Παρακάτω γίνεται μια απλή αναφορά των συγκεκριμένων στελεχών.

- *Zymomonas sp* (Sphingomonadales, α-Πρωτεοβακτήρια) (Schmid & Hartmann, 2007).
- *Ideonella* (Burkholderiales, β-Πρωτεοβακτήρια) (Schmid & Hartmann, 2007).
- *Sphingomonas azotifigens* (Sphingomonadales, α-Πρωτεοβακτήρια) απομονωμένο από ρύζι. Η ονομασία *Rhizomonas* δεν είναι αποδεκτή και τα είδη έχουν μεταφερθεί στο γένος *Sphingomonas* (Euzéby, 1997, Xie & Yokota, 2006).

- *Pelomonas saccharophila* (πρώην *Pseudomonas saccharophila*) (Xie & Yokota, 2005b).
- *Trichodesmium thiebautii* (Lovell *et al.*, 2000) (ταξινομικά ανήκει στο γένος *Oscillatoria*, Κυανοβακτήρια).
- *Beggiatoa* (Thiotrichaceae, γ-Πρωτεοβακτήρια) (Nelson *et al.*, 1982).

### 1.3.2 Ενδοφυτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια

Ο όρος «ενδοφυτικά βακτήρια» περιλαμβάνει βακτήρια, τα οποία είναι ικανά, σε κάποια φάση της ανάπτυξής τους, να αποικίσουν το εσωτερικό των φυτών χωρίς να προκαλέσουν ορατή βλάβη (Baldani & Baldani, 2005). Τα πιο μελετημένα ενδοφυτικά στελέχη ανήκουν στα γένη *Gluconacetobacter*, *Azoarcus* και *Herbaspirillum* (Franche *et al.*, 2008).

Πρακτικά, είναι τα βακτήρια που μπορούν να απομονωθούν από φυτικούς ιστούς οι οποίοι έχουν απολυμανθεί εξωτερικά και διακρίνονται σε υποχρεωτικά και προαιρετικά ενδοφυτικούς οργανισμούς. Τα βακτήρια της πρώτης κατηγορίας εντοπίζονται αυστηρά, στο εσωτερικό των φυτών, εκτός από ιδιαίτερες περιπτώσεις μετάδοσής τους από φυτό σε φυτό ή από φυτό σε έντομο και κατόπιν πάλι σε φυτό. Αντιθέτως, οι προαιρετικά ενδοφυτικοί οργανισμοί είναι δυνατό να αναπτύσσονται εντός του φυτού ή σε άλλα περιβάλλοντα. Συνήθως, αυτά τα βακτήρια προέρχονται από το έδαφος, εισέρχονται στο φυτό, μέσω των σημείων έκπτυξης πλάγιων ριζικών τριχιδίων, και πολλαπλασιάζονται διασυστηματικά (Hardoim *et al.*, 2008), γεγονός που δικαιολογεί τον χαρακτηρισμό του κύκλου ζωής τους, ως διασυστηματικός (εναλλάσσεται μεταξύ φυτών και εδάφους). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του *Azoarcus*, στην οποία σημαντικό ρόλο στην αποίκιση της επιφάνειας της ρίζας έχουν τα τριχίδια (pili) τύπου IV, ενώ στη διασυστηματική εξάπλωση εμπλέκονται υδρολυτικά ένζυμα, τα οποία υποβοηθούν τη διείσδυση στους ιστούς (Franche *et al.*, 2008). Επιπλέον χρησιμοποιείται, όχι ευρέως, ο όρος διερχόμενα (passenges) ενδοφυτικά βακτήρια, ο οποίος αναφέρεται σε βακτήρια που εισέρχονται στο φυτό συμπτωματικά και απουσία επιλεκτικών δυνάμεων διατηρούνται εκεί (Hardoim *et al.*, 2008).

Σχετικά πρόσφατα, προτάθηκε ο όρος ανταγωνιστικά (competent) ενδοφυτικά

βακτήρια, ο οποίος αναφέρεται σε οργανισμούς που αποικίζουν επιτυχώς το φυτό, εισβάλλοντας ενεργά στον φυτικό ιστό και έχουν την ικανότητα να διαμορφώνουν τη φυσιολογία του. Επιλέγονται “μεροληπτικά”, οδηγώντας σε διατήρηση της σχέσης φυτού-μικροβίου ώστε να αποβαίνει ευεργετική. Ο όρος αυτός διαφέρει από τον όρο “ευκαιριακά” ή “οπορτουμιστικά” βακτήρια, τα οποία είναι ανταγωνιστικά βακτήρια της ριζόσφαιρας, δύναται να εισχωρήσουν στο φυτό συμπτωματικά, αλλά δε διαθέτουν γονίδια τα οποία να εγγυώνται την επιτυχία της σχέσης φυτού-βακτηρίου (Hardoim *et al.*, 2008).

### 1.3.2.1 *Gluconacetobacter*

Το γένος *Gluconacetobacter* ανήκει στην οικογένεια Acetobacteraceae. Περιλαμβάνει τέσσερα αζωτοδεσμευτικά είδη: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, το οποίο είναι και το πιο σημαντικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο της οικογένειας, *G. azotocaptans*, *G. johannae* (η ονομασία του οποίου δόθηκε προς τιμήν της Johanna Döbereiner) και *Gluconacetobacter kombuchae* (Baldani & Baldani, 2005, Pedraza, 2008, Saravanan *et al.*, 2008).

Το είδος *G. diazotrophicus* είναι Gram<sup>-</sup>, υποχρεωτικά αερόβιο βακτήριο, παρουσιάζει αντοχή σε χαμηλό pH (3,0- άριστο 5,5) και ανήκει στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων (τάξη Rhodospirillales) (Saravanan *et al.*, 2008). Τα κύτταρά του είναι ευθέα ραβδία με στρογγυλά άκρα, τα οποία στο μικροσκόπιο παρατηρούνται μεμονωμένα, σε ζεύγη ή σε αλυσιδωτές δομές. Το συγκεκριμένο στέλεχος αναπτύσσεται σε διαλύματα σακχαρόζης υψηλής συγκέντρωσης (10%) και έχει την ικανότητα να δεσμεύει άζωτο υπό μικροαερόφιλες συνθήκες, ενώ η αζωτοδέσμευση αναστέλλεται μερικώς παρουσία αμμωνίας (Muthukumarasamy *et al.*, 2002). Όσον αφορά το μεταβολισμό οργανικών ενώσεων, το *G. diazotrophicus* διαθέτει τον μηχανισμό της γλυκόλυσης, το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης και ένα μοναδικό μονοπάτι οξειδωσης εξωκυτταρικής αλδόζης, κατά το οποίο η γλυκόζη οξειδώνεται προς γλυκονικό (Saravanan *et al.*, 2008). Άλλα χαρακτηριστικά του είδους αφορούν: α) έλλειψη της αναγωγάσης του νιτρικού (με αποτέλεσμα την ικανότητα να δεσμεύει άζωτο ακόμα και παρουσία νιτρικών), β) παραγωγή φυτοορμονών, γ) διαλυτοποίηση φωσφορικού και ψευδαργύρου, δ) μεγάλη αντοχή στο οσμωτικό στρες και τέλος ε) ανταγωνισμό με φυτοπαθογόνα (Mehnaz & Lazarovits 2006, Reis *et al.*, 2007,

Pedraza, 2008, Triplett 2007, Saravanan *et al.*, 2008). Η αυξίνη ινδολοξικό οξύ παράγεται από όλα τα αζωτοδεσμευτικά είδη του *Gluconacetobacter* και οι γιβρελλίνες A1 και A3 μόνο από το *G. diazotrophicus* (Pedraza, 2008). Η προαναφερθείσα ιδιότητα της διαλυτοποίησης φωσφόρου και ψευδαργύρου, θεωρείται ευεργετική για την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών, διότι μετατρέπει τα στοιχεία αυτά σε αφομοιώσιμες, για τα φυτά, μορφές (Saravanan *et al.*, 2008). Επίσης, ρόλο στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών πιθανώς να έχει και η υδρόλυση του αμινοκυκλοπροπανο-καρβοξυλικού οξέος (ACC), το οποίο αποτελεί πρόδρομη ένωση του αιθυλενίου. Το αιθυλένιο έχει αρνητική επίδραση στο φυτό μειώνοντας τον ρυθμό ανάπτυξής του. Έτσι, το βακτήριο παράγοντας την απαμινάση του αμινοκυκλοπροπανο-καρβοξυλικού οξέος, μεταβολίζει το ACC προς ακεβουτυρικό οξύ και αμμωνία, περιορίζοντας την αρνητική επίδραση του αιθυλενίου στα φυτά (Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado 2005, Saleem *et al.*, 2007). Τέλος, έχει διαπιστωθεί ότι το *G. diazotrophicus*: α) παρουσιάζει ανταγωνιστική δράση με ένα παθογόνο του σακχαροκάλαμου, τον μύκητα *Colletotrichum falcatum* (Muthukumarasamy *et al.*, 2002), β) περιορίζει την ανάπτυξη του παθογόνου *Xanthomonas albilineans*, λόγω παραγωγής ενός ενζύμου που λύει τα κυτταρικά τοιχώματα, με δραστηριότητα παρόμοια της λυσοζύμης (Bally & Elmerich, 2007) και γ) ελέγχει την ανάπτυξη του νηματώδη *Meloidogyne incognita* (Saravanan *et al.*, 2008).

Το στέλεχος *Gluconacetobacter diazotrophicus* αρχικά απομονώθηκε από ιστούς ρίζας, βλαστού και φύλλων σακχαροκάλαμου (ο πληθυσμός του σε ιστούς σακχαροκάλαμου κυμαίνεται από  $10^6$ - $10^7$  κύτταρα/g νωπού ιστού) και του είχε δοθεί η ονομασία *Acetobacter diazotrophicus*, αλλά έπειτα από μοριακές αναλύσεις του γονιδίου 16S rRNA τοποθετήθηκε στο γένος *Gluconacetobacter*. Επίσης απαντάται στη γλυκοπατάτα (*Ipomoea batatas*), στα φυτά καφέ, φυτά ανανά, αγρωστώδη *Eleusine coracana* και *Pennisetum purpureum*, ρίζες τσαγιού, καρπούς μάνγκο, ριζόσφαιρα μπανανιάς και στους ορυζώνες. Το συγκεκριμένο στέλεχος ανιχνεύεται τόσο στον ψευδόκοκκο (*Saccharococcus sacchari*) που προσβάλλει το σακχαροκάλαμο, όσο και στην ενδότροφη μυκόρριζα.

Το *Gluconacetobacter diazotrophicus* αποτελεί βακτήριο μοντέλο των ενδοφυτικών μικροοργανισμών, με σκοπό την αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ βακτηρίων-μη ψυχανθών φυτών (Saravanan *et al.*, 2008). Αναφέρεται τόσο ως υποχρεωτικά ενδοφυτικό βακτήριο, όσο και ως ομορτονιστικό ενδοφυτικό

βακτήριο (Muthukumarasamy *et al.*, 2002). Ο χαρακτηρισμός του ως ενδοφυτικό δικαιολογείται είτε από την αδυναμία απομόνωσής του από το έδαφος, είτε από την αδυναμία επιβίωσης του στο έδαφος. Πιθανώς, η απάντηση για αυτό το φαινόμενο να βρίσκεται στα άλλα δύο αζωτοδεσμευτικά είδη του *Gluconacetobacter*, τα *G. azotocaptans* και *G. johannae*, τα οποία έχουν απομονωθεί μόνο από ριζόσφαιρα φυτών και δεν έχουν επιδείξει ενδοφυτική δράση (πίνακας 1.9). Μερικοί από τους παράγοντες, οι οποίοι αιτιολογούν τη δυνατότητα επιβίωσης του *G. diazotrophicus* στη ριζόσφαιρα είναι: α) ο εμπλουτισμός της ριζόσφαιρας σακχαροκάλαμου με σακχαρόζη, β) η υψηλή οργανική ουσία των εδαφών που αναπτύσσονται φυτά καφέ και γ) οι ποσότητες φωσφόρου στην οργανική ουσία εδάφους ορυζώνων. Άλλοι παράγοντες μπορεί να αφορούν, αυξημένη εδαφική υγρασία (>35%) και δυνατότητα εκμετάλλευσης συγκεκριμένων απλών οργανικών οξέων, τα οποία είναι διαθέσιμα στο έδαφος μέσω αποδόμησης της οργανικής ύλης. Επιπροσθέτως, η παρουσία συγκεκριμένων κυτταρολυτικών ενζύμων, όπως ενδογλυκανάση, ενδοξυλογλυκανάση και ενδοπολυμεθυλογαλακτορουνάση, εγείρουν την υπόθεση ότι αυτά βοηθούν το *G. diazotrophicus*, να ανταγωνιστεί επιτυχώς άλλους μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας και να αποικίσει αποτελεσματικά τους εσωτερικούς ιστούς των φυτών.

Οι απομονώσεις του *G. diazotrophicus* από διάφορα περιβάλλοντα δεν φαίνεται να παρουσιάζουν μεγάλη γενετική ποικιλομορφία (Muthukumarasamy *et al.*, 2002). Το εκτιμώμενο μέγεθος του γονιδιώματός του είναι 4,3 Mb (Pedraza, 2008) και είναι διαπιστωμένο ότι φέρει πλασμίδια με μεγέθη από 50-110 MDa. Τα γονίδια *nif* δεν εντοπίζονται στα πλασμίδια αλλά στο χρωμόσωμα. Η πρώτη φάση χαρακτηρισμού των γονιδίων *nif* περιελάμβανε δομικά γονίδια της νιτρογενάσης, γονίδια “ωρίμανσης” του συστήματος της νιτρογενάσης, γονίδια υπεύθυνα για τη ρύθμιση της αζωτοδέσμευσης και για λειτουργίες μεταφοράς ηλεκτρονίων. Έπειτα, αναγνωρίστηκαν 32 ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια (ORF) σε μία περιοχή 31 kb και διαπιστώθηκε ότι η ομάδα των γονιδίων *nif/fix* του *G. diazotrophicus* αποτελεί τη μεγαλύτερη ομάδα γειτνιαζόντων γονιδίων που συμμετέχουν στην αζωτοδέσμευση, ή σε σχετικές με αυτή λειτουργίες, που έχει παρατηρηθεί σε οποιονδήποτε αζωτοδεσμευτικό οργανισμό, ως σήμερα. Αναγνωρισμένα είναι επίσης, τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη δομή και τη λειτουργία της νιτρογενάσης, τα οποία είναι τα *nifHDKENX*, *nifUSVW*, *nifB*, *nifQ* και αυτά που απαιτούνται για την ενεργοποίηση μεταγραφής άλλων γονιδίων *nif*, τα *rpoN* και *nifA*, το οποίο παρουσιάζει ευαισθησία στο O<sub>2</sub> και σε NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Baldani & Baldani, 2005, Saravanan, *et al.*, 2008). Άλλα γονίδια

που σχετίζονται έμμεσα με την αζωτοδέσμευση είναι το *mcpA*, που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη που απαντά σε χημειοτακτικά σήματα και το *modABCD*, που εκφράζει ένα σύστημα μεταφοράς μολυβδαινίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η οργάνωση των γονιδίων αζωτοδέσμευσης του *G. diazotrophicus* έχει ομοιότητες με αυτήν του *Azospirillum brasilense*, ενώ μία περιοχή (από *nifE* έως *nifW*) έχει ομοιότητες με το *Rhodobacter capsulatus*. Το *G. diazotrophicus* και το *A. brasilense* είναι οι μόνοι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί οι οποίοι φέρουν γονίδιο τύπου *mcpA* που σχετίζεται με την ομάδα γονιδίων *nif/fix*. Η πρωτεΐνη McpA εμπλέκεται στο χημειοτακτισμό πολλών οργανισμών (Reis *et al.*, 2007). Λόγω της ενδοφυτικής του φύσης, το *G. diazotrophicus* χρησιμοποιείται ως φορέας για ετερόλογη έκφραση ορισμένων γονιδίων (Baldani & Baldani, 2005).

Οι ιδιότητες του *G. diazotrophicus* το καθιστούν εξαιρετικά κατάλληλο για βιολίπασμα. Εμβολιασμός καλαμποκιού με το στέλεχος DS1, είχε ως αποτέλεσμα αύξηση του βάρους της ρίζας και των βλαστών του (Mehnaz & Lazarovitis, 2006). Στην περίπτωση νεαρών φυτών σόργου, παρατηρήθηκε συσσώρευση υδατανθράκων στους βλαστούς (Dobbelaere & Okon, 2007). Θετικές επιδράσεις έχει και σε σακχαροκάλαμο, όπου ο εμβολιασμός με το στέλεχος PAL5 αύξησε το βάρος των υπέργειων ιστών κατά 28%. Σε άλλες έρευνες, οι οποίες περιλαμβάνουν ταυτόχρονα εμβολιασμό του *G. diazotrophicus* και μυκορριζικών μυκήτων, παρατηρήθηκε αύξηση του ριζικού συστήματος σε φυτά γλυκοπατάτας καθώς και αύξηση στην απορρόφηση ορισμένων θρεπτικών στοιχείων. Η συνεισφορά του σε άζωτο σε σακχαροκάλαμο, υπολογίζεται περίπου στο 30% επί του συνόλου που αφομοιώνεται από τα φυτά, αλλά ανάλογα με τη διαθεσιμότητα μολυβδαινίου στο έδαφος κυμαίνεται από 0 έως 70% (Baldani & Baldani, 2005). Ένας ακόμα περιοριστικός παράγοντας της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας του *G. diazotrophicus*, είναι η περίσσεια αζώτου. Έρευνες εμβολιασμού σακχαροκάλαμων έδειξαν, ότι η εφαρμογή μικρών ποσοτήτων αζωτούχων λιπασμάτων (120 kg/εκτάριο) επηρέασε λιγότερο αρνητικά τον πληθυσμό του βακτηρίου απ' ότι η εφαρμογή υψηλών ποσοτήτων αζωτούχων λιπασμάτων. Τέλος, η θετική επίδραση στην προώθηση της ανάπτυξης του σακχαροκάλαμου, δεν προκαλείται μόνο από τη δέσμευση αζώτου αλλά και από την παραγωγή φυτοορμονών (Muthukumarasamy *et al.*, 2002).

### 1.3.2.2 Άλλα αζωτοδεσμευτικά μέλη της οικογένειας Acetobacteraceae

Κατόπιν ταξινομικών ερευνών, προτάθηκαν δύο νέα γένη και είδη της οικογένειας Acetobacteraceae, τα *Swaminathania salitolerans* και *Asaia bogorensis*, καθώς και δύο είδη του γένους *Acetobacter*, τα *Acetobacter peroxydans* και *Acetobacter nitrogenifigens*.

Το στέλεχος *Swaminathania salitolerans* απαντάται τόσο στη ριζόσφαιρα όσο και ενδοφυτικά στους βλαστούς και τη ρίζα (Saravanan *et al.*, 2008, Tilak *et al.*, 2005). Πρόσφατα ανιχνεύτηκε σε εκτάσεις άγριου ρυζιού (*Porteresia coarctata*), πλούσιες σε άλατα, στην Ινδία. Παρουσιάζει τη δυνατότητα να δεσμεύει άζωτο και να διαλυτοποιεί φώσφορο παρουσία NaCl (3%).

Το είδος *Asaia bogorensis*, το οποίο αποτελεί και παθογόνο του ανθρώπου, έχει απομονωθεί από φυτά ανανά και πιθανώς να έχει την ικανότητα αζωτοδέσμευσης. Επίσης, σε εργαστηριακές μελέτες του *A. bogorensis* και ορισμένων *Asaia* spp. (απομονωμένων από το φυτό *Byrsonima crassifolia*), ανιχνεύθηκε ινδολοξικό οξύ στο θρεπτικό υπόστρωμα (Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado, 2005, Saravanan *et al.*, 2008).

Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ικανότητα δέσμευσης αζώτου στο *Acetobacter peroxydans*. Το συγκεκριμένο μέλος του γένους *Acetobacter*, της οικογένειας Acetobacteraceae, απομονώθηκε από υδροβιότοπους ρυζιού στην Ινδία, ριζόσφαιρα, αλλά και ενδοφυτικά από στελέχη και ιστούς ρίζας.

Τέλος, κατόπιν μελέτης, η αζωτοδεσμευτική ικανότητα του στελέχους *Acetobacter nitrogenifigens* εντοπίστηκε σε τσάι Konbucha (πίνακας 1.9).

Παρά το γεγονός ότι το γένος *Acetobacter* έχει ανακαλυφθεί από τον 20<sup>ο</sup> αιώνα, δεν του έχει αποδοθεί ξανά η ιδιότητα της δέσμευσης αζώτου, για το λόγο αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον (Saravanan *et al.*, 2008).

Στελέχη οικογένειας Acetobacteraceae	Χώρα απομόνωσης	Είδος καλλιέργειας	Πηγή απομόνωσης
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Βραζιλία	Σακχαροκάλαμο	Βλαστός, ρίζα, φύλλα και φυτικός χυμός
	Βραζιλία	Γλυκοπατάτα	Σπόρια του <i>Glomus occultum</i> και του <i>Acaulospora</i>



	Αυστραλία	Σακχαροκάλαμο	Ψευδόκοκκος <i>Saccharococcus sacchari</i>
	Βραζιλία	<i>Rannisetum purpureum</i> και γλυκοπατάτα	Βλαστός, ρίζα και κόνδυλος
	Μεξικό	Σακχαροκάλαμο	Βλαστός, ρίζα και ψευδόκοκκος
	Μεξικό	Καφές	Βλαστός, ρίζα και ριζόσφαιρα
		Τσάι, μπανάνα και καφές	Ρίζα και ριζόσφαιρα
	Ινδία	<i>Eleusine coracana</i>	Βλαστός, ρίζα, φύλλα και ριζόσφαιρα
	Μεξικό	Ανανάς	Βλαστός, ρίζα και ριζόσφαιρα
	Ινδία	Καρότο, ραπανάκι, παντζάρι και καφές	Ιστοί ρίζας
	Ινδία και Κορέα	Υγροβιότοπος ρυζιού	Βλαστός, ρίζα και ριζόσφαιρα
<i>G. azotocaptans</i> και <i>G. johannae</i>	Μεξικό	Καφές	Ριζόσφαιρα και ριζοπλάνο
<i>G. azotocaptans</i>	Καναδάς	Καλαμπόκι	Ριζόσφαιρα
<i>Swaminathania salitolerans</i>	Ινδία	Άγριο ρύζι	Βλαστός, ρίζα και ριζόσφαιρα
<i>G. kombuchae</i>	Ινδία		Τσάι Kombucha
<i>Acetobacter peroxydans</i>	Ινδία	Υγροβιότοπος ρυζιού	Βλαστός, ρίζα και ριζόσφαιρα
<i>A. nitrogenifigens</i>	Ινδία		Τσάι Kombucha

**Πίνακας 1.9.** Πηγές απομόνωσης και είδη καλλιέργειας ορισμένων αζωτοδεσμευτικών μελών της οικογένειας Acetobacteraceae (Saravanan *et al.*, 2008).

### 1.3.2.3 *Azoarcus*

Το γένος *Azoarcus* περιγράφηκε για πρώτη φορά έπειτα από απομόνωση δύο ειδών από το αγρωστώδες *Leptochloa fusca*, των *Azoarcus indigenus* και *Azoarcus communis* (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993). Το γένος *Azoarcus* αποτελείται από δύο ομάδες βακτηριών, βάσει οικολογικών τους διαφορών: α) εδαφικά βακτήρια τα οποία υπό απονιτροποιητικές συνθήκες, έχουν την ικανότητα να αποδομήσουν αρωματικούς υδρογονάνθρακες και β) ενδοφυτικά ή επιφυτικά βακτήρια αγρωστωδών τα οποία εμφανίζουν δυσκολία επιβίωσης σε έδαφος χωρίς την παρουσία ριζών (Reinhold-Hurek & Hurek, 2006).

Τα βακτήρια του συγκεκριμένου γένους, βάσει αναλύσεων του γονιδίου 16S rRNA, ανήκουν στην κλάση των β-Πρωτεοβακτηρίων στην τάξη Rhodocyclales. Είναι κατά Gram<sup>-</sup> βακτήρια, με ευθεία ή ελαφρώς κυρτά ραβδία, με εξαίρεση το *A. buckelii* το οποίο έχει κοκκοειδές σχήμα. Παρουσιάζουν ιδιαίτερα μεγάλη κινητικότητα και διαθέτουν ένα ή δύο πολικά μαστίγια (Reinhold-Hurek & Hurek, 2006). Έχουν αερόβιο μεταβολισμό χρησιμοποιώντας το O<sub>2</sub> ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων, ενώ σε αναερόβιες συνθήκες τον ρόλο αυτόν λαμβάνει το νιτρικό. Εξαίρεση αποτελεί το *A. anaerobius*, το οποίο είναι μεν αυστηρά αναερόβιο αλλά δεν αζωτοδεσμεύει. Τέλος, τα ενδοφυτικά *Azoarcus* δεν καταβολίζουν υδατάνθρακες για την ανάπτυξη τους, σε αντίθεση με τα εδαφικά τα οποία καταβολίζουν μόρια, όπως γλυκόζη, μαλτόζη, φρουκτόζη και η σακχαρόζη (Reinhold-Hurek & Hurek, 2007).

Τα είδη του *Azoarcus* στα οποία έχει διαπιστωθεί η αζωτοδεσμευτική ικανότητα από την κατηγορία του γένους που σχετίζεται με αγρωστώδη είναι τα: *A. indigenus* (τυπικό είδος του γένους), *A. communis* και *Azoarcus* sp. BH72 και από τα εδαφικά *Azoarcus*, το *A. tolulyticus* (Reinhold-Hurek & Hurek, 2006). Επιπλέον, το ετερογενές αυτό είδος περιλαμβάνει (*sensu lato*) και βακτήρια των γενών *Azovibrio*, *Azospira* και *Azonexus*, τα οποία είναι επίσης αζωτοδεσμευτικά υπό μικροαερόφιλες συνθήκες.

Το γένος *Azoarcus* χαρακτηρίζεται από τις ιδιότητες του βακτηρίου *Azoarcus* sp. BH72, το οποίο αποτελεί είδος μοντέλο του γένους. Δικαιούται να ταξινομηθεί, βάσει DNA/DNA υβριδισμού, ως νέο είδος, αλλά μέχρι σήμερα δεν έχει πραγματοποιηθεί διότι περιλαμβάνει μόλις ένα στέλεχος (Reinhold-Hurek & Hurek, 2007).

Τα βακτήρια του γένους *Azoarcus*, έχουν την τάση να σχετίζονται με αυτοφυή

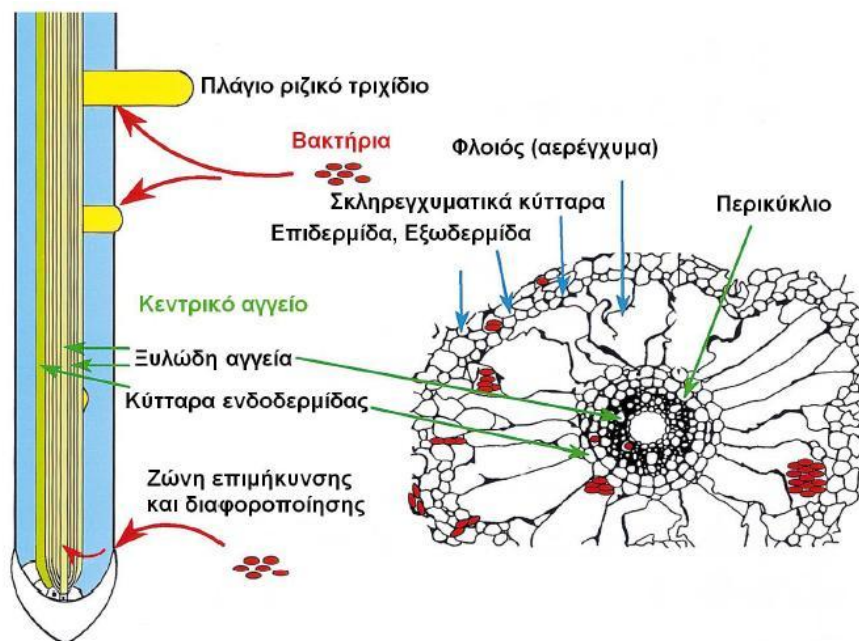
(μη καλλιεργούμενα) φυτά (Reinhold-Hurek & Hurek, 2007), γεγονός που δυσκολεύει την απομόνωσή τους από εργαστηριακές ομάδες, αφού οι έρευνες επικεντρώνονται σε καλλιεργούμενα φυτά. Η ιδιότητα τους αυτή, υποστηρίζεται από σχετικές έρευνες οι οποίες έδειξαν, ότι ο πληθυσμός του *Azoarcus* σε άγριο ρύζι και παραδοσιακές ποικιλίες ρυζιού είναι μεγαλύτερος από αυτόν που παρουσιάζεται σε πιο σύγχρονες καλλιεργούμενες ποικιλίες ρυζιού (Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado, 2005).

Εμβολιασμός καλαμποκιού με βακτήρια *Azoarcus*, δεν είχε επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών, είτε παρουσία είτε απουσία λιπασμάτων (Triplett, 2007).

Τα *A. indigenes*, *A. communis* και *Azoarcus* sp. BH72 έχουν απομονωθεί από επιφάνεια στελεχών και ρίζας, ριζόσφαιρα του *Leptochloa fusca*, ριζόσφαιρα ρυζιού, σκληρώτια σε ορυζώνες καθώς και από ασκοκάρπια σε εκτάσεις *L. fusca*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η ικανότητα του *A. communis* να επιβιώνει σε πετρελαϊκά απόβλητα δυλιστηρίου. Το *A. tolulyticus*, το οποίο είναι το μοναδικό από τα εδαφικά *Azoarcus* το οποίο αζωτοδεσμεύει, έχει απομονωθεί από εδάφη μολυσμένα με τολουένιο (Zhou *et al.*, 1995). Πρόσφατα, απομονώθηκε από ριζόσφαιρα σιταριού, στέλεχος βακτηρίου του οποίου το γονίδιο *nifH* είχε υψηλή ομολογία με αυτό του *A. tolulyticus* (Sarita *et al.*, 2008). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι βακτήρια *Azoarcus* διαβιούν ενδοφυτικά και σε σόργο, αλλά δεν έχει αποδειχτεί ως σήμερα (Saikia & Jain, 2007, Triplett, 2007).

Αξίζει να σημειωθεί, ένα εξίσου ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των βακτηρίων του γένους *Azoarcus*, είναι η ικανότητά του στελέχους BH72 να αποικίζει το κεντρικό αγγείο της ρίζας των *L. fusca* και ρυζιού, χώρος, που μέχρι πρότινος γνωρίζαμε ότι αποικίζεται μόνο από παθογόνους ή σαπροφυτικούς οργανισμούς. Για την είσοδο του βακτηρίου στο εσωτερικό του φυτού έχουν προταθεί 2 μοντέλα. Σύμφωνα με το πρώτο μοντέλο, η είσοδος επιτυγχάνεται με την αποίκιση της κορυφής του ριζικού τριχιδίου στη ζώνη επιμήκυνσης και διαφοροποίησης, ενώ το δεύτερο μοντέλο υποστηρίζει την πιθανότητα εισόδου από τα σημεία έκπτυξης των πλάγιων ριζικών τριχιδίων (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998). Ανεξαρτήτως τρόπου αποικισμού του φυτικού σώματος από το βακτήριο, απαραίτητο στοιχείο για την πραγματοποίηση της εισόδου του στον φυτικό ιστό αποτελούν τα κυτταρινολυτικά ένζυμα, όπως οι ενδο- και εξω- γλυκανάσες, τα οποία υποβοηθούν την λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων και δεν φαίνεται να διαδραματίζουν ιδιαίτερο ρόλο στο μεταβολισμό της κυτταρίνης ή της κελλοβιόζης (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998, Ryan *et al.*, 2008). Εφόσον τα

βακτήρια καταφέρουν να εισαχθούν και να εγκατασταθούν εντός του φυτικού σώματος, πολλαπλασιάζονται διασυστηματικά και μεταφέρονται με αυτόν τον τρόπο ακόμα και στα υπέργεια μέρη του φυτού, πιθανώς μέσω των ξυλωδών αγγείων (σχήμα 1.17). Παρά το γεγονός ότι τα βακτήρια του γένους αυτού αποικίζουν το φυτό ενδοκυτταρικά, δε φαίνεται να παραμένουν εντός του ζωντανού φυτικού κυτοπλάσματος.



**Σχήμα 1.17.** Πιθανές θέσεις προσβολής και αποίκησης σε ρίζα νεαρού ρυζιού (οριζόντια τομή) και σε ρίζα ώριμου ρυζιού (κάθετη τομή). Οι θέσεις αποίκησης είναι το χώμα της ριζόσφαιρας (περιβάλλει τις ρίζες και επηρεάζεται από τις εκκρίσεις τους) ή για επιφυτικούς μικροοργανισμούς, το ριζοπλάνο (περιλαμβάνονται η επιδερμίδα και η εξωδερμίδα) ή οι εσωτερικοί ιστοί. Η ενδοδερμίδα αποτελεί το φράγμα που περιβάλλει το κεντρικό αγγείο (πράσινα βέλη), το οποίο περιέχει ξυλώδη αγγεία για την παροχή θρεπτικών στοιχείων της ρίζας και μέχρι πρότινος θεωρείτο ότι αποικίζεται από μικροοργανισμούς μη παθογόνους. Οι θέσεις αποίκησης των αζωτοδεσμευτικών ενδοφυτικών οργανισμών υποδεικνύονται από κόκκινα δισκία και τα μονοπάτια εισόδου από κόκκινα βέλη. Τα μπλε βέλη δείχνουν τα εξωτερικά στρώματα κυττάρων και τον φλοιό (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998).

Η επικοινωνία των βακτηρίων του γένους *Azoarcus* με τον ξενιστή αποτελεί αντικείμενο έρευνας. Παρ' όλα αυτά, βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων και πλήρους αλληλούχησης του γονιδιώματος του *Azoarcus* BH72, φαίνεται ότι δεν εντοπίζονται γονίδια που να σχετίζονται με την δημιουργία απεκκριτικών μονοπατιών τύπου III και IV, παράγοντες σχηματισμού φυματίων, τοξίνες, κοινά υδρολυτικά ένζυμα και το σύστημα N-acyl homoserine lactone-based quorum-sensing, τα οποία βρίσκονται στα περισσότερα παθογόνα ή συσχετιζόμενα με φυτά βακτήρια. Εντοπίστηκαν όμως

γονίδια των οποίων τα προϊόντα σχετίζονται με την διαδικασία αλληλεπίδρασης του βακτηρίου με το φυτό. Τα προϊόντα αυτά περιλαμβάνουν τριχίδια τύπου IV (pili), πολυσακχαρίτες επιφάνειας, τύπου I και II πρωτεΐνες εκκριτικών μονοπατιών, μαστίγια και χημειοτακτικές πρωτεΐνες (Ryan *et al.*, 2008).

Τα τριχίδια τύπου IV είναι γνωστό ότι μεσολαβούν για την πρόσδεση στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή και είναι σημαντικός παράγοντας μολυσματικότητας ανθρώπινων και ζωικών παθογόνων και ίσως έχουν παρόμοια δράση στις αλληλεπιδράσεις φυτών-μικροοργανισμών (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998). Ο σχηματισμός του τριχιδίου τύπου IV εξαρτάται από το οπερόνιο *pilAB*, του οποίου η έκφραση έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του βακτηρίου στη ρίζα και το τυπικό γονίδιο που μελετάται είναι το *pilA* (Hurek & Reinhold-Hurek, 2003, Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado, 2005). Η δυνατότητα επιβίωσης των βακτηρίων του γένους *Azoarcus* στο έδαφος απουσία ξενιστή, υφίσταται λόγω της ικανότητας συσχέτισής τους με καρποφορίες μυκήτων στο έδαφος (Hurek & Reinhold-Hurek, 2003).

Από την μελέτη του γονιδιώματος του *Azoarcus* BH72, του οποίου το μέγεθος υπολογίζεται σε 4,6Mb και περιεχόμενο G+C 65%, προκύπτει ότι τα δομικά γονίδια *nifHDK* εντοπίζονται σε ένα οπερόνιο, όπως παρατηρείται και στα περισσότερα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Μια άλλη ομάδα γονιδίων περιλαμβάνει τα ρυθμιστικά γονίδια *nifA* και *nifL*, γεγονός το οποίο δεν ήταν αναμενόμενο, μιας και τα γονίδια *nifL* έχουν εντοπιστεί έως σήμερα μόνο σε γ-Πρωτεοβακτήρια και πρόσφατα σε *Pseudomonas stutzeri* (Hurek & Reinhold-Hurek, 2003, Pedrosa & Elmerich, 2007). Από μελέτες των γονιδίων *nifHDK* του *Azoarcus* έχει διαπιστωθεί ότι τα συγκεκριμένα γονίδια αποκτήθηκαν μέσω οριζόντιας μεταφοράς (Schmid & Hartmann, 2007). Ένα άλλο ασυνήθιστο γνώρισμα του *Azoarcus* BH72 είναι ο σχηματισμός εσωτερικών μεμβρανικών στοιβάδων οι οποίες καλούνται diazosomes. Κύτταρα τα οποία δεσμεύουν άζωτο υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν παρουσιάζουν τέτοιες μεμβράνες. Οι συγκεκριμένες όμως εμφανίζονται κατά την υπερ-επαγωγή (hyper-induction), δηλαδή μία κατάσταση αυξημένης δραστηριότητας και απόδοσης αζωτοδέσμευσης σε κλειστές καλλιέργειες σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις O<sub>2</sub> (Hurek & Reinhold-Hurek, 2003). Στην παρούσα κατάσταση, η αζωτοδέσμευση είναι πολύ αποδοτική και συγκεκριμένα μπορεί να φτάσει μία τάξη μεγέθους υψηλότερη από αυτήν που παρουσιάζουν τα βακτηριοειδή στα φυμάτια. Οι παραπάνω κατασκευές θεωρούνται κεντρικής σημασίας για αζωτοδέσμευση υψηλής απόδοσης

(Tilak *et al.*, 2005). Επιπλέον, στο γονιδίωμα του *Azoarcus* EbN1 έχουν ανιχνευτεί γονίδια τα οποία έχουν ρόλο στη βιοσύνθεση αυξινών και συγκεκριμένα, γονίδια των οποίων τα προϊόντα είναι μέρος του μονοπατιού του ινδολοπυρουβικού οξέος (IPyA). Το μονοπάτι του ινδολοπυρουβικού είναι κυρίαρχο για τη βιοσύνθεση ινδολοξικού στα φυτά και σε πολλά βακτήρια. Παρά την παρουσία των συγκεκριμένων γονιδίων, δεν έχει παρατηρηθεί παραγωγή αυξινών (ούτε ινδολοξικού ούτε φαινυλοξικού) από το συγκεκριμένο βακτήριο (Spraeren *et al.*, 2007).

Ο φλοιός της ρίζας και ο αερεγχυματικός ιστός του ρυζιού αποτελούν τις κύριες θέσεις αποίκησης των βακτηρίων *Azoarcus*. Μελέτες με *in situ* υβριδισμό έδειξαν ότι τα γονίδια νιτρογενάσης εκφράζονται στο αερέγχυμα του φυτού *L. fusca* (Reinhold-Hurek & Hurek, 2007). Επίσης, σε έρευνα κατά την οποία πραγματοποιήθηκε μεταγραφική σύζευξη μεταξύ γονιδίων *nif* και με τα γονίδια της πράσινης φθοριδίζουσας πρωτεΐνης (*gfp*) είτε της β-γλουκουρονιδάσης (*gus*), εντοπίστηκε υψηλή έκφραση νιτρογενάσης εντός της ρίζας φυταρίων ρυζιού. Η έκφραση *nifH* σε εμβολιασμένα φυτά και η μη έκφρασή της σε φυτά μάρτυρες, επιβεβαιώνει ότι η πηγή αζώτου για τα εμβολιασμένα φυτά ήταν η αζωτοδέσμευση των βακτηρίων *Azoarcus* (Hurek *et al.*, 2002).

Συνοψίζοντας τις προαναφερθείσες αναφορές, απορρέει το συμπέρασμα ότι οι θέσεις αποικισμού των φυτών ξενιστών από τα βακτήρια του γένους *Azoarcus* αντιπροσωπεύουν και τα σημεία όπου πραγματοποιείται δέσμευση αζώτου.

Το *Azoarcus* BH72, παρόλο που θεωρείται βακτήριο μοντέλο των ενδοφυτικών ειδών, φαίνεται να είναι το λιγότερο χρήσιμο από όλα τα στελέχη που έχουν μελετηθεί έως σήμερα, κυρίως λόγω της αδυναμίας αλληλεπίδρασης με τα κυριότερα αγρωστώδη. Ένας άλλος βασικός λόγος είναι η μη καλλιεργήσιμη μορφή που λαμβάνει κατόπιν εμβολιασμού στα φυτά. Η αδυναμία καλλιέργειας του στελέχους μετά την είσοδο του στο φυτό, καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη τη μελέτη του σε σχέση με άλλα φυτά (Triplett, 2007). Επιπλέον, περιοριστικό παράγοντα αποτελεί το γεγονός ότι η παρουσία του *Azoarcus* ενδοφυτικά, συμβάλλει στην επαγωγή της αμυντικών μηχανισμών του φυτού με αποτέλεσμα την μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου εντός του φυτού (Ryan *et al.*, 2008). Σε γενικές γραμμές, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η προσφορά του βακτηρίου *Azoarcus* διότι δεν έχει εφαρμοστεί εκτεταμένα σε καλλιέργειες, με εξαίρεση καλλιέργειες ρυζιού, ώστε να μελετηθούν τα αποτελέσματα και να προκύψει ένα ασφαλές συμπέρασμα για τη χρησιμότητά του (Kennedy *et al.*, 2004).

### 1.3.2.4 *Herbaspirillum*

Τα στελέχη του γένους *Herbaspirillum* ανήκουν στην οικογένεια Oxalobateraceae, είναι κατά Gram<sup>-</sup>, ωοειδή, ενδοφυτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και διαθέτουν πολικό μαστίγιο (Jung *et al.*, 2007, Pedrosa & Elmerich, 2007, Vanbleu & Vanderleyden, 2007).

Βακτήρια του γένους *Herbaspirillum* απομονώθηκαν για πρώτη φορά από καλαμπόκι (1986) και θεωρήθηκαν ως μέλη του γένους *Azospirillum*, για το λόγο του οποίου δόθηκε η ονομασία *Azospirillum seropedicae* (Elmerich, 2007). Έπειτα από DNA/DNA υβριδισμό έγινε γρήγορα αντιληπτό ότι η συγκεκριμένη απομόνωση ανήκει στην κλάση των β-Πρωτεοβακτηρίων και πρόκειται για ένα νέο είδος (Baldani & Baldani, 2005), το οποίο ονομάστηκε *Herbaspirillum seropedicae*. Εν συνεχεία, σχετική μελέτη επαναπροσδιόρισε την ονομασία του. Το συγκεκριμένο στέλεχος αποδείχτηκε ότι έχει στενή σχέση με ένα παθογόνο του σακχαροκάλαμου, το οποίο αρχικά αναγνωρίστηκε ως *Pseudomonas rubrisubalbicans*. Περαιτέρω φυλογενετική ανάλυση έδειξε στενή συγγένεια των δύο στελεχών και πρόκληση ίδιων συμπτωμάτων σε σόργο και στο αγρωστώδες *Pennisetum* (Elmerich, 2007). Έτσι, μετονομάστηκε σε *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Schmid & Hartmann, 2007).

Το *H. seropedicae* έχει απομονωθεί επίσης από ρίζες σόργου, σακχαροκάλαμου, ρυζιού και άλλων αγρωστωδών (Elmerich, 2007) και το *H. rubrisubalbicans* από *Miscanthus* και σακχαροκάλαμο (Reis *et al.*, 2007). Μελέτες έδειξαν ότι πρέπει να οριστικοποιηθεί η ένταξη στελεχών ενός είδους, προερχόμενα κυρίως από κλινικές απομονώσεις και προσωρινό όνομα “*Herbaspirillum* είδος 3”, στο γένος, αν και δεν αζωτοδεσμεύουν όλα τα στελέχη του, ούτε προέρχονται όλα από φυτικά είδη.

Το είδος *H. frisingense* πρόσφατα απομονώθηκε από δύο C-4 φυτά, τα *Pennisetum purpureum* (στη Βραζιλία) και *Miscanthus sinensis* (στη Γερμανία). Επίσης, έχει προταθεί το όνομα *H. lusitanum* για στελέχη απομονωμένα από φυμάτια του *Phaseolus vulgaris* στην Πορτογαλία. Τέλος, έχει προταθεί και το είδος *H. chlorophenolicum* (πρώην *Commamonas testosterone*) το οποίο έχει την ικανότητα να αποδομεί χλωροφαινόλη.

Με εξαίρεση το *H. chlorophenolicum* και το “είδος 3”, τα υπόλοιπα μέλη του γένους έχουν αζωτοδεσμευτικές ικανότητες και αποικίζουν ρίζες φυτών. Κατά τη μελέτη αποίκησης αυτών των βακτηρίων διαπιστώθηκε η ενδοφυτική τους

συμπεριφορά σε ορισμένα φυτά, όπως σόργο, σακχαροκάλαμο, ρύζι, ανανά, μπανάνα και *Miscanthus* (Schmid & Hartmann, 2007). Η ενδοφυτική φύση του *H. seropedicae* στέλεχος Z67 διαπιστώθηκε από μελέτες με συστήματα αναφοράς της β-γλουκουρονιδάσης (gus) σε ρύζι. Συνεπώς, η είσοδος των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε από τις θέσεις έκπτυξης των πλάγιων ριζικών τριχιδίων και κατόπιν αποικίζονται οι ενδοκυτταρικοί χώροι της ρίζας, το αερέγχυμα, τα κύτταρα του φλοιού, ορισμένα διαφεύγουν μέσω του κεντρικού αγγείου στους αγγειώδεις ιστούς. Επίσης, αποικίζονται τα ξυλώδη αγγεία των φύλλων και των βλαστών (Reis *et al.*, 2007).

Τα *Herbaspirillum* έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και να αζωτοδεσμεύουν παρουσία σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων O<sub>2</sub> (3%) σε σχέση με *Azospirillum* spp. (2%). Το *H. seropedicae* εκφράζει την αναγωγή του νιτρικού και μπορεί να αναπτύσσεται αλλά όχι να δεσμεύει άζωτο παρουσία νιτρικών, ωστόσο η δραστηριότητα της νιτρογένεσης αναστέλλεται μερικώς, μέχρι η συγκέντρωση αμμωνίας να λάβει τη τιμή 20mM (Reis *et al.*, 2007).

Σε αντίθεση με το *G. diazotrophicus*, τα γονίδια αζωτοδέσμευσης του *H. seropedicae* βρίσκονται διαχωρισμένα σε δύο ομάδες (*nifHDKENXorf1orf2orf3* και *nifQmodABCfixXC*) μέσα στο γονιδιωμα του, αλλά η αποστάσεις τους δεν είναι ακόμα γνωστές. Όπως και σε άλλα μέλη των Πρωτεοβακτηρίων, η έκφραση των γονιδίων *nif* στο *H. seropedicae* ρυθμίζεται από το γονίδιο *nifA*, ενώ διαπιστώνεται η παρουσία των πρωτεϊνών *glnD* και *pilI* (Pedrosa & Elmerich, 2007, Reis *et al.*, 2007). Η πρωτεΐνη *nifA* είναι ευαίσθητη στο οξυγόνο και επιπλέον απαιτεί σίδηρο για *in vivo* δραστηριότητα (Baldani & Baldani, 2005).

Η επίδραση εμβολιασμού με βακτήρια του γένους *Herbaspirillum* έχει μελετηθεί και αξιολογηθεί εκτενώς τα τελευταία 20 χρόνια. Κατά τα πρώτα έτη, δε διαπιστώθηκε θετική αντίδραση σε σόργο και καλαμπόκι έπειτα από εμβολιασμό. Στην περίπτωση του ρυζιού όμως διαπιστώθηκε αύξηση της απόδοσης που ισοδυναμούσε με αντίστοιχη αύξηση έπειτα από προσθήκη 40 kg N/εκτάριο (Baldani & Baldani, 2005). Μπορεί να δεσμεύσει το 31-54% του συνολικού αζώτου που απαιτείται για φυτάρια ρυζιού 30 ημερών. Σε μελέτες σε θερμοκήπιο, ο εμβολιασμός με *Herbaspirillum* είχε ως αποτέλεσμα αύξηση του ρυζιού κατά 7,5g / φυτό, ενώ ρόλο έχει και η ποικιλία του ρυζιού. Εμβολιασμός με *H. seropedicae* έχει θετική επίδραση σε βλαστούς και σπέρματα ρυζιού, καθώς και στη βλαστικότητα των σπερμάτων. Παρόμοιες θετικές επιδράσεις έχει ο εμβολιασμός του *H. seropedicae* σε



σιτάρι και σακχαροκάλαμο, του οποίου ο πληθυσμός σε βακτήρια δεν επηρεάζεται από εφαρμογή αζωτούχων λιπασμάτων (Kennedy *et al.*, 2004). Ρόλο στην έκταση του αποικισμού στο σακχαροκάλαμο έχει και η επιλογή της ποικιλίας. Σε ευπαθή ποικιλία, τα ξυλώδη αγγεία, οι ενδοκυτταρικοί χώροι και οι υποστοματικές κοιλότητες φράσσονται πλήρως από την ανάπτυξη του *H. rubrisubalbicans*, σε σύγκριση με ανθεκτική ποικιλία στην οποία ήταν περιορισμένο σε μικροαποικίες (Reis *et al.*, 2007).

### 1.3.2.5 *Klebsiella*

Το γένος *Klebsiella* ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Περιλαμβάνει μη κινητά (εκτός του *K. mobilis*) Gram αρνητικά, ραβδόμορφα, γ-Πρωτεοβακτήρια, τα οποία δε διαθέτουν μαστίγια (Grimont & Grimont, 2005b). Είναι προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί οι οποίοι έχουν ενδοφυτική δράση δεσμεύοντας άζωτο, με το οποίο στη συνέχεια προμηθεύουν τα φυτά, αυξάνοντας έτσι την ανάπτυξή τους υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις. (Fouts *et al.*, 2008). Το ποσοστό του γένους G+C κυμαίνεται από 53 έως 58% (Grimont & Grimont, 2005b).

Τα βακτήρια του γένους *Klebsiella* είναι παρόντα σε πολλά και ποικίλα περιβάλλοντα. Απαντώνται σε φυτικά προϊόντα, φρέσκα λαχανικά, τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και οξέα, υπολείμματα σακχαροκάλαμου και ξύλου, καθώς και ύδατα, προερχόμενα από βιομηχανίες και υπόνομους, (Grimont & Grimont, 2005b). Επίσης έχουν εντοπιστεί σε φυτά γλυκοπατάτας, ρυζιού, καλαμποκιού και μπανάνας (Fouts *et al.*, 2008).

Τα *Klebsiella* είναι επίσης γνωστά έως παθογόνα του ανθρώπου και ορισμένων ζώων. Βακτήρια του γένους *Klebsiella* συχνά συσχετίζονται με λοιμώξεις της εντερικής και της ουροφόρου οδού, καθώς και με ενδονοσοκομιακές λοιμώξεις, όπως η σηψαιμία και η πνευμονία και παρουσιάζουν ανεπτυγμένη ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Ερευνητές, σε πρόσφατη δημοσίευση στο περιοδικό *Journal of Pediatrics*, πιστεύουν ότι ο κολικός στα βρέφη ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα φλεγμονής του εντέρου που προκαλείται από την *Klebsiella*, καθώς στη μελέτη τους, το στέλεχος *Klebsiella* spp. βρέθηκε να είναι πιο συχνό σε μωρά με κολικούς παρά σε μωρά χωρίς κολικούς.

Είδη του γένους, είναι τα *K. mobilis*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. Granulomatis*, *K. teriggana*, *K. ornithinolytica* (είδος *incertae sedis*) ενώ το είδος *K. pneumoniae* περιλαμβάνει τρία υποείδη (Grimont & Grimont, 2005β).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το γένος εντεροβακτηρίων *Klebsiella* και πιο συγκεκριμένα το *Klebsiella pneumoniae*, αποτελεί βακτήριο μοντέλο και αντικείμενο μελέτης της βιολογικής δέσμευσης αζώτου (Martinez *et al.*, 2004). Η μοριακή μελέτη των γονιδίων *nif* του *K. oxytoca* M5a1 (αρχικά αναγνωρισμένο ως *K. pneumoniae*), βοήθησε αρχικά στην αποσαφήνιση της γενετικής της αζωτοδέσμευσης και η οργάνωση των συγκεκριμένων γονιδίων αποτελεί την πιο συμπαγή οργάνωση γονιδίων *nif* που έχει περιγραφεί ως σήμερα (Franché *et al.*, 2008). Επίσης, έχει εντοπιστεί δραστηριότητα γλυκανάσσης (Bally & Elmerich, 2007) και πηκτικικής λυάσης (Triplett, 2007).

Ο βασικός λόγος μελέτης των ειδών του γένους *Klebsiella* που αναπτύσσονται σε φυτικούς ιστούς, είναι η επίδραση της αζωτοδέσμευσης στην ανάπτυξη των φυτών. Έχει αναφερθεί ότι στελέχη του *K. pneumoniae* εισχωρούν στο σιτάρι και στο καλαμπόκι και κατόπιν παράγουν νιτρογενάση, αν και στην περίπτωση του καλαμποκιού απαιτούνται επιπλέον πηγές άνθρακα. Αντίθετα, στο σιτάρι η δράση του *Klebsiella* είναι δυνατό να μειώσει τα συμπτώματα της τροφοπενίας αζώτου, παρέχοντας άζωτο στο φυτό το οποίο ενσωματώνεται στη χλωροφύλλη (Martinez *et al.*, 2004). Επίσης, αναφέρεται θετική επίδραση στην απορρόφηση φωσφόρου και καλίου από κονδύλους πατάτας έπειτα από εμβολιασμό με στελέχη του *K. mobilis* (Barassi *et al.*, 2007). Άλλοι τρόποι θετικής επίδρασης στα φυτά, αφορούν την παραγωγή φυτοορμονών με αντίστοιχη αύξηση του ριζικού συστήματος και επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής ορισμένων φυτών, μέσω δέσμευσης τοξινών του *Xanthomonas albilineans* (Compant *et al.*, 2005).

### 1.3.2.6 Άλλα αζωτοδεσμευτικά μέλη της οικογένειας Enterobacteriaceae

Η οικογένεια Enterobacteriaceae ανήκει στην τάξη *Enterobacteriales* της κλάσης των Πρωτεοβακτηρίων (Brenner & Farmer, 2005). Τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae είναι ευρέως διαδεδομένα και απαντώνται σε εδάφη, ύδατα, καρπούς, ανθοφόρα φυτά, σπέρματα, λαχανικά, αυγά, κρέας καθώς και ζώα, περιλαμβάνοντας έντομα ως και τον άνθρωπο. Ορισμένα γένη της οικογένειας, των

οποίων τα βακτήρια έχουν απομονωθεί από εδάφη, περιλαμβάνουν PGPR και αζωτοδεσμευτικά είδη. Μια πιθανή εξήγηση για την ύπαρξη εντερικών βακτηρίων στο έδαφος αποτελεί το γεγονός, ότι με την επί μακρόν χρήση οργανικών εδαφοβελτιωτικών (κοπριά) στη γεωργία, αναπτύχθηκε μικροβιακή χλωρίδα η οποία προσαρμόστηκε στον διατροφικό κύκλο ζώο-έδαφος-ριζόσφαιρα (Kennedy *et al.*, 2004).

Τα αζωτοδεσμευτικά είδη του γένους για το οποίο γίνεται αναφορά είναι τα: *E. cloacae* (τυπικό είδος) (Grimont & Grimont, 2005α) και *E. gergoviae* (An *et al.*, 2007). Πρόκειται για οπορτουμιστικά, ενδοφυτικά, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια τα οποία είναι κινητά και διαθέτουν πλευρικά μαστίγια.

Στελέχη του *E. cloacae*, τα οποία αζωτοδεσμεύουν, έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες ρυζιού, καλαμποκιού και σακχαροκάλαμου (Grimont & Grimont, 2005α, Peng *et al.*, 2006). Μελέτες έχουν δείξει ότι, ο ταυτόχρονος εμβολιασμός *Enterobacter* με το ριζόβιο *Bradyrhizobium* είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση τόσο του ξηρού βάρους στελεχών όσο και της απόδοσης σε καρπό ψυχανθών, εν συγκρίσει με τον εμβολιασμό του κάθε στελέχους ξεχωριστά (Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado, 2005). Τα μέλη του γένους *Enterobacter*, εκτός της αζωτοδέσμευσης παρουσιάζουν και άλλες ιδιότητες προώθησης ανάπτυξης των φυτών. Το *E. cloacae* έχει την δυνατότητα να παράγει την αυξίνη ινδολοξικό οξύ μέσω του μονοπατιού του ινδολοπυρουβικού οξέος (IryA) και έχει εντοπιστεί η παρουσία του γονιδίου *ipdC* στο γονιδιώμα του. Το γονίδιο *ipdC* εκφράζει την αποκαρβοξυλάση του ινδολοπυρουβικού οξέος, ένα ένζυμο-κλειδί για την παραγωγή της συγκεκριμένης αυξίνης (Koga *et al.*, 1991, Koga *et al.*, 1992). Επίσης, έχει εντοπιστεί το γονίδιο απαμινάση του ACC από στέλεχος του ίδιου είδους, το οποίο έχει ιδιότητες προώθησης της ανάπτυξης (Holguin & Glick, 2003). Το *E. cloacae* ανήκει στην κατηγορία των ειδών βακτηρίων τα οποία περιέχουν παραπάνω από ένα γενότυπο (7 γενότυποι τουλάχιστον) (DNA group) οι οποίοι δεν μπορούν να διαχωριστούν φαινοτυπικά. Επιπλέον, τα στελέχη *E. cloacae* παρουσιάζουν δυσκολίες στην αναγνώρισή τους με χρησιμοποίηση του γονιδίου 16S rRNA (Janda & Abbott, 2007).

Ένα άλλο εξίσου σημαντικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, είναι το *Pantoea agglomerans*. Μέχρι πρότινος, το είδος αυτό ήταν γνωστό ως *Enterobacter agglomerans*. Άλλα συνώνυμα του είδους είναι τα *Erwinia herbicola* και *Erwinia millietiae*. Πρόκειται επίσης, για οπορτουμιστικά, ενδοφυτικά, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια τα οποία είναι κινητά και διαθέτουν

πλευρικά μαστίγια. Στελέχη που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν άζωτο και τα οποία ανήκουν στην ομάδα ομολογίας του *Enterobacter agglomerans*, έχουν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα σιταριού και σόργου αλλά και από στομάχι του *Coptotermes formosanus* (Grimont & Grimont, 2005c). Για την περίπτωση του σιταριού, έχει προταθεί ότι το πρότυπο αποικισμού του εντεροβακτηρίου *P. agglomerans* είναι παρόμοιο με αυτό των *Azoarcus* sp. και *H. seropedicae* (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998). Από δημοσιεύσεις ερευνών με γονίδια αναφοράς, έχει διαπιστωθεί ότι τα βακτήρια *P. agglomerans* αποικίζουν σε μεγάλο βαθμό ενδοκυτταρικούς χώρους ριζών ρυζιού (Tilak *et al.*, 2005). Από τη στιγμή που αυτά εισχωρήσουν στο φυτό, κυτταρολυτικά ένζυμα, όπως η κυτταρινάση και η πηκτινάση, υποβοηθούν την περαιτέρω εξάπλωσή τους εντός του ξενιστή (Bhattacharjee & Singh, 2008). Τέλος, το *Pantoea agglomerans* εκτός από τη δέσμευση αζώτου υποβοηθά την ανάπτυξη των φυτών και μέσω άλλων ιδιοτήτων, όπως παραγωγή της φυτοορμόνης ινδολοξικό οξύ και της πυρρολνιτρίνης καθώς και μέσω ανταγωνιστικής του δράσης με το παθογόνο *Pseudomonas syringae* σε κριθάρι (Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado, 2005, Bally & Elmerich, 2007).

Το *Serratia marcescens* είναι προαιρετικά αναερόβιο, κινητό βακτήριο το οποίο εντοπίζεται σε φυσικά περιβάλλοντα και περιστασιακά σε ανθρώπους-ασθενείς (Grimont & Grimont, 2005d). Στελέχη του εντεροβακτηρίου *Serratia marcescens*, τα οποία έχουν αζωτοδεσμευτική και ενδοφυτική δράση, έχουν απομονωθεί από ρίζες και βλαστούς διαφορετικών ποικιλιών ρυζιού. Στη δημοσίευση των Gyaneshwar και συν. (2001), το *Serratia marcescens* εντοπίστηκε σε ιστούς ρίζας, βλαστών και φύλλων με τη βοήθεια οπτικού και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και με τη χρήση γονιδίων αναφοράς. Οι θέσεις εισόδου του βακτηρίου πιθανώς να εντοπίζονται στα σημεία έκπτυξης πλάγιων ριζικών τριχιδίων, όπως έχει διαπιστωθεί και σε άλλα ενδοφυτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Κατά τον εμβολιασμό του βακτηρίου σε ρύζι *in vitro*, η αζωτοδέσμευση ήταν δυνατή μόνο μετά την προσθήκη επιπλέον πηγών άνθρακα (όπως σακχαρόζη ή μηλικό) στο υπόστρωμα (Gyaneshwar *et al.*, 2001). Έχει διαπιστωθεί επίσης, ότι το *Serratia marcescens* παράγει πυρρολνιτρίνη καθώς και την αντιμυκητιακή ένωση οκυδίνη (oocydin) κατά την ενδοφυτική του δράση στο φυτό *Rhyncholacis penicillata* (Bally & Elmerich, 2007, Ryan *et al.*, 2008). Η μοναδική αναφορά για αζωτοδέσμευση είδους του γένους *Serratia*, εκτός του *S. marcescens*, αποτελεί η απομόνωση στελέχους *Serratia rubidea* από ενδοριζόσφαιρα σιταριού (*Triticum aestivum*) και του *Ammophila arenaria* (Gyaneshwar *et al.*, 2001).

Το ενδοφυτικό είδος *Citrobacter freundii* της οικογένειας Enterobacteriaceae αναφέρεται ως ικανό να δεσμεύει άζωτο. Επίσης, παράγει τοξικές εξοκυτταρικές ενώσεις, οι οποίες σε έρευνες *in vitro* ήταν ικανές να παρεμποδίσουν 50 από τους 100 υπό δοκιμή οργανισμούς ριζόσφαιρας, ενώ δεν επηρέασαν άλλα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (*Pseudomonas* και *Klebsiella*) όταν εμβολιάστηκαν ταυτόχρονα (Kennedy *et al.*, 2004, Tilak *et al.*, 2005).

### 1.3.2.7 *Burkholderia*

Το γένος *Burkholderia*, το οποίο είναι εξαιρετικά ετερογενές, περιλαμβάνει τρεις ομάδες βακτηρίων τα: α) εδαφικά βακτήρια, β) PGP ριζοβακτήρια και γ) παθογόνα φυτών και ανθρώπων (Van Dommelen & Vanderleyden, 2007). Ο αριθμός των ειδών (και γενοτύπων) του, ανέρχεται σε 39 και αυξάνεται ραγδαία μιας και το 2004 το γένος απαριθμούσε 29 (Kennedy *et al.*, 2004, Elmerich, 2007).

Το γένος περιλαμβάνει τόσο αζωτοδεσμευτικά βακτήρια όσο και στελέχη τα οποία αποδομούν οργανικές ύλες, προερχόμενες από ανθρώπινη δραστηριότητα. Τα αζωτοδεσμευτικά είδη του γένους είναι τα *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia tropica* (πρώην *B. tropicalis*), *Burkholderia kururiensis*, *Burkholderia unamae*, *Burkholderia tuberum*, *Burkholderia brasiliensis*, *Burkholderia silvatlantica* και *Burkholderia phynatum*.

Τα στελέχη του γένους έχουν απομονωθεί από μια πληθώρα ενδiciaτημάτων. Το *B. vietnamiensis* ήταν το πρώτο είδος του γένους, το οποίο διαπιστώθηκε ότι δεσμεύει άζωτο σε ρίζες ρυζιού και προωθεί την ανάπτυξη του φυτού. Αργότερα εντοπίστηκε σε ρίζα καλαμποκιού καθώς και σε ριζόσφαιρα και ριζοπλάνο καλαμποκιού και φυτών καφέ (Van Dommelen & Vanderleyden, 2007).

Τα *B. brasiliensis* και *B. tropica* έχουν απομονωθεί από μπανάνα (*Musa spp.*) και ανανά (*Ananas comosus*), αντίστοιχα, ενώ και τα δύο είναι ενδοφυτικά είδη του σακχαροκάλαμου (Kennedy *et al.*, 2004, Van Dommelen & Vanderleyden, 2007). Επίσης, τα στελέχη *B. brasiliensis* MI30 και *B. kururiensis* KP23, βάσει μοριακών αναλύσεων, πιθανώς να αποτελούν ένα είδος (Baldani & Baldani, 2005). Τέλος, σε στελέχη των ειδών *B. tuberum*, *B. phynatum* και *B. caribensis* έχει διαπιστωθεί, τόσο η ικανότητα να επάγουν τον σχηματισμό φυματίων στα ψυχρανθή *Aspalthus carnosus* και *Machaerium lunatum*, όσο και να δεσμεύουν άζωτο. Η παραπάνω

ικανότητα οφείλεται σε γονίδια σχηματισμού φυματίων, τα οποία έχουν αποκτηθεί μέσω οριζόντιας μεταφοράς. Η ιδιότητα αυτή θεωρείτο μέχρι τότε αποκλειστικό προνόμιο βακτηρίων που ανήκαν μόνο στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων (Tilak *et al.*, 2005, Van Dommelen & Vanderleyden, 2007).

Η διαδικασία εισόδου του βακτηρίου έχει μελετηθεί για τα είδη *B. brasilensis* και *B. tropica*. Τα βακτήρια *B. brasilensis* M209, σε φυτά ρυζιού πρώτα πολλαπλασιάζονται στην επιφάνεια της ρίζας και έπειτα διεισδύουν σε ενδοκυτταρικούς χώρους μέσω τραυματισμένων μεμβρανών. Μπορούν επίσης να εισχωρήσουν μέσω πληγών περιοχών των επιδερμικών κυττάρων και σε θέσεις έκπτυξης πλάγιων ριζιδίων. Το είδος αυτό μπορεί επίσης να αποικίσει στομάτια φυταρίων ρυζιού. Η μετάδοση και ο αποικισμός ριζών σακχαροκάλαμου, εμβολιασμένων με *B. tropica* Ppe8, μοιάζουν αρκετά με τις διαδικασίες που παρατηρούνται και σε άλλα ενδοφυτικά βακτήρια. Υψηλοί πληθυσμοί του συγκεκριμένου στελέχους, εντοπίζονται κυρίως στην επιφάνεια ρίζας σακχαροκάλαμου όταν γίνει ταυτόχρονος εμβολιασμός του με άλλα ενδοφυτικά βακτήρια. Σε μελέτες σε αμπέλι, διαπιστώθηκε η δράση ενδογλυκανάσης και πολυγαλακτουρονάσης που βοηθούν τη μετάδοση των *Burkholderia* εντός του φυτού (Bhattacharjee & Singh, 2008).

Ένα στέλεχος *Burkholderia*, στο οποίο ανιχνεύθηκε το γονίδιο *nifH*, διαπιστώθηκε ότι είναι ενδοσυμβιωτικό του ενδοτροφικού μυκορριζικού μύκητα *Gigaspora margarita*, αλλά δεν αποτελεί καλλιεργήσιμο οργανισμό (Schmid & Hartmann, 2007).

Τα είδη του γένους *Burkholderia* έχουν ευεργετικές επιδράσεις σε καλλιεργούμενα φυτά όχι μόνο μέσω δέσμευσης αζώτου από την ατμόσφαιρα, αλλά και με την παραγωγή ενώσεων που έχουν ιδιότητες βιολογικού ελέγχου παθογόνων και νηματωδών. Έχει βρεθεί ότι εμβολιασμός σε ρύζι μπορεί να αυξήσει την παραγωγή σπέρματος μέχρι και 0,8 τόνους ανά εκτάριο και να εξοικονομήσει 25-30 kg αζώτου ανά εκτάριο από τη χρήση λιπασμάτων. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι η παρουσία του *B. vietnamiensis* στην επιφάνεια της ρίζας, δεσμεύει το 19% του αζώτου για φυτό ρυζιού σε ελεγχόμενες συνθήκες, ενώ η ίδια τιμή για ενδοφυτικό *Burkholderia* spp. είναι πολύ μεγαλύτερη (Kennedy *et al.*, 2004). Στα *B. vietnamiensis*, *B. unamae*, *B. phymatum*, *B. xenovorans* και *B. caribiensis* έχει διαπιστωθεί η έκφραση της απαμινάσης του ACC. Η αποδόμηση του ACC έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών (Fuentes-Ramirez & Caballero-

Mellado, 2005). Έχει σημειωθεί ότι βακτήρια του γένους *Burkholderia*, συνθέτουν σαλικυλικό οξύ και πυρρολνιτρίνη. Η πυρρολνιτρίνη έχει ευρεία δράση έναντι ορισμένων μυκητιακών φυτοπαθογόνων, όπως οι *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae* και *Sclerotinia sclerotiorum* (Bally & Elmerich, 2007). Το *Burkholderia phytofirmans* PsJN, επάγει τη διασυστηματική αντοχή σε αμπέλι και τομάτα έναντι του *Botrytis cinerea* και του *Verticillium dahliae*, αντίστοιχα (Compant *et al.*, 2005).

Η περίπτωση του *Burkholderia cepacia* (πρώην *Pseudomonas cepacia*) και των γενοτύπων του, παρουσιάζει ξεχωριστό ενδιαφέρον (Schmid & Hartmann, 2007). Αντιπροσωπεύει ένα ετερογενές είδος του οποίου τα στελέχη έχουν απομονωθεί από έδαφος, ριζόσφαιρα, αμοιβάδα ελεύθερης διαβίωσης (Schmid & Hartmann, 2007, Van Dommelen & Vanderleyden 2007) και νοσοκομειακά περιβάλλοντα. Ορισμένα στελέχη είναι παθογόνα φυτών ή ανθρώπου και ορισμένα παρουσιάζουν δραστηριότητα βιολογικού ελέγχου μέσω παραγωγής αντιμυκητιακών ενώσεων και σιδηροφόρων (Bally & Elmerich, 2007).

### 1.3.2.8 *Aquaspirillum*

Το γένος *Aquaspirillum* περιλαμβάνει αερόβια, ελικοειδή και ραβδόμορφα βακτήρια, τα οποία κατατάσσονται στα β-Πρωτεοβακτήρια.

Απομονώνονται κυρίως, από τρεχούμενα ύδατα, όπως κανάλια, χαντάκια και βόθροι (Pot *et al.*, 2006). Πρόσφατα, απομονώθηκε ένα στέλεχος το οποίο είχε ενδοφυτική δράση στο φυτό *Bambusa blumeana* (μπαμπού) και επιδείκνυε αζωτοδεσμευτική ικανότητα (Wei *et al.*, 2007). Άλλα αζωτοδεσμευτικά μέλη του γένους, είναι τα *Aquaspirillum peregrinum* subsp., *A. peregrinum* subsp. *integrum*, *A. fasciculus* καθώς και ορισμένα στελέχη των *A. itersonii* και *A. itersonii* subsp. *nipponicum*.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το γένος *Aquaspirillum* παρουσιάζει ετερογένεια, γεγονός, το οποίο δικαιολογεί τις δυσκολίες ως προς την ταξινόμηση των μελών του (Pot *et al.*, 2006). Σύμφωνα με πρόσφατη ανακατάταξη, τα αζωτοδεσμευτικά είδη του γένους έχουν μεταφερθεί σε άλλα γένη. Συγκεκριμένα, το *Aquaspirillum peregrinum* μεταφέρθηκε στο γένος *Insolitispirillum*, το *Aquaspirillum itersonii* στο γένος *Novispirillum* και το *Aquaspirillum fasciculus* στο γένος *Prolinoborus*

(Neisseriaceae). Όσον αφορά τα νεοσύστατα (2007) γένη *Insolitispirillum* και *Novispirillum*, ανήκουν στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων, παρά το γεγονός ότι το *Aquaspirillum* ανήκει στα β-Πρωτεοβακτήρια (Yoon *et al.*, 2007).

### 1.3.2.9 *Alcaligenes*

Το γένος *Alcaligenes* περιλαμβάνει κατά Gram<sup>-</sup>, αυστηρώς αερόβια ραβδόμορφα ή κοκκόμορφα βακτήρια, τα οποία είναι κινητά μέσω 1-9 πλευρικών μαστιγίων και ανήκουν στα β-Πρωτεοβακτήρια (Busse & Stolz, 2006).

Το γένος, για το οποίο γίνεται αναφορά, περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1919, έκτοτε έχει υποστεί πολλές ανακατατάξεις.

Πλέον, περιλαμβάνει δύο είδη, το *Alcaligenes faecalis* (με δύο υποείδη *A. faecalis* subsp. *faecalis* και *A. faecalis* subsp. *parafaecalis*) και το *Alcaligenes defragrans* (Busse & Stolz 2006). Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, έχει ανιχνευτεί η αζωτοδεσμευτική ιδιότητα του *Alcaligenes faecalis* και πιστεύεται ότι προωθεί την ανάπτυξη του ρυζιού και άλλων φυτών μέσω παραγωγής ινδολοξικού ή/και απαμινάσης του ACC (Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado, 2005, Elmerich, 2007, Sraepen *et al.*, 2007) Ένα τρίτο είδος, το *Alcaligenes latus*, το οποίο παρουσιάζει αζωτοδεσμευτική ικανότητα, κατά τους Xie & Yokota (2005b) μεταφέρεται στο είδος *Azohydromonas lata*, ενώ κατά τους Busse & Stolz (2006) έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τα *Rubrivivax gelatinosus* και *Leptothrix discophora*. Ανακατάταξη έχει επίσης πραγματοποιηθεί και στο στέλεχος *Alcaligenes faecalis* A15 το οποίο αναγνωρίστηκε ως *Pseudomonas stutzeri* (Vermeiren *et al.*, 1999).



#### 1.4 Σκοπός μελέτη

Ο εμβολιασμός του εδάφους με ελεύθερα διαβιούντα διαζωτροφικά βακτήρια διερευνάται τα τελευταία χρόνια ως μία ακόμη εναλλακτική πρακτική περιορισμού ή αντικατάστασης των ανόργανων χημικών αζωτούχων λιπασμάτων (Park *et al.*, 2005).

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εστιάζει στην ανάπτυξη και εφαρμογή μοριακών μεθόδων ταξινόμησης αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, με στόχο την αξιολόγησή τους ως προς τις ευεργετικές τους ιδιότητες στα φυτά.

Αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε ο μοριακός χαρακτηρισμός έντεκα στελεχών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, προερχόμενα από διαφορετικά γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδας - τους κύριους σιτοβολώνες της χώρας, διαφορετικές ποικιλίες και διαφορετικά σημεία της ρίζας και της ριζόσφαιρας, φυτών μαλακού σιταριού *Triticum aestivum*.

Η μεθοδολογία η οποία υιοθετήθηκε για τη μοριακή προσέγγιση της ταυτοποίησης διαζωτροφικών βακτηριακών στελεχών, περιλαμβάνει την επιλογή τεσσάρων γονιδίων προκειμένου να αναλυθεί τμήμα της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα υπό μελέτη αζωτοδεσμευτικά βακτηριακά στελέχη προέρχονται από διαφορετικά γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδας (Στερεά Ελλάδα, Θεσσαλία και Μακεδονία), διαφορετικές ποικιλίες και διαφορετικά σημεία της ρίζας και της ριζόσφαιρας, φυτών μαλακού σιταριού *Triticum aestivum*. Η απομόνωσή τους πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 2.1) παρουσιάζονται τα βακτηριακά στελέχη τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα, καθώς η ποικιλία ξενιστή, η περιοχή απομόνωσής τους και το τμήμα επέμβασης.

A/A	Κωδικός καλλιέργειας	Είδος φυτού	Ποικιλία ξενιστή	Τοποθεσία	Επέμβαση-παρατηρήσεις
1	Gr 22	<i>Triticum aestivum</i>	Vergina	Δομοκός, Φθιώτιδος	Έδαφος ριζόσφαιρας
2	Gr 23	<i>Triticum aestivum</i>	Vergina	Δομοκός, Φθιώτιδος	Έδαφος ριζόσφαιρας
3	Gr 24	<i>Triticum aestivum</i>	Vergina	Δομοκός, Φθιώτιδος	Επιφάνεια ρίζας
4	Gr 29	<i>Triticum aestivum</i>	Yecora	Γόννοι, Λαρίσσης	Έδαφος ριζόσφαιρας
5	Gr 30	<i>Triticum aestivum</i>	Yecora	Γόννοι, Λαρίσσης	Επιφάνεια ρίζας
6	Gr 35	<i>Triticum aestivum</i>	Yecora	Δομοκός, Φθιώτιδος	Έδαφος ριζόσφαιρας
7	Gr 37	<i>Triticum aestivum</i>	Vergina	Θεσσαλονίκη	Έδαφος ριζόσφαιρας

8	Gr 42	<i>Triticum aestivum</i>	Siete Cerros	Θεσσαλονίκη	Επιφάνεια ρίζας
9	Gr 44	<i>Triticum aestivum</i>	Generoso	Θεσσαλονίκη	Επιφάνεια ρίζας
10	Gr 45	<i>Triticum aestivum</i>	Generoso	Θεσσαλονίκη	Επιφάνεια ρίζας
11	Gr 46	<i>Triticum aestivum</i>	Generoso	Θεσσαλονίκη	Επιφάνεια ρίζας

**Πίνακας 2.1.** 11 υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη. Είδος φυτού, ποικιλία ξενιστή, περιοχή απομόνωσης και τμήμα επέμβασης.

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα στελέχη, τα οποία αποτελούν μοντέλα έρευνας, προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση με τα προαναφερθέντα βακτήρια. Συγκεκριμένα, παρελήφθησαν από την εταιρεία Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms BCCM<sup>TM</sup>/LMG, σε λυοφιλωμένη μορφή, τα εξής στελέχη:

*Azospirillum brasilense* LMG 13127<sup>T</sup> = ATCC29145 = CECT 590 = DSM 1690 = JCM 1224 = NCIB 11860 = Döbereiner Sp7 = Vlassak 002 = LMG 1263.

*Azospirillum lipoferum* LMG 13128<sup>T</sup> = ATCC 29707 = Döbereiner Sp 59b = Krieg VPI Sp59b.

Η εταιρεία παροχής των στελεχών πρότεινε τα θρεπτικά μέσα, Oxoid CM3<sup>II</sup> για το *A. brasilense* και Oxoid CM131<sup>III</sup> για το *A. lipoferum*, των οποίων η σύσταση παρουσιάζεται στο παράρτημα Α'.

## 2.2 Εκτίμηση αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας - Βιοχημική δοκιμή

Για τα εξεταζόμενα βακτηριακά στελέχη πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της αζωτοδεσμευτικής τους δραστηριότητας, βάσει της δραστηριότητας της νιτρογενάσης, με τη μέθοδο αναγωγής ακετυλενίου σε αιθυλένιο (δισ) με αέριο χρωματογράφο Perken-Elmer F-11 (>10 nmoles αιθυλένιο). Η ικανότητα ανίχνευσης αναλυόμενων συστατικών της συγκεκριμένης μεθόδου, είναι αρκετά μεγάλη, φτάνοντας σε κάποιες περιπτώσεις σε τρισεκατομμυριοστά (pg) του γραμμαρίου [συνήθως είναι σε δισεκατομμυριοστά του γραμμαρίου (ng)]

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Ημίρρευστο θρεπτικό υλικό Nfb<sup>V</sup>, σε σωλήνες veroject, εμβολιάζεται με αποικίες βακτηρίων από RC<sup>IV</sup> θρεπτικό υπόστρωμα και επωάζεται στους 30 °C για 24 h.
- Εν συνεχεία, 1 ml ακετυλενίου εγχέεται, με τη βοήθεια σύριγγας, σε κάθε σωλήνα veroject.
- Ακολουθεί επώαση, υπό ανάδευση, στους 28 °C για 24-48 h.
- Έπειτα λαμβάνεται 1 ml αερίου από το εσωτερικό του σωλήνα veroject, με τη βοήθεια σύριγγας, και εγχέεται στον αέριο χρωματογράφο Perken-Elmer F-11 (>10 nmoles αιθυλένιο).
- Το αέριο δείγμα παρασύρεται σε μια στήλη η οποία περιέχει προσροφητικό υλικό, όπου γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών.
- Από την άκρη της στήλης εξέρχονται τα διαχωρισθέντα συστατικά που οδηγούνται στον ανιχνευτή (ηλεκτρονικό μέρος), ο οποίος στέλνει σήμα, εξαρτώμενο από την ένταση ανίχνευσης, στο συνδεδεμένο καταγραφικό.

## 2.3 Μοριακές τεχνικές ταξινόμησης βακτηριακών στελεχών

### 2.3.1 Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από Gram<sup>-</sup> βακτήρια

Η απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το *GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit*.

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB<sup>1</sup> εμβολιάζονται με μεμονωμένη αποικία του κάθε, υπό μελέτη, στελέχους. Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 30°C για 24 h.
- 3 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 2 min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 100 μl διαλύματος R1.
- Εν συνεχεία προστίθενται 10 μl λυσοζύμης<sup>3</sup> (για Gram<sup>-</sup> βακτήρια). Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37 °C για 20 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 180 μl διαλύματος R2 και 20 μl Proteinase K (10mg/100μl TE<sup>2</sup>). Το διάλυμα ανακινείται και επωάζεται, υπό συνεχή ανάδευση, στους 65 °C για 20 min.
- Εάν το δείγμα του DNA εμπεριέχει και υπολείμματα RNA, προστίθενται επιπλέον 20 μl RNase A<sup>4</sup>. Ακολουθεί ανακίνηση και επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37 °C για 5 min.
- Προστίθενται 2 όγκοι (440 μl) από το διάλυμα BG. Το διάλυμα ανακινείται και επωάζεται, υπό συνεχή ανάδευση, στους 65 °C για 10 min.
- Εν συνεχεία το διάλυμα μεταφέρεται προσεκτικά στην ειδική στήλη, όπου φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA προσδένεται στη στήλη και το διάλυμα που διαπερνά αυτή απομακρύνεται.

- Προστίθενται 750 μl διαλύματος Wash Buffer (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου και το διάλυμα που διαπερνά τη στήλη απομακρύνεται.
- Η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται εωσότου απομακρυνθεί πλήρως το διάλυμα Wash Buffer, καθώς εμπεριέχει αιθανόλη, η οποία εάν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε νέο σωλήνα eppendorf, όπου πραγματοποιείται η έκλυση του DNA με προσθήκη 50 μl Elution Buffer ή TE<sup>2</sup> ή ddH<sub>2</sub>O.
- Αφού η στήλη σταθεροποιηθεί για 2 min, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους 4 °C ή στους -20 °C.

### 2.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

#### 2.3.2.1 Αρχή της μεθόδου

Οι συμβατικές μέθοδοι μοριακής κλωνοποίησης θεωρούνται εργαλεία *in vivo* πολλαπλασιασμού του DNA. Ωστόσο, με την ανάπτυξη του συνθετικού DNA δημιουργήθηκε μια νέα μέθοδος γρήγορου πολλαπλασιασμού του DNA *in vitro*, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Brock, 2005). Η τεχνική αυτή (Mullis *et al.*, 1986, Mullis & Faloona, 1987) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης ακολουθιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ*.

Η βασική αρχή της αντίδρασης PCR βασίζεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA. Το εκμαγείο DNA αρχικά αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία 94 °C σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Εν συνεχεία, δύο κατάλληλα σχεδιασμένα, μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), τα οποία καθορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής, υβριδίζονται με το εκμαγείο, ένα με κάθε αλυσίδα. Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών, θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν τα παρακάτω:

- Το μέγεθος των εκκινητών (15-30 νουκλεοτίδια) θα πρέπει να είναι τέτοιο, ώστε η θερμοκρασία για τον υβριδισμό τους στο DNA να κυμαίνεται σε λογικά πλαίσια
- Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή να είναι μοναδική και να υβριδίζεται σε μια μόνο περιοχή του DNA
- Η δομή των εκκινητών θα πρέπει να είναι δευτεροταγής. Στην αντίδραση PCR, όπου χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών δε θα πρέπει τα 3' άκρα τους να είναι συμπληρωματικά
- Η σύνθεση των βάσεων των εκκινητών θα πρέπει να είναι περίπου 50% σε GC και 50% σε AT
- Ο κάθε εκκινητής θα πρέπει να περιέχει στα άκρα του G ή C
- Στην περίπτωση όπου οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών δεν είναι πλήρως συμπληρωματικές με το DNA, η μετάλλαξη ή οι μεταλλάξεις είναι συνήθως στο κέντρο του εκκινητή ή τουλάχιστον 12 νουκλεοτίδια από το 3' άκρο.

Ακολούθως, μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ως μήτρα το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την κατεύθυνση 5'-3', ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου το οποίο είναι δίκλωνο. Για τη συγκεκριμένη σύνθεση απαραίτητη είναι η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων και ιόντων  $Mg^{+2}$ .

Αρχικά για την PCR χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση του *E. coli*. Εξαιτίας της θερμοαισθησίας του προαναφερθέντος ενζύμου και της καταστροφής του στις θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA, συνήθως χρησιμοποιείται η DNA πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει άριστη θερμοκρασία δραστηριότητας στους 72 °C. Η δραστηριότητα, της αναφερόμενης ως *Taq* πολυμεράσης, παραμένει σε υψηλά επίπεδα κατόπιν επανειλημμένης αύξησης της θερμοκρασίας στους 94 °C. Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες μπορεί να επεκτείνονται πέρα από την αλληλουχία βάσεων που ορίζεται από τον άλλον εκκινητή και ως εκ τούτου, δημιουργούνται νέες θέσεις υβριδισμού των εκκινητών. Εν συνεχεία, οι αρχικές αλυσίδες καθώς και οι νεοσυντιθέμενες, αφού πρώτα αποδιαταχθούν με

θέρμανση στου 94 °C, χρησιμεύουν εκ νέου ως μήτρες αντιγραφής όπου θα υβριδιστούν οι εκκινητές.

Εάν αυτός ο κύκλος επαναληφθεί ( $n$ ) φορές, το τελικό αποτέλεσμα θα είναι η σύνθεση  $2^n$  δίκλωνων μορίων DNA που αποτελούν αντίγραφα της αλληλουχίας μεταξύ των δύο εκκινητών, περιλαμβάνοντας και τις αλληλουχίες των εκκινητών στα άκρα τους. Η εκθετική αυτή συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιείται εφόσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες, όπως η έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών και η παραγωγή παρεμποδιστικών ουσιών που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την λειτουργία της πολυμεράσης. Η εξειδίκευση του προϊόντος εξαρτάται, τόσο από την θερμοκρασία υβριδισμού, όσο και από την εξειδίκευση των θέσεων υβριδισμού των συγκεκριμένων εκκινητών στην μήτρα του DNA.

### 2.3.2.2 Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμημάτων DNA, απευθείας από το DNA των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών, με τη χρήση κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών αναφέρεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων (3<sup>ο</sup> κεφάλαιο).

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται στις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος. Η ποσότητα της μήτρας DNA, που προστίθεται κάθε φορά, εξαρτάται από την πηγή προέλευσής του. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιείται ποσότητα 40-50 ng. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξεώς τους ( $T_m$ ) (συνήθως είναι 5 °C κάτω από αυτήν). Οι ακριβείς συνθήκες, υπό τις οποίες τελούνταν οι αντιδράσεις της PCR για το κάθε γονίδιο που μελετήθηκε στην παρούσα έρευνα, αναφέρονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων (3<sup>ο</sup> κεφάλαιο).




Μια τυπική αντίδραση PCR λαμβάνει χώρα ως εξής:

Σε ειδικό σωλήνα erppendorf (100μl) προστίθενται:

1. Γονιδιωματικό DNA	50 ng
2. Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10μM)	1 μl
3. Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10μM)	1 μl
4. Μίγμα dNTPs (10μM)	1 μl
5. 10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα <sup>11</sup>	5 μl
6. DMSO	2μl
7. <i>Taq</i> DNA πολυμεράση (1unit/μl) <sup>1</sup>	

Οι συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι:

Αρχική αποδιάταξη	94 °C για 2-4 min	 35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94 °C για 1 min	
Υβριδισμός εκκινητών	45-65 °C για 1 min	
Επιμήκυνση	72 °C για 1 min /	
Τελική επιμήκυνση	72 °C για 5-10 min.	

Το πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιείται για την PCR προγραμματίζεται στη συσκευή του ειδικού θερμικού κυκλοποιητή.

### 2.3.3 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων, βάσει του μεγέθους και της διαμόρφωσής τους, πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης.

<sup>1</sup> Στην περίπτωση ενίσχυσης μεγάλων τμημάτων DNA (>1000 bp) χρησιμοποιείται 1μl *Taq* πολυμεράσης (1unit/μl)

Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA, ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους τους. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αгарόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αгарόζης και κυμαίνεται από 0,1-100 kb.

Τα μόρια DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου<sup>6</sup>, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας.

Η προετοιμασία της πηκτής και των δειγμάτων γίνεται ως εξής:

- Ποσότητα αгарόζης αναμιγνύεται, σε κωνική φιάλη Erlenmeyer, με ορισμένο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE  $1 \times 10^5$ . Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση πηκτής αгарόζης 1%, με εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA από 0,3-10kb.
- Ακολουθεί σταδιακή θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων εωσότου η αгарόζη διαλυθεί.
- Η θερμοκρασία του διαλύματος αφήνεται να φτάσει έως τους 60 °C και αφού προστεθεί διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου<sup>6</sup>, τελικής συγκέντρωσης 0,5mg/ml, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συσκευή προσαρμόζεται η κατάλληλη «χτένα» έτσι ώστε να σχηματισθούν, στην πηκτή, τα βοηθία φόρτωσης.
- Εν συνεχεία η χτένα απομακρύνεται από την πηκτή. Η συσκευή συμπληρώνεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE  $1 \times 10^5$  έτσι ώστε η πηκτή να παραμείνει βυθισμένη 1-2mm από την επιφάνεια του.
- Ακολουθεί ανάμιξη των δειγμάτων νουκλεϊνικών οξέων με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (1/10 του όγκου loading buffer)<sup>7</sup> και τα δείγματα τοποθετούνται στα βοηθία φόρτωσης
- Τέλος στα άκρα της πηκτής εφαρμόζεται κατάλληλη τάση, η οποία δεν υπερβαίνει τα 60 Vcm<sup>-1</sup>.

### 2.3.4 Ανάκτηση κλάσματος δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων από πηκτική αγαρόζης

Η ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτική αγαρόζης, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το *QIAquick Gel Extraction Kit* της *QIAGEN*<sup>TM</sup>.

- Το τμήμα της πηκτής αγαρόζης το οποίο φέρει την επιθυμητή ζώνη DNA, απομονώνεται με τη χρήση νυστεριού. Εν συνεχεία τοποθετείται σε σωλήνα erppendorf, ζυγίζεται και προστίθενται 3 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος QG (3 μl QG/mg πηκτής).
- Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 50 °C για 10 min (ανά 2-3 min ανακινείται) εωσότου διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη. Εάν χρειαστεί παρατείνεται ο χρόνος επώασης.
- Στο διάλυμα προστίθεται ένας όγκος ισοπροπανόλης (1 μl ισοπροπανόλης/mg πηκτής).
- Το μίγμα ανακινείται ήπια, μεταφέρεται σε φορτισμένη στήλη *QIAQuick Spin* και φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 1 min
- Το DNA προσδένεται στην στήλη και το διάλυμα που διαπέρασε αυτήν απομακρύνεται.
- Ακολουθεί πλύση της στήλης με προσθήκη 750 μl διαλύματος QG και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη απομακρύνεται και η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται για 1 min.
- Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erppendorf και το DNA εκλύεται με την προσθήκη 30 μl ddH<sub>2</sub>O ή διαλύματος EB.
- Αφού η στήλη σταθεροποιηθεί για 1 min, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20 °C.

### 2.3.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Ο προσδιορισμός τόσο της συγκέντρωσης όσο και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα, πραγματοποιείται φωτομετρικά με τη χρήση σπεκτροφωτομέτρου nanodrop (NanoDrop®ND1000 Spectrophotometer). Πριν από τη μέτρηση, επιλέγεται από τον χειριστή το αντίστοιχο λογισμικό της συσκευής (DNA).

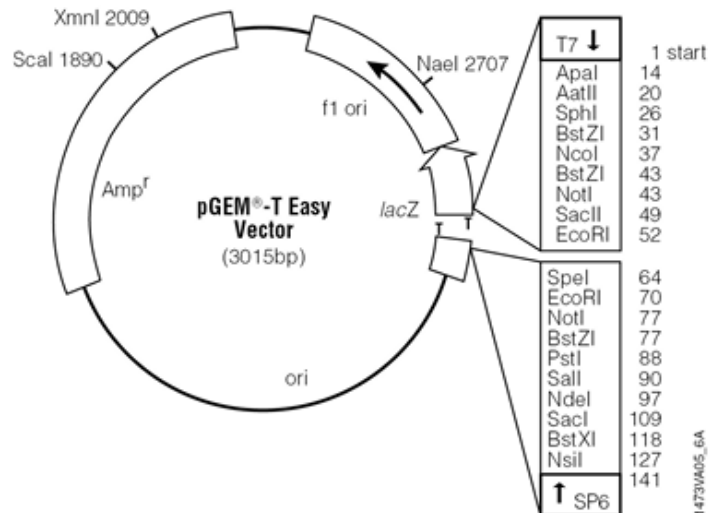
- Για τον μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται ποσότητα 1μl του εκάστοτε διαλύτη (H<sub>2</sub>O ή TE<sup>2</sup>).
- Ποσότητα δείγματος 1μl φωτομετρείται και λαμβάνονται οι λόγοι OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> και OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>, βάσει των οποίων εκτιμάται η καθαρότητα των δειγμάτων των νουκλεϊνικών οξέων
- Όταν ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> είναι 1,8 (περίπου) το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας. Μικρότερες τιμές της προαναφερθείσας αποτελούν ένδειξη μόλυνσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η παρουσία πρωτεϊνών, φαινόλης ή άλλων ουσιών οι οποίες απορροφούν στα 280nm
- Ένα δεύτερο μέτρο καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων αποτελεί ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>. Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας ο συγκεκριμένος λόγος κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,2, έχει δηλαδή τιμές υψηλότερες του OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>. Μικρότερες τιμές αποτελούν ένδειξη μόλυνσης.

### 2.3.6 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα

#### 2.3.6.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα

Ο πλασμιδιακός φορέας ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι ο PGEM-T easy (Promega) (σχήμα 2.1). Σκοπός της χρήσης του, είναι η υποκλωνοποίηση των τμημάτων DNA, προκειμένου να καταστεί ευκολότερος ο χειρισμός τους και να επιτραπεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων τους και γενικότερα ο χαρακτηρισμός τους.

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του προαναφερθέντος φορέα, αναφέρεται ότι οι πλασμιδιακοί φορείς PGEM-T διαθέτουν μια αρχή αντιγραφής (*ori*) και τμήμα του γονιδίου *lacZ* του *E. coli*, που κωδικοποιεί για το α-πεπτίδιο του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Επιπλέον, φέρουν μια πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (πολυσύνδεσμος) εντός του γονιδίου *lacZ* καθώς και τους προαγωγείς της RNA πολυμεράσης, T7 και SP6, οι οποίοι βρίσκονται ένθεν και ένθεν του πολυσυνδέσμου. Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο



Σχήμα 2.1. Χάρτης πλασμιδιακού φορέα PGEM-T easy (Promega)

των παραπάνω προαγωγέων, ενώ η μεταγραφή μπορεί να επάγεται

παρουσία του χημικού ανάλογου της λακτόζης IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοσίδιο). Η β-γαλακτοσιδάση μεταβολίζει την οργανική ένωση X-gal, παράγοντας μια αδρανής ουσία μπλε χρώματος. Η ένθεση ξένου DNA στην περιοχή του πολυσυνδέσμου ωστόσο, διακόπτει τη μεταγραφή του γονιδίου *lacZ*, με αποτέλεσμα την αδυναμία μεταβολισμού της X-gal και IPTG. Τέλος, οι συγκεκριμένοι φορείς φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, γεγονός το οποίο επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων, με αυτούς, βακτηριακών κυττάρων.

### 2.3.6.2 Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Λόγω των κολλωδών άκρων των τμημάτων DNA τα οποία προκύπτουν από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιείται για την κλωνοποίησή τους ο πλασμιδιακός φορέας PGEM-T easy (Promega). Ο φορέας έχει υποστεί πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI και στα τυφλά άκρα που δημιουργήθηκαν προστέθηκαν βάσεις θυμίνης, αφενός για να αποφευχθεί η επανασυγκόλλησή τους, αφετέρου για να βελτιωθεί η ενσωμάτωση του ένθετου τμήματος στον πλασμιδιακό φορέα.

Στην αντίδραση ενσωμάτωσης (ligation), για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, η αναλογία των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και του προς ένθεση τμήματος DNA ρυθμίζεται στο 1:3. Η αραίωση τόσο του φορέα όσο και του ένθετου DNA γίνεται με τρόπο ώστε να διευκολύνεται η επίτευξη της απαιτούμενης αναλογίας (Sambrook *et al.*, 1989)

Σε αντίδραση ενσωμάτωσης τελικού όγκου 10 μl αναμιγνύονται:

1. DNA πλασμιδιακός φορέας	1 μl
2. DNA ένθεσης	1 μl
3. 10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης <sup>8</sup>	1 μl
4. Ένζυμο λιγάση T4 (1 unit/μl)	1 μl
5. ddH <sub>2</sub> O	6 μl

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή 4 °C για 3 h ή 16 h αντίστοιχα.

### 2.3.7 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*

#### 2.3.7.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων *E.coli*

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E. coli* XL-Blue, το οποίο καλλιεργήθηκε σε υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο LB<sup>I</sup>, παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (παραρτήματα Γ'). Η ανάπτυξη του πραγματοποιήθηκε κατόπιν επώασης στους 37 °C για 16 h. Στην περίπτωση υγρής καλλιέργειας, η επώαση τελούνταν υπό ανάδευση.

#### 2.3.7.2 Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων *E.coli* ικανών για μετασχηματισμό (Competent cells)

- 10 ml LB<sup>I</sup> θρεπτικού υλικού εμβολιάζονται με μια αποικία *E. coli* (στέλεχος XL-blue) και επωάζονται, υπό συνεχή ανάδευση, για περίπου 18 h στους 37 °C.

- 2 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB<sup>I</sup>. Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37 °C για 2 h, εφότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να κυμαίνεται από 0.3-0,4 (O.D.<sub>600</sub>=0,3-0,4).
- Οι χειρισμοί που ακολουθούν πραγματοποιούνται στον πάγο ή στους 4 °C.
- Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 10 min.
- Το ίζημα των κυττάρων αφού επαναδιαλύεται με ήπια ανάδευση σε 50 ml MgCl<sub>2</sub> 0,1 M, φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 10 min.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 25 ml CaCl<sub>2</sub> 0,1 M και διατηρείται σε πάγο για 20 min. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 6000 rpm για 10 min.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 ml CaCl<sub>2</sub> 0,1 M και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v).
- Τα κύτταρα αφού διαμοιραστούν σε σωλήνες erpendorf φυλάσσονται στους -80 °C.

### 2.3.7.3 Μετασηματισμός ικανών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδιο

- Σε σωλήνα erpendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 100 μl, ικανά προς μετασηματισμό, κύτταρα *Escherichia coli*
- Προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακού DNA (αφότου τα κύτταρα ξεπαγώσουν), σε όγκο ο οποίος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των προς μετασηματισμό κυττάρων
- Ακολουθεί επώαση του μίγματος κυττάρων-πλασμιδιακού DNA, στον πάγο για 30 min.
- Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα, επιτυγχάνεται με την υποβολή τους σε θερμικό σοκ (Heat-Shock) στους 42 °C για 1 min και την απ' ευθείας μεταφορά τους, στη συνέχεια, στον πάγο.

- Προστίθενται 200 μl θρεπτικού διαλύματος LB<sup>I</sup> και τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 1 h.
- Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB<sup>I</sup> και κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη για τον φορέα PGEM-T easy), ώστε να επιτευχθεί η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.
- Στην περίπτωση όπου σκοπός είναι η επιλογή αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, προστίθενται στα κύτταρα 10μl IPTG 100Mm<sup>9</sup> και 50μl X-Gal 2%<sup>10</sup> (w/v). Οι αποικίες που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, λόγω της διακοπής του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοσιδάση από το ένθεμα, εμφανίζονται λευκές. Αντίθετα, οι αποικίες με μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια, λόγω της δράσης του ενζύμου, εμφανίζουν μπλε χρώμα.
- Τέλος, τα τρυβλία με το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επωάζονται τους 37 °C για 18 h.

### 2.3.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli*

Στην παρούσα μελέτη η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του *QIAprep Spin Miniprep Kit* της *QIAGEN*<sup>TM</sup> σύμφωνα με την εξής διαδικασία:

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB<sup>I</sup> που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό-αμπικιλίνη, εμβολιάζονται με μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*, τα οποία έχουν μετασχηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37 °C για 16 h.
- 3 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 6000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 250 μl διαλύματος P1, το οποίο εμπεριέχει RNase A.



- Προστίθενται 250 μl διαλύματος P2 (εμπεριέχει NaOH), το διάλυμα ανακινείται απαλά και αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 5 min. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η λύση των κυττάρων.
- Προστίθενται 350 μl διαλύματος N3 (εμπεριέχει οξικό οξύ και γουανιδίνη-HCl), ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και μεταφέρεται σε στήλη *QIAprep*.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Σε αυτό το στάδιο το πλασμιδιακό DNA έχει προσδεθεί στην στήλη και το διάλυμα που την έχει διαπεράσει απομακρύνεται.
- Προστίθενται 350 μl διαλύματος PE (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που διαπερνά την στήλη απομακρύνεται και η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται, ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα PE καθώς εμπεριέχει αιθανόλη, η οποία εάν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε νέο σωλήνα eppendorf και ακολουθεί έκλουση, του προσδεμένου στη στήλη, DNA, με την προσθήκη 30 μl διαλύματος EB (10mM Tris-HCl, pH:8,5) ή ddH<sub>2</sub>O και αφήνεται σε ηρεμία για 1 min
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20 °C.

### 2.3.9 Πέψη δεοξυριβονουκλεοτιδικών οξέων (DNA) με χρήση ενζύμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού

Οι πέψεις των δειγμάτων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού πραγματοποιούνται σε τελικό όγκο ο οποίος εξασφαλίζει την πραγματοποίηση των αντιδράσεων. Τόσο η ποσότητα και η καθαρότητα του DNA, όσο και η ποσότητα του ενζύμου περιορισμού, καθορίζουν το συγκεκριμένο όγκο. Συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 20  $\mu$ l-100  $\mu$ l.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Σε σωλήνα erpendorf τοποθετούνται: το δείγμα DNA, η ενδονουκλεάση περιορισμού καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο απαιτείται για την δράση του ενζύμου. Συνήθως χρησιμοποιείται μία μονάδα ενζύμου (1 unit) για κάθε μικρογραμμάριο δείγματος DNA. Εάν το δείγμα του DNA εμπεριέχει και υπολείμματα RNA, προστίθεται επιπλέον και RNase A<sup>4</sup>. Τέλος προστίθεται ddH<sub>2</sub>O μέχρι τον επιθυμητό όγκο.
- Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI με αλληλουχία αναγνώρισης G/AATTC (όπου /: ορισμός σημείου πέψεως στην αλληλουχία) και βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους 37 C°

Σε μια τυπική αντίδραση πέψης τελικού όγκου 30  $\mu$ l αναμιγνύονται:

1. Διάλυμα DNA 1 $\mu$ g (σε H <sub>2</sub> O ή TE <sup>2</sup> )	έως 10 $\mu$ l
2. Ένζυμο περιορισμού (1 unit/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
3. 10x ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	3 $\mu$ l
4. RNase A <sup>4</sup> (1 mg/ml)	0,5 $\mu$ l
5. ddH <sub>2</sub> O	έως τελικό όγκο 30 $\mu$ l

- Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται σε κατάλληλη θερμοκρασία για 3-4 h.
- Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αгарόζης.

### 2.3.10 Αλληλούχηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequencing)

Πλασμιδικό DNA που απομονώθηκε με τη μέθοδο του *QIAprep Spin Miniprep Kit* της *QIAGEN*<sup>TM</sup>, εστάλη για αυτόματη αλληλούχηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε ιδιωτική εταιρεία. Για κάθε κλώνο παρελήφθησαν 700-900bp και επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα DNASTar ως προς την εύρεση τμημάτων που έχουν υποκλωνοποιηθεί στον φορέα PGEM-T easy, δηλαδή εντοπισμός των εκκινήτων που οριοθετούν το τμήμα του DNA που έχει υποκλωνοποιηθεί.

### 2.3.11 Σύγκριση ακολουθιών, φυλογενετική ανάλυση

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη, η αναζήτηση της ταυτότητας των υπό μελέτη ακολουθιών πραγματοποιήθηκε με σύγκριση αυτών, με τις διαθέσιμες ακολουθίες της βάσης δεδομένων GenBank, χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Tool, Altschul *et al.*, 1990) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>).

Η μετάφραση των ακολουθιών σε αμινοξικές και η ανάλυσή τους έγινε με το πρόγραμμα ComputerI/MW του διαδικτυακού τόπου ExPASy (Expert Protein Analysis System) (Gasteiger *et al.*, 2003) (<http://ca.expasy.org/tools/>).

Η ευθυγράμμιση των υποκλώνων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε μέσω του αλγόριθμου πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), του προγράμματος Lasergene 7.0.

Η εκτίμηση των εξελικτικών αποστάσεων των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών ακολουθιών, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και κατανομής Poisson (Zuckerkanld & Pauling 1965b) αντίστοιχα, με τη βοήθεια του λογισμικού DNASTar.

Τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), μέσω του προγράμματος MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tamura *et al.*, 2007). Η αξιοπιστία και η σταθερότητα των σχέσεων του δενδρογράμματος εκτιμήθηκε μέσω 1000 bootstrap δειγμάτων.

## 2.4 Ανθεκτικότητα βακτηριακών στελεχών παρουσία άλατος και αντιβιοτικού

### 2.4.1 Ανθεκτικότητα σε αλατότητα

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε επιπλέον, η αντοχή των εξεταζόμενων βακτηριακών στελεχών στην αλατότητα.

Το κάθε στέλεχος αναπτύσσεται σε:

- υγρό θρεπτικό υλικό LB<sup>I</sup>, παρουσία MgSO<sub>4</sub> και CaCl<sub>2</sub> τελικής συγκέντρωσης 2,5 mM (μάρτυρας) και
- υγρό θρεπτικό υλικό LB<sup>I</sup>, παρουσία MgSO<sub>4</sub> και CaCl<sub>2</sub> τελικής συγκέντρωσης 2,5 mM, εμπλουτισμένο με NaCl τελικής συγκέντρωσης 1%<sup>12</sup>, 5%<sup>13</sup> και 10%<sup>14</sup> αντίστοιχα.

Ακολουθεί επώαση στους 30 °C για 24 h.

Τέλος πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας σε μήκος κύματος 600 nm.

### 2.4.2 Ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Rifabacin (Rif)

Μία ακόμα παράμετρος η οποία μελετήθηκε είναι η ανθεκτικότητα των στελεχών *Gr 35* και *Gr 37* στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη (Rif).

Τα εξεταζόμενα στελέχη αναπτύσσονται σε:

- στερεό θρεπτικό μέσο LB<sup>I</sup>, παρουσία MgSO<sub>4</sub> και CaCl<sub>2</sub> τελικής συγκέντρωσης 2,5 mM (μάρτυρας) και
- στερεό θρεπτικό μέσο LB<sup>I</sup>, παρουσία MgSO<sub>4</sub> και CaCl<sub>2</sub> τελικής συγκέντρωσης 2,5 mM, εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό ριφαμπικίνη (Rif) τελικής συγκέντρωσης 17, 8,5, 4,25 και 2,125 μg αντίστοιχα.

Ακολουθεί επώαση στους 30 °C για τουλάχιστον 24 h

Τέλος, εξετάστηκε η αντοχή των παραπάνω στελεχών σε ακόμα υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού. Μονή αποικία, του ανθεκτικού στη ριφαμπικίνη, στελέχους, από το υπόστρωμα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (Rif 17μg), εμβολιάστηκε σε στερεό θρεπτικό μέσο LB<sup>I</sup>, παρουσία MgSO<sub>4</sub> και CaCl<sub>2</sub> τελικής συγκέντρωσης 2,5 mM, εμπλουτισμένο με ριφαμπικίνη (Rif) τελικής συγκέντρωσης 34 μg. Ακολούθως, μονή αποικία του ανθεκτικού στελέχους, από το υπόστρωμα με

τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (34μg) εμβολιάστηκε σε θρεπτικό μέσο τελικής συγκέντρωσης Rif 68 μg. Ομοίως, σε θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμένο με Rif συγκέντρωσης 136 μg. Με τον τρόπο αυτό επετεύχθη διαδοχική μετάλλαξη των βακτηρίων (step by step).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Μοριακή ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA

Τη δεκαετία '80 η επιστημονική κοινότητα άρχισε να στηρίζεται στη μοριακή βιολογία, προκειμένου να διερευνήσει τις φυλογενετικές σχέσεις των βακτηριακών στελεχών. Η ανάπτυξη μεθόδων μοριακής ταυτοποίησης και ταξινόμησης, ιδιαίτερας αυτών που στηρίζονται στη συγκριτική ανάλυση της αλληλουχίας 16S, προσέφερε τη δυνατότητα να υπερκεραστούν οι περιορισμοί της κλασικής μικροβιολογίας.

Η άποψη ότι τα μόρια πιθανώς να αποτελούν «αποδείξεις της εξελικτικής ιστορίας» ή «μοριακά χρονόμετρα», διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τους Zuckerkandl & Pauling (1965). Στις αρχές της δεκαετίας '70 ο Carl Woese στο πανεπιστήμιο Illinois αναγνώρισε το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 16S rRNA, ως ένα δυναμικό φυλογενετικό εργαλείο και σύντομα δημιουργήθηκαν τα πρώτα φυλογενετικά δέντρα προκαρυωτικών οργανισμών βάσει του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος (Fox *et al.*, 1980). Έκτοτε, οι πρόοδοι στη νουκλεοτιδική αλληλούχηση και η ανάπτυξη της τεχνικής ενίσχυσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), έχουν βοηθήσει στην αναγνώριση νέων ειδών βακτηρίων και στην ταξινόμηση εκ νέου ορισμένων παλαιότερων, ενώ έχουν δημιουργηθεί και βάσεις δεδομένων γονιδίων. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των αναγνωρισμένων προκαρυωτικών ειδών το 1980 ήταν 1.792 (Approved Lists of Bacterial Names), ενώ σήμερα ανέρχεται σε 13.675, δηλαδή υπήρχε αύξηση 518 % (Skerman *et al.*, 1980, Euzéby, 1997).

Τα μεγάλα βακτηριακά rRNA, τα 16S και 23S (1.500 και 2.900 νουκλεοτίδια αντίστοιχα), περιέχουν αρκετές περιοχές με εκτενώς συντηρημένες αλληλουχίες, χρήσιμες για την επίτευξη σωστών στοιχίσεων. Επιπλέον χαρακτηρίζονται από σημαντική μεταβλητότητα σε άλλες περιοχές του μορίου, ώστε να χρησιμεύουν ως εξαιρετικά φυλογενετικά χρονόμετρα. Η διαφοροποίηση των δομικών περιοχών οφείλεται σε διαφορετικές λειτουργικές πιέσεις επιλογής οι οποίες δρουν επί ανεξάρτητων δομικών στοιχείων. Αυτές οι διακυμάνσεις στη συντήρηση των ακολουθιών επιτρέπουν την αναπαράσταση τα φυλογένειας για ένα ευρύ φάσμα συγγενειών από το επίπεδο της επικράτειας ως το επίπεδο του είδους.

Γρήγορα έγινε αντιληπτό ότι το γονίδιο 16S rRNA πλεονεκτεί έναντι άλλων συντηρημένων γονιδίων (Ludwig & Klenk, 2005). Πλέον, αποτελεί το πιο αποδεκτό και πλέον χρησιμοποιούμενο συντηρημένο γονίδιο, που χρησιμοποιείται στη βακτηριακή ταξινόμηση και φυλογένεια για τους εξής λόγους:

- a) Η παρουσία του, σχεδόν, σε όλα τα βακτήρια, συχνά ως πολλαπλά γονίδια ή οπερόνια,
- b) η λειτουργία του γονιδίου 16S rRNA δεν έχει αλλάξει με το πέρασμα του χρόνου, υποδηλώνοντας ότι οι τυχαίες αλλαγές στην αλληλουχία είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικές της εξέλιξης, και
- c) βάσει του μεγέθους του, εξυπηρετεί σε έρευνες βιοπληροφορικής (Janda & Abbott, 2007). Αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με την ad-hoc επιτροπή για την επανεκτίμηση του προσδιορισμού ειδών στη βακτηριολογία, κατά την περιγραφή ενός νέου είδους η ακολουθία 16S rRNA, προκειμένου να είναι αντιπροσωπευτική πρέπει να είναι μεγαλύτερη των 1.300 βάσεων (<0,5% αμφιβολία) (Stackebrandt *et al.*, 2002).

Το 16S rRNA, έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον, λόγω ευχρηστίας του, για την ανάλυση της φυλογένεσης τόσο των προκαρυωτικών όσο και των ευκαρυωτικών οργανισμών (18S rRNA). Η βάση δεδομένων των αλληλουχιών rRNA στο Πρόγραμμα Ριβοσωματικής Βάσης Δεδομένων (Ribosomal Database Project-RDP), αριθμεί πάνω από 24.000 αλληλουχίες και είναι προσβάσιμη μέσω διαδικτύου (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>). Ένα μεγάλο ποσοστό προκαρυωτικών ειδών αντιπροσωπεύεται από ακολουθίες 16S rRNA που προέρχονται από τυπικά στελέχη ή από στενά συγγενικά στελέχη (Ludwig & Klenk, 2005).

Πέραν της ευρείας αποδοχής που λαμβάνει το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 16S rRNA, ως φυλογενετικός δείκτης, παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα.

Ανάλογα με τη λειτουργική σημασία, τα δομικά στοιχεία των rRNA δεν μπορούν να διαφοροποιούνται ελεύθερα και οι αλλαγές στην ακολουθία τους δε φαίνεται να αποτελούν μια συνεχή διαδικασία. Έτσι, η απόκλιση των σύγχρονων ακολουθιών rRNA μπορεί να αποδεικνύει την επιτυχία των κοινών προγόνων και των σύγχρονων απογόνων τους, αλλά δεν πρέπει να θεωρείται δεδομένο ότι υπάρχει άμεση αλληλεξάρτηση με μία χρονική κλίμακα. Μειονέκτημα επίσης αποτελεί και η ύπαρξη πολλαπλών γονιδίων σε έναν οργανισμό. Μέχρι πρότινος, επικρατούσε η άποψη ότι δεν υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ πολλαπλών ακολουθιών rRNA για έναν οργανισμό (Ludwig & Klenk, 2005). Αν και για τα περισσότερα είδη η ομολογία μεταξύ ακολουθιών rRNA είναι 99%, για ορισμένα είδη αυτό δεν ισχύει. Σε ορισμένα στελέχη, όπως τα *Thermomonospora chromogena*, *Thermobispora bispora* και *Haloarcula marismortui*, οι διαφορές των γονιδίων 16S και 23S ανέρχονται στο 10% (Hashimoto *et al.*, 2003). Τέλος, ένας ακόμα περιορισμός που προκύπτει, είναι το γεγονός ότι οργανισμοί οι οποίοι έχουν ακολουθίες rRNA με υψηλή ομολογία μπορεί να έχουν σημαντικές διαφορές στο επίπεδο του συνολικού γονιδιώματος. Συνεπώς, κατά την ερμηνεία των φυλογενετικών δέντρων πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στα πρότυπα διακλάδωσης στην περιφέρεια του δέντρου διότι, πιθανώς, να μην αντιπροσωπεύουν την πραγματική φυλογένεια. Δεδομένης της χαμηλής φυλογενετικής αναλυτικής δύναμης σε τέτοια επίπεδα σχετικότητας (άνω του 70% ομολογίας) προτείνεται η υποστήριξη των αποτελεσμάτων με έρευνες DNA-DNA υβριδισμού (Ludwig & Klenk, 2005).

### 3.1.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA

Για τη μοριακή ανάλυση του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16S rRNA, πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση τμήματος ~1450 bp (96,6% του συνολικού 16S rRNA γονιδίου) μέσω της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR), κατόπιν επιλογής των κατάλληλων εκκινήτων


Τα ζεύγη των εκκινήτων (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος 16S rRNA (Weisburg, *et al.*, 1991) είναι:

**16S Forward: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCGAGCCAGGATCAAACCTCT- 3'**

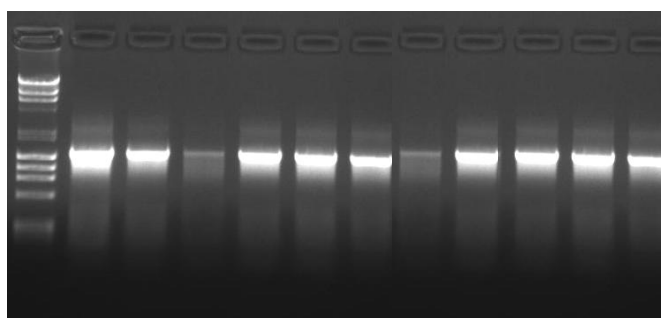
**16S Reverse: 3' -TGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGGCTACCTTGTTACGACTTCA- 5'**



Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR ήταν οι ακόλουθες:

Αρχική αποδιάταξη	94 °C για 4 min		35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94 °C για 1 min		
Υβριδισμός εκκινητών	48 °C για 1 min		
Επιμήκυνση	72 °C για 1 min		
Τελική επιμήκυνση	72 °C για 5-10 min		

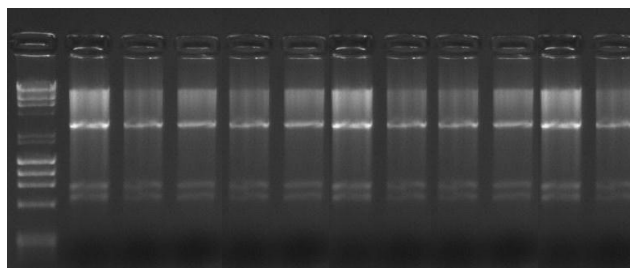
M 22 23 24 29 30 35 37 42 44 45 46



**Σχήμα 3.1.** Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA, μεγέθους 1450 bp, στο ολικό γονιδιωματικό DNA των υπό μελέτη δειγμάτων, μέσω της αντίδρασης PCR (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III).

Τα προϊόντα της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης, που προέκυψαν υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα PGEM-T easy (Promega) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing)

M 22 23 24 29 30 35 37 42 44 45 46



**Σχήμα 3.2.** Πέψεις με το ένζυμο EcoRI των πλασμιδίων, από τους PGEM-T κλώνους 16S rRNA των υπό μελέτη δειγμάτων (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III).

### 3.1.2 Αποτελέσματα BLAST και συχρότητα νουκλεοτιδίων

Οι μέθοδοι για τον προσδιορισμό των αλληλουχιών ριβοσωμικών RNA, αλλά και για τον σχεδιασμό φυλογενετικών δέντρων, αφορά έναν συνδυασμό μοριακής βιολογίας και αναλύσεων με ηλεκτρονικούς υπολογιστές. Οι νεοπροσδιοριζόμενες αλληλουχίες συγκρίνονται με τις υπάρχουσες στο RDP και με αλληλουχίες από άλλες βάσεις γενετικών δεδομένων όπως η GenBank (Η.Π.Α.), DDPS (Ιαπωνία) ή EMBL (Γερμανία).

Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των υπό μελέτη αλληλουχιών, με τα στοιχεία της βάσης δεδομένων GenBank, μέσω του διαδικτυακού προγράμματος BLAST του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.

Strain	Υποκλώνος	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max identity
Gr22	pGEM T 16S 22	AY061963.2/ EF634031.1	<i>Azospirillum</i> sp. NS01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence/ <i>Azospirillum</i> brasilense strain ISSDS-858 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2627/ 2623	2627/ 2623	98%/ 98%	99%/ 100%
Gr23	pGEM T 16S 23	EF634028.1/ AY061963.2	<i>Azospirillum</i> brasilense strain ISSDS-855 16S ribosomal RNA gene, partial sequence/ <i>Azospirillum</i> sp. NS01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2634/ 2621	2634/ 2621	99%/ 98%	99%/ 99%
Gr24	pGEM T 16S 24	AB508852.1/ DQ682470.1/ DQ682469.1	<i>Azospirillum</i> sp. TSH56 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence / <i>Azospirillum</i> <i>zaeae</i> strain N7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence/ <i>Azospirillum</i> <i>zaeae</i> strain N6 16S ribosomal	2569/ 2519/ 2507	2569/ 2519/ 2507	98%/ 100%/ 100%	99%/ 97%/ 97%

			RNA gene, partial sequence				
Gr29	pGEM T 16S 29	GU396258.1 EF634028.1/	<i>Azospirillum</i> sp. YM 274 16S ribosomal RNA gene, partial sequence/ <i>Azospirillum brasilense</i> strain ISSDS-855 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2573/ 2573	2573/ 2573	98%/ 99%	99%/ 99%
Gr30	pGEM T 16S 30	GU396258.1/ EF634028.1	<i>Azospirillum</i> sp. YM 274 16S ribosomal RNA gene, partial sequence/ <i>Azospirillum brasilense</i> strain ISSDS-855 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2560/ 2556	2560/ 2556	98%/ 99%	99%/ 98%
Gr35	pGEM T 16S 35	AY118222.1/ AB508872.1	<i>Azospirillum</i> sp. Mat2-1a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence/ <i>Azospirillum</i> sp. TSH91 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2542/ 2518	2542/ 2518	100%/ 98%	98%/ 98%
Gr37	pGEM T 16S 37	EF634028.1/ AY061963.2	<i>Azospirillum brasilense</i> strain ISSDS-855 16S ribosomal RNA gene, partial sequence/ <i>Azospirillum</i> sp. NS01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2615/ 2603	2615/ 2603	99%/ 98%	99%/ 99%
Gr42	pGEM T 16S 42	AY118225.1/ AF411852.1/ AY150046.2	<i>Azospirillum</i> sp. DA10-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence/ <i>Azospirillum</i> sp. 7C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence/ <i>Roseomonas fauriae</i> strain ATCC 49958 16S ribosomal RNA gene,	2595/ 2567 2562	2595/ 2567/ 2562	100%/ 98% 99%	99%/ 99%/ 98%

			partial sequence				
Gr44	pGEM T 16S 44	HM749063.1/ FN377741.1/ EU652064.1	<i>Pseudomonas</i> sp. sampath10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence/ <i>Pseudomonas</i> sp. VI-71 partial 16S rRNA gene, isolate VI-71/ <i>Pseudomonas</i> sp. me-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2761/ 2760/ 2756	2761/ 2760/ 2756	100%/ 99%/ 100%	99%/ 99%/ 99%
Gr45	pGEM T 16S 45	HM749063.1/ FN377741.1/ EU652064.1	<i>Pseudomonas</i> sp. sampath10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence/ <i>Pseudomonas</i> sp. VI-71 partial 16S rRNA gene, isolate VI-71/ <i>Pseudomonas</i> sp. me-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2763/ 2761/ 2758	2763/ 2761/ 2758	100%/ 99%/ 100%	99%/ 99%/ 99%
Gr46	pGEM T 16S 46	HM749063.1/ FN377741.1/ EU652064.1	<i>Pseudomonas</i> sp. sampath10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence/ <i>Pseudomonas</i> sp. VI-71 partial 16S rRNA gene, isolate VI-71/ <i>Pseudomonas</i> sp. me-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2747/ 2745/ 2741	2747/ 2745/ 2741	100%/ 99%/ 100%	99%/ 99%/ 99%

**Πίνακας 3.1.** Αποτελέσματα σύγκρισης των 11 υποκλώνων 16 S rRNA, με τη βάση δεδομένων BLAST του NCBI.

Εν συνεχεία της προαναφερθείσας μοριακής ανάλυσης των 11 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών 16S rRNA, προέκυψαν τα παρακάτω στατιστικά στοιχεία ως προς τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων και των αθροισμάτων A+T(U) και G+C, μέσω του λογισμικού Lasergene 7.0 (πίνακας 3.2).

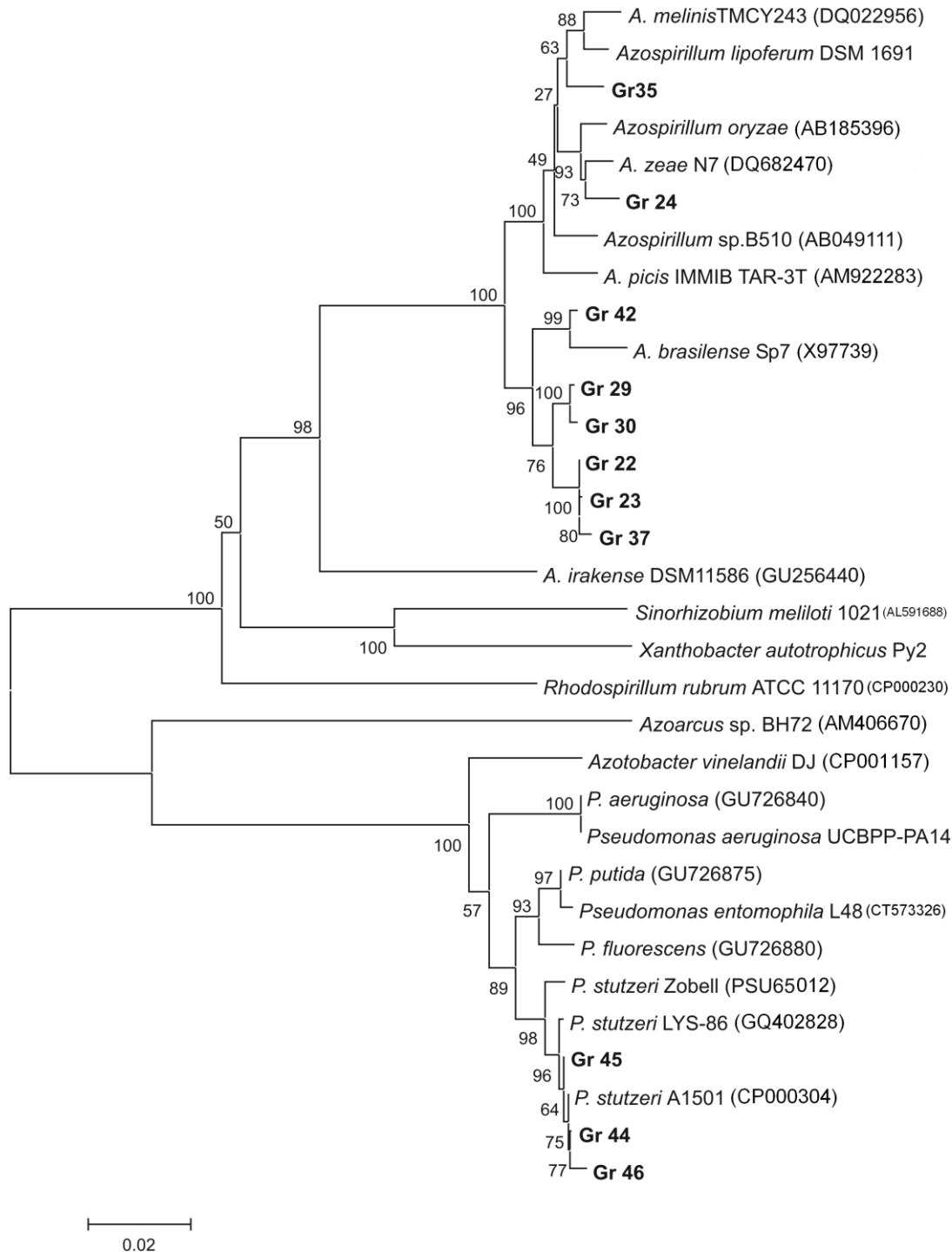
Strain	% A	% G	% T (U)	% C	% A+T (U)	% C+ G	Σύνολο
Gr22	23,44	32,78	19,09	24,69	42,53	57,47	1446
Gr23	23,44	32,78	19,02	24,76	42,46	57,54	1446
Gr24	23,57	32,76	19,21	24,46	42,78	57,22	1447
Gr29	23,31	32,92	19,29	24,48	42,6	57,4	1446
Gr30	23,12	33,06	19,32	24,5	42,44	57,56	1449
Gr35	23,6	32,64	19,39	24,36	43	57	1449
Gr37	23,32	32,8	19,24	24,64	42,56	57,44	1445
Gr42	23,27	32,87	18,99	24,86	42,27	57,73	1448
Gr44	25,37	31,44	20,83	22,36	46,19	53,81	1498
Gr45	25,35	31,49	20,81	22,35	46,16	53,84	1499
Gr46	25,48	31,35	20,88	22,28	46,36	53,64	1499
Μέσος όρος	23,93	32,44	19,64	23,97	43,57	56,42	-

**Πίνακας 3.2.** Συχνότητα νουκλεοτιδίων, αθροισμάτων A+T(U) και G+C καθώς και ο μέσος όρος αυτών, στην κάθε αλληλουχία των 11 υποκλώνων 16S rRNA. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Lasergene 7.0.

### 3.1.3 Φυλογενετικό δέντρο των ακολουθιών 16S rRNA

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση και εκτίμηση των εξελικτικών αποστάσεων των υποκλώνων 16S rRNA και ακολουθιών διαθέσιμων στο διαδίκτυο (accession numbers), μέσω του αλγόριθμου πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) και της μεθόδου Maximun Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) αντίστοιχα, με τη βοήθεια του λογισμικού DNASTar. Τα αποτελέσματα αυτών παρατίθενται στα παραρτήματα Δ' και Ε'.

Ακολούθως κατασκευάστηκε το δενδρόγραμμα των ακολουθιών 16S rRNA (σχήμα 3.3), με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987).



**Σχήμα 3.3.** Εξελεγκτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς, βάσει τμήματος του γονιδίου 16S rRNA. Η απεικόνιση της εξελεγκτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονιστεί η εξελεγκτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa (32 taxa). Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μια ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελεγκτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν στο σύνολο των δεδομένων (επιλογή πλήρους επάλειψης). Σύνολο 1282 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2004)

Accession Numbers

*Azospirillum melinis* strain TMCY 243, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
GenBank: DQ022956

*Azospirillum lipoferum* strain DSM 1691, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
GenBank: GU256441

*Azospirillum oryzae* COC8, gene for 16S rRNA, partial sequence  
GenBank: AB185396

*Azospirillum zea* strain N7, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
GenBank: DQ682470

*Azospirillum* sp. B510, gene for 16S rRNA, partial sequence  
GenBank: AB049111

*Azospirillum picis* partial 16S rRNA gene, type strain IMMIB TAR-3T  
GenBank: AM922283

*A. brasilense* Sp7, 16S rRNA gene  
GenBank: X79739

*Azospirillum irakense* strain DSM 11586 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
GenBank: GU256440

*Sinorhizobium meliloti* 1021, complete chromosome  
GenBank: AL591688

*Xanthobacter autotrophicus* Py2, complete genome  
GenBank: CP000781

*Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170, complete genome  
GenBank: CP000230

*Azoarcus* sp. BH72, complete genome  
GenBank: AM406670

*Azotobacter vinelandii* DJ; ATCC BAA-1303, complete genome  
GenBank: CP001157

*Pseudomonas aeruginosa* strain 1242, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
GenBank: GU726840

*Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14, complete genome  
GenBank: CP000438

*Pseudomonas putida* strain 1389, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
GenBank: GU726875

*Pseudomonas entomophila* str. L48 chromosome, complete sequence

GenBank: CT573326

*Pseudomonas fluorescens* strain 1408, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: GU726880

*P. stutzeri* Zobell ATCC 14405, 16S rRNA, 23S rRNA, 5S rRNA, tRNA-Ile, and tRNA-Ala genes, complete sequences

GenBank: PSU65012

*Pseudomonas stutzeri* strain LYS-86, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: GQ402828

*Pseudomonas stutzeri* A1501, complete genome

GenBank: CP000304



### 3.2 Μοριακή ανάλυση του γονιδίου *nifH*

Το γονίδιο *nifH*, το οποίο απαντάται σε όλους τους προκαρυωτικούς αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς, κωδικοποιεί για την αναγωγή της νιτρογενάσης. Το οπερόνιο *nifHDK* στο οποίο βρίσκεται το *nifH* γονίδιο, είναι ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ των αζωτοδεσμευτικών οργανισμών και προκύπτει το ερώτημα κατά πόσο η φυλογένεια των γονιδίων *nif* απεικονίζει την καταγωγή των βακτηρίων που την κατέχουν (Young *et al.*, 1992).

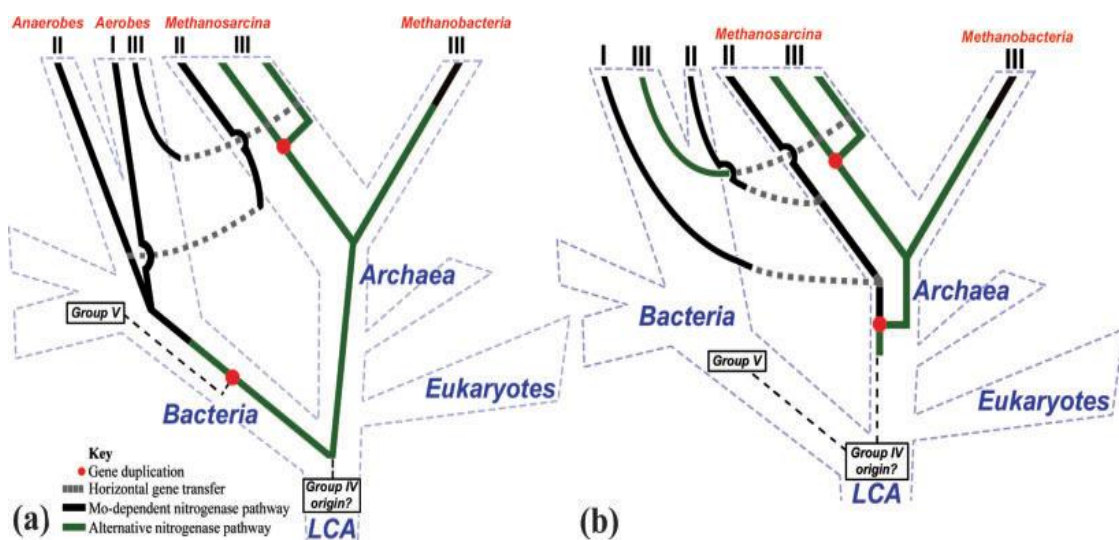
Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες σύγκρισης των αναμφισβήτητα αποδεκτών γονιδίων 16S rRNA και των *nifH*, προκειμένου να διαπιστωθεί, η συμφωνία του φυλογενετικού δέντρου που προκύπτει από το 16S rRNA και του αντίστοιχου *nifH*. Τα αποτελέσματα των ερευνών έδειξαν ότι πολλά χαρακτηριστικά του φυλογενετικού δέντρου του *nifH*, συμφωνούν απόλυτα με τη φυλογένεια του 16 S rRNA. Το γεγονός αυτό παρουσιάζει αναμφισβήτητη χρησιμότητα, διότι εκτός του γονιδίου 16S rRNA προτείνεται η μοριακή ανάλυση περισσότερων του ενός γονιδίων. Η ποικιλότητα των γονιδίων *nifH* επιτρέπει τόσο τη ‘χονδρική’ εκτίμηση της ταξινόμησης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων όσο και τη διερεύνηση της ποικιλότητας αυτών (Poly *et al.*, 2001). Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και από τη μοριακή ανάλυση των γονιδίων *nifD* και *nifK*, τα οποία πιθανώς να αποτελούν αξιόπιστους φυλογενετικούς δείκτες, παρόλο που δεν προκύπτει απόλυτη συμφωνία μεταξύ της φυλογένειας των γονιδίων *nifH*, *nifD* και *nifK* (Zehr *et al.*, 2003, Schmid & Hartmann, 2007).

Η νιτρογενάση παρουσιάστηκε νωρίς στην εξέλιξη, σε έναν αρχικό πρόγονο, γεγονός που απορρέει από την υψηλή ομολογία μεταξύ των ακολουθιών *nifH* και 16S rRNA που υπάρχουν στις αντίστοιχες βάσεις δεδομένων. Γενικά, υπάρχουν πολλά σενάρια για την εξελικτική ιστορία του *nifH* γονιδίου αλλά έχουν επικρατήσει κυρίως δύο (Raymond *et al.*, 2004).

Το πρώτο σενάριο αφορά την παρουσία της αζωτοδέσμευσης στον τελευταίο κοινό πρόγονο όλων των μορφών ζωής (σχήμα 3.4). Προϋπόθεση του συγκεκριμένου γεγονότος είναι η απώλεια των γονιδίων, ώστε να δικαιολογείται η απουσία των γονιδίων *nif* από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και από ολόκληρα φύλλα προκαρυωτικών. Συμμετοχή στην προαναφερθείσα διαδικασία έχει και η οριζόντια μεταφορά γονιδίων, η οποία έχει πραγματοποιηθεί για να μεταφερθεί η νιτρογενάση ακόμα και σε οργανισμούς που ήδη είχαν ένα αντίγραφο νιτρογενάσης. Στη

συγκεκριμένη περίπτωση, οι εναλλακτικές νιτρογενάσες προήλθαν από τα αρχαία (*methanosarcina*) και στη συνέχεια, με οριζόντια μεταφορά, διαδόθηκαν σε άλλα γένη ευβακτηρίων (Raymond *et al.*, 2004, Kechris *et al.*, 2006).

Το δεύτερο σενάριο προέλευσης της ιδιότητας της αζωτοδέσμευσης αφορά την εμφάνισή της, για πρώτη φορά, στα μεθανογόνα βακτήρια (αρχαία) (σχήμα 3.4). Εν συνεχεία μεταφέρθηκε σε άλλες συγγενικές σειρές μέσω τριών ξεχωριστών εξελικτικών γεγονότων. Στην παρούσα αναφορά, το κυρίαρχο φαινόμενο ήταν η οριζόντια μεταφορά γονιδίων και όχι η απώλεια γονιδίων όπως στο προηγούμενο σενάριο. Η συγκεκριμένη παραδοχή δικαιολογεί την απουσία της αζωτοδέσμευσης από τους ευκαρυώτες, τα crenarchaea και τις πρώιμα διακλαδιζόμενες βακτηριακές συγγενικές σειρές. Το δεύτερο σενάριο εναρμονίζεται με την επικρατούσα άποψη ότι κάποια στιγμή της ιστορίας τα μεθανογόνα βακτήρια είχαν κυρίαρχο ρόλο στη βίωση (Raymond *et al.*, 2004).



**Σχήμα 3.4.** Προτεινόμενα σενάρια και η αντίστοιχη απεικόνιση δενδρογράμματος γονιδίου και είδους. **A.** 1<sup>ο</sup> Σενάριο του τελευταίου κοινού προγόνου. Οι τρεις επικράτειες και η απόκλισή τους από τον τελευταίο κοινό πρόγονο (LCA), παρουσιάζονται με γράμματα και διακεκομμένες γραμμές μπλε χρώματος. Οι ενιαίες, μαύρες (τυπική νιτρογενάση) και πράσινες (εναλλακτική νιτρογενάση) γραμμές υποδεικνύουν την εξέλιξη της νιτρογενάσης από πρόγονο της ομάδας IV στη βάση του δέντρου (Οι Raymond και συνεργάτες το 2004 διαχώρισαν τους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς σε πέντε ομάδες, βάσει φυλογένειας του γονιδίου 16S rRNA). Επιπλέον, η γκρι διακεκομμένη γραμμή και η κόκκινη τελεία απεικονίζουν την οριζόντια μεταφορά και τα σημεία διπλασιασμού του γονιδίου αντίστοιχα. Σύμφωνα με το σενάριο του τελευταίου κοινού προγόνου, η απώλεια γονιδίων ήταν το κυρίαρχο γεγονός στις συγγενικές σειρές, οι οποίες δεν έχουν πλέον την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν. **B.** 2<sup>ο</sup> Σενάριο αρχικής εμφάνισης στα μεθανογόνα βακτήρια. Βάσει του συγκεκριμένου σεναρίου η αζωτοδέσμευση εμφανίστηκε ως ιδιότητα πρώτα στα μεθανογόνα αρχαιοβακτήρια και έπειτα μεταφέρθηκε σε ένα πρωτόγονο βακτήριο, παρακάμπτοντας την αναγκαιότητα για εκτεταμένες απώλειες γονιδίων προκειμένου να εξηγηθεί η απουσία αζωτοδεσμευτικών συγγενικών σειρών. Στην προαναφερθείσα περίπτωση, μάλλον έχει συμβεί εκτεταμένη και σχετικά πρόσφατη οριζόντια μεταφορά γονιδίων ώστε να εξηγηθούν η κατανομή και η ομοιότητα των νιτρογενασών των ομάδων II και III (Raymond *et al.*, 2004).

### 3.2.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *nifH*


Για την επίτευξη της μοριακής ανάλυσης του γονιδίου *nifH*, πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση τμήματος ~360 bp (40,8% του συνολικού *nifH* γονιδίου), μέσω της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR), κατόπιν επιλογής των κατάλληλων εκφυλισμένων εκκινητών.

Σύμφωνα με τους Poly και συν. (2001), τα ζεύγη των εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος *nifH* είναι:

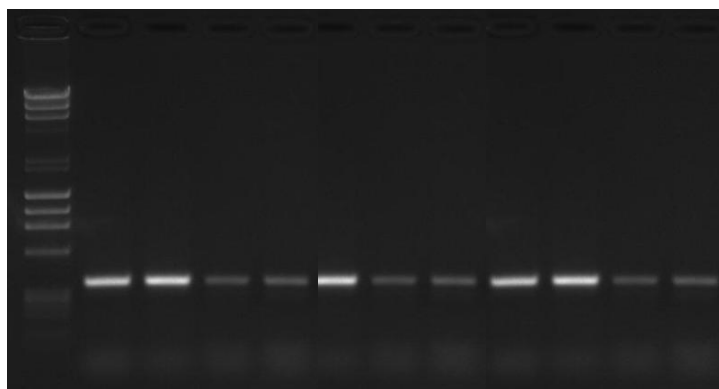
*Pol Forward: 5'- TGCGACTCCGCAAAGGCCGTGACTC- 3'*

*Pol Reverse: 3' -ATGCGCCATCATCTTCAGCCGGA- 5'*

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR ήταν οι ακόλουθες:

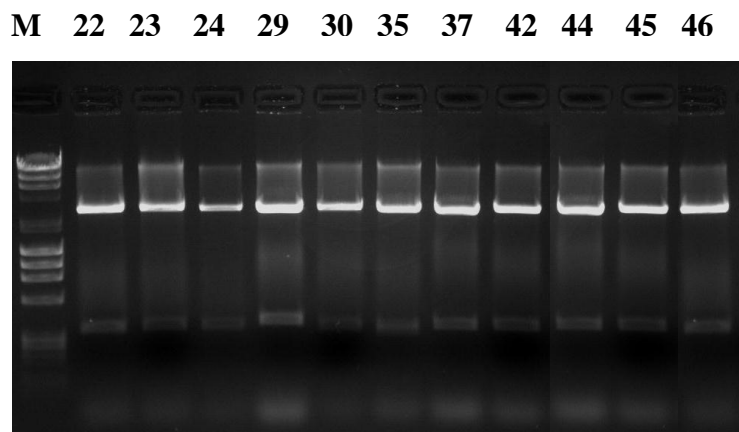
Αρχική αποδιάταξη	94 °C για 4 min		35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94 °C για 1 min		
Υβριδισμός εκκινητών	55 °C για 1 min		
Επιμήκυνση	72 °C για 1,5 min		
Τελική επιμήκυνση	72 °C για 10 min.		

M 22 23 24 29 30 35 37 42 44 45 46



**Σχήμα 3.5.** Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *nifH*, μεγέθους 360 bp, στο ολικό γονιδιωματικό DNA των υπό μελέτη δειγμάτων, μέσω της αντίδρασης PCR (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III).

Τα προϊόντα της PCR, τα οποία προέκυψαν, υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα PGEM-T easy (Promega) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing).



**Σχήμα 3.6.** Πέψεις με το ένζυμο EcoRI των πλασμιδίων, από τους PGEM-T κλώνους *nifH* των υπό μελέτη δειγμάτων (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III).

### 3.2.2 Ανάλυση 8 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *nifH*, των βακτηριακών στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum*, βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA

#### 3.2.2.1 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων, των αναγνωρισμένων ως *Azospirillum*, βακτηριακών στελεχών

Κατόπιν σύγκρισης των 8 νεοπροσδιοριζόμενων υποκλώνων *nifH*, οι οποίοι βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA, αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum*, με τα στοιχεία της βάσης δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (NCBI), μέσω του διαδικτυακού προγράμματος BLAST, ελήφθησαν τα παρακάτω αποτελέσματα (πίνακας 3.3).

Strain	Υποκλώνος	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max identity
Gr22	pGEM T <i>nifH</i> 22	GQ161222.1/ X51500.1	<i>Azospirillum</i> <i>brasiliense</i> strain AWC3 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene, partial	647/ 632	647/ 632	100%/ 99%	99%/ 98%

			cds/ <i>Azospirillum brasiliense</i> <i>NifH</i> gene				
Gr23	pGEM T <i>nifH</i> 23	GQ161222.1/ M64344.1	<i>Azospirillum brasiliense</i> strain AWC3 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene, partial cds/ <i>Azospirillum brasiliense</i> Fe protein and FeMo protein subunits and 353 bp orf, complete cds	641/ 632	641/ 632	100%/ 99%	98%/ 98%
Gr24	pGEM T <i>nifH</i> 24	DQ682472.1/ AB542353.1	<i>Azospirillum zeae</i> strain N7 <i>NifH</i> ( <i>nifH</i> ) gene, partial cds/ <i>Azospirillum</i> sp. TSA36t <i>nifH</i> gene for nitrogenase reductase, partial cds, strain: TSA36t	640/ 619	640/ 619	100%/ 99%	98%/ 98%
Gr29	pGEM T <i>nifH</i> 29	GQ161236.1/ X51500.1	<i>Azospirillum brasiliense</i> strain AWB9 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene, partial cds/ <i>Azospirillum brasiliense</i> <i>NifH</i> gene	641/ 621	641/ 621	100%/ 99%	98%/ 98%
Gr30	pGEM T <i>nifH</i> 30	GQ161226.1/ X51609.1	<i>Azospirillum brasiliense</i> strain AWC7 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene, partial cds/ <i>Azospirillum brasiliense</i> DNA for <i>nifH</i> , the gene encoding the nitrogenase iron protein	641/ 636	641/ 636	100%/ 99%	98%/ 98%
Gr35	pGEM T <i>nifH</i> 35	AB542353.1 / DQ787334.1	<i>Azospirillum</i> sp. TSA36t <i>nifH</i> gene for nitrogenase reductase, partial cds, strain: TSA36t/	616/ 608	616/ 608	99%/ 99%	97%/ 97%

			<i>Azospirillum lipoferum</i> strain Sp59b dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene, partial cds				
Gr37	pGEM T nifH 37	GQ161222.1/ M64344.1	<i>Azospirillum brasilense</i> strain AWC3 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene, partial cds/ <i>Azospirillum brasilense</i> Fe protein and FeMo protein subunits and 353 bp orf, complete cds	630/ 621	630/ 621	100%/ 99%	98%/ 98%
Gr42	pGEM T nifH 42	GQ161235.1/ X51500.1	<i>Azospirillum brasilense</i> strain AWB8 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene, partial cds/ <i>Azospirillum brasilense</i> NifH gene	636/ 621	636/ 621	100%/ 99%	98%/ 98%

**Πίνακας 3.3.** Αποτελέσματα σύγκρισης των 8 υποκλώνων *nifH*, αναγνωρισμένων ως *Azospirillum* (βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA), με τη βάση δεδομένων του NCBI, μέσω του προγράμματος BLAST.

Τα στατιστικά στοιχεία, τα οποία προέκυψαν από τη μοριακή ανάλυση των 8 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *nifH*, των αναγνωρισμένων ως *Azospirillum* στελεχών (βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA), ως προς τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων και των αθροισμάτων A+T(U) και G+C, στην κάθε αλληλουχία, παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 3.4).

Strain	% A	% G	% T (U)	% C	% A+T (U)	% C+G	Σύνολο
Gr22	19,50	32,87	16,16	31,48	35,65	64,35	359
Gr23	18,94	33,70	16,16	31,20	35,10	64,90	359
Gr24	19,50	32,03	16,71	31,75	36,21	63,79	359
Gr29	19,22	33,43	16,16	31,20	35,38	64,62	359
Gr30	18,94	32,87	16,16	32,03	35,10	64,90	359
Gr35	19,50	32,59	16,71	31,20	36,21	63,79	359

Gr37	19,22	33,43	16,71	30,64	35,93	64,07	359
Gr42	18,94	33,70	16,43	30,92	35,38	64,62	359
Μέσος όρος	19,22	33,07	16,4	31,3	35,62	64,38	-

**Πίνακας 3.4.** Συχνότητα νουκλεοτιδίων, αθροισμάτων A+T(U) και G+C καθώς και ο μέσος όρος αυτών, στην κάθε αλληλουχία των 8 υποκλώνων *nifH*, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum* (βάσει μοριακής ανάλυσης 16S rRNA). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Lasergene 7.0.

### 3.2.3 Ανάλυση 3 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *nifH*, των βακτηριακών στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas*, βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA

#### 3.2.3.1 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων, των αναγνωρισμένων ως *Pseudomonas*, βακτηριακών στελεχών

Στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 3.5), παρουσιάζονται τα συγκριτικά αποτελέσματα των 3 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *nifH*, των οποίων η μοριακή ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA, έδειξε ότι πρόκειται για στελέχη του γένους *Pseudomonas*, με τα στοιχεία της βάσης δεδομένων του NCBI (National Center of Biotechnology Information), μέσω του διαδικτυακού προγράμματος BLAST.

Strain	Υποκλόνο	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max identity
Gr44	pGEM T nifH 44	AB571541.1/ CP000304.1/ X96609.1	<i>Pseudomonas</i> sp. T16(2010) <i>nifH</i> gene for nitrogenase Fe protein, partial cds/	647/	647/	100%/	98%/
			<i>Pseudomonas</i> <i>stutzeri</i> A1501, complete genome/	641/	641/	100%/	98%/
			<i>A. faecalis nifH</i> gene	630	630	100%	98%
Gr45	pGEM T nifH 45	AB571541.1/ CP000304.1/ X96609.1	<i>Pseudomonas</i> sp. T16(2010) <i>nifH</i> gene for nitrogenase Fe protein, partial cds/	636/ 630/ 619	636/ 630/ 619	100%/ 100%/ 100%	98%/ 98%/ 97%
			<i>Pseudomonas</i> <i>stutzeri</i> A1501, complete				

			genome/ <i>A. faecalis nifH</i> gene				
Gr46	pGEM T nifH 46	AB571541.1/ AJ297529.2 / X96609.1	<i>Pseudomonas</i> sp. T16(2010) <i>nifH</i> gene for nitrogenase Fe protein, partial cds/ <i>Pseudomonas</i> <i>stutzeri</i> nif operon and flanking genes, strain A15101/ <i>A. faecalis nifH</i> gene	647/ 647/ 630	647/ 647/ 630	100%/ 99%/ 100%	98%/ 99%/ 98%

**Πίνακας 3.5.** Αποτελέσματα σύγκρισης των 3 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *nifH*, των αναγνωρισμένων ως *Pseudomonas* στελεχών (βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA), με τη βάση δεδομένων του NCBI, μέσω του προγράμματος BLAST.

Τα προκύπτοντα στατιστικά στοιχεία της συχνότητας των νουκλεοτιδίων και των αθροισμάτων A+T(U) και G+C, στην κάθε αλληλουχία των 3 υποκλώνων *nifH*, οι οποίοι βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas*, εμφανίζονται στον πίνακα 3.6.

Strain	% A	% G	% T (U)	% C	% A+T (U)	% C+G	Σύνολο
Gr44	19,89	33,15	16,57	30,39	36,46	63,54	362
Gr45	19,89	33,15	16,57	30,39	36,46	63,54	362
Gr46	19,89	33,15	16,57	30,39	36,46	63,54	362
Μέσος όρος	19,89	33,15	16,57	30,39	36,46	63,54	-

**Πίνακας 3.6.** Συχνότητα νουκλεοτιδίων, αθροισμάτων A+T(U) και G+C καθώς και ο μέσος όρος αυτών, στην κάθε αλληλουχία των 3 υποκλώνων *nifH*, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas* (βάσει μοριακής ανάλυσης 16S rRNA). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Lasergene 7.0.

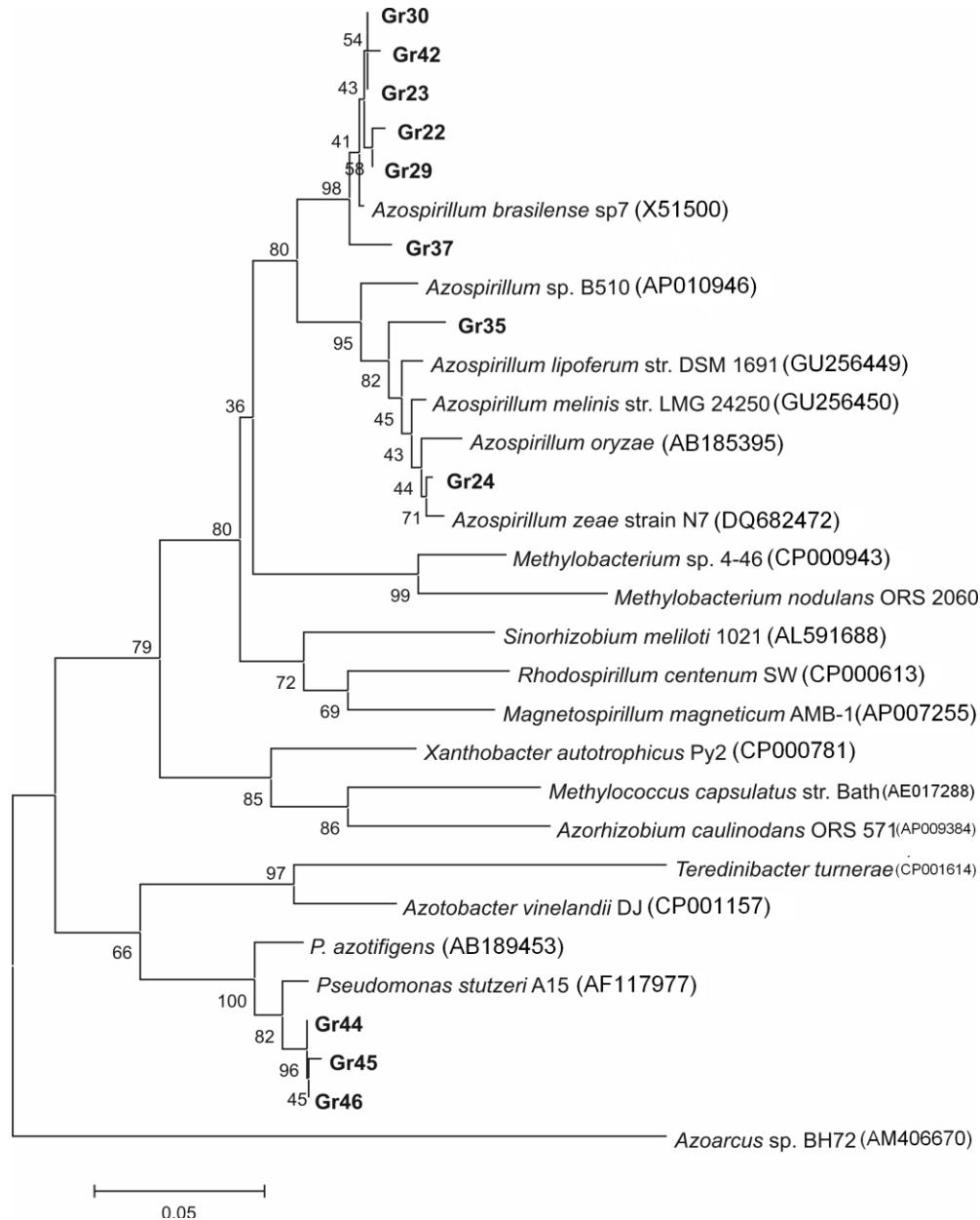
### 3.2.4 Φυλογενετικό δέντρο των ακολουθιών *nifH*

Ολοκληρώνοντας τη μοριακή ανάλυση των προαναφερθέντων υποκλώνων *nifH*, πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση και εκτίμηση των εξελικτικών αποστάσεων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών τους και ακολουθιών διαθέσιμων στο διαδίκτυο (accession numbers), μέσω του αλγόριθμου Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) και



της μεθόδου Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των ευθυγραμμίσεων και των εξελικτικών αποστάσεων, τα οποία προέκυψαν, παρατίθενται στα παραρτήματα Δ' και Ε' αντίστοιχα.

Έπειτα, κατασκευάστηκε το δένδρογραμμα των ακολουθιών *nifH* (σχήμα 3.7), μέσω του προγράμματος MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).



**Σχήμα 3.7.** Εξελεγκτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει τμήματος του γονιδίου *nifH*. Η απεικόνιση της εξελεγκτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονιστεί η εξελεγκτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa (31 taxa). Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μια ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν στο σύνολο των δεδομένων (επιλογή πλήρους επάλειψης). Σύνολο 270 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2004)

Accession Numbers

*Azospirillum brasilense* sp7, *NifH* gene

GenBank: X51500

*Azospirillum* sp. B510 DNA, complete genome

GenBank: AP010946

*Azospirillum lipoferum* strain DSM 1691, *NifH* (*nifH*) gene, partial cds.

GenBank: GU256449

*Azospirillum melinis* strain LMG 24250, *NifH* (*nifH*) gene, partial cds.

GenBank: GU256450

*Azospirillum oryzae* COC8, *nifH* gene for nitrogenase reductase, partial cds.

GenBank: AB185395

*Azospirillum zeae* strain N7, *NifH* (*nifH*) gene, partial cds.

GenBank: DQ682472

*Methylobacterium* sp. 4-46, complete genome

GenBank: CP000943

*Methylobacterium nodulans* ORS 2060, complete genome

GenBank: CP001349

*Sinorhizobium meliloti* 1021, complete chromosome

GenBank: AL591688

*Rhodospirillum centenum* SW; ATCC 51521, complete genome

GenBank: CP000613

*Magnetospirillum magneticum* AMB-1 DNA, complete genome

GenBank: AP007255

*Xanthobacter autotrophicus* Py2, complete genome

GenBank: CP000781

*Methylococcus capsulatus* str. Bath, complete genome

GenBank: AE017282

*Azorhizobium caulinodans* ORS 571 DNA, complete genome

GenBank: AP009384

*Teredinibacter turnerae* T7901, complete genome

GenBank: CP001614

*Azotobacter vinelandii* DJ; ATCC BAA-1303, complete genome

GenBank: CP001157

*Pseudomonas azotifigens* 6H33b, genes for hypothetical conserved protein, dinitrogenase reductase, dinitrogenase MoFe protein alpha subunit, partial and complete cds.

GenBank: AB189453

*Pseudomonas stutzeri* A15 LMG 10652, NifH (*nifH*) gene, partial cds

GenBank: AF117977

*Azoarcus* sp. BH72, complete genome

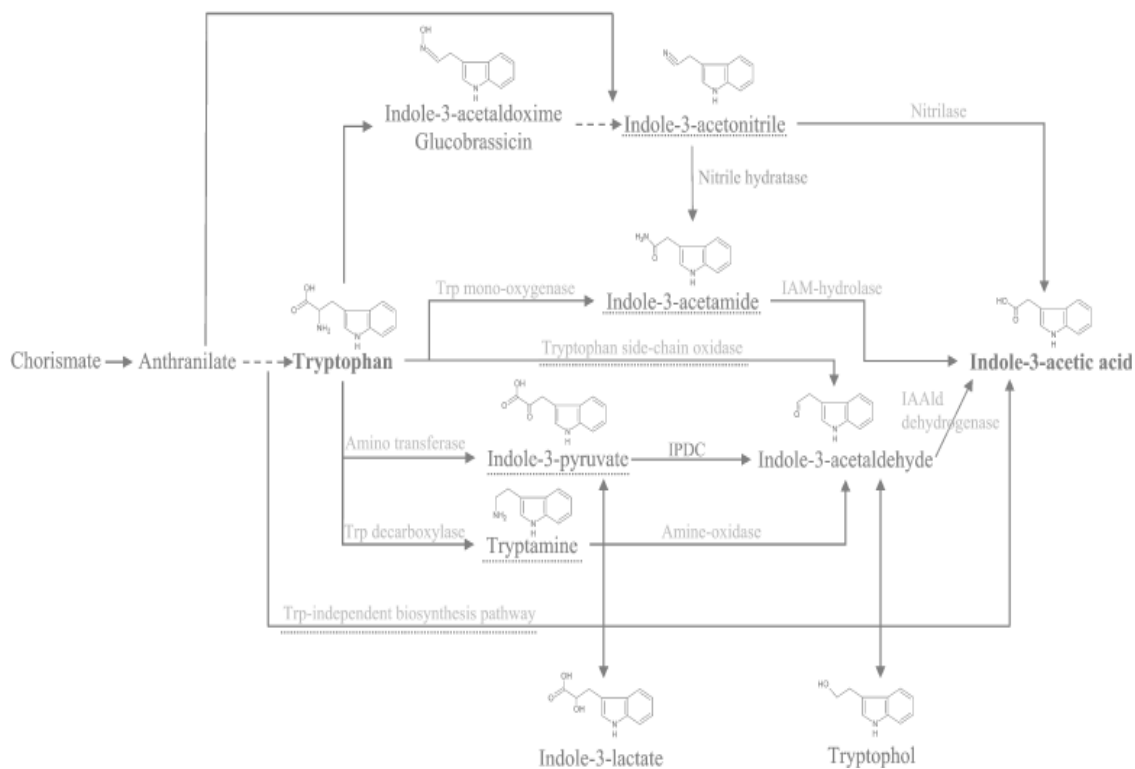
GenBank: AM406670

### 3.3 Μοριακή ανάλυση του γονιδίου *ipdC*

Οι αυξίνες έχουν ρυθμιστικό ρόλο σε βασικές λειτουργίες των φυτών όπως είναι η επιμήκυνση των κυττάρων στα στελέχη του φυτού, η κυτταρική διαίρεση, ο τροπισμός, η διαφοροποίηση, η γήρανση, η απόπτωση των φύλλων και των καρπών και άλλα. Αναμφισβήτητα οι αυξίνες παράγονται και από τα PGPR ριζοβακτήρια και μάλιστα η ευεργετική τους επίδραση φαίνεται να είναι πιο σημαντική από αυτήν της αζωτοδέσμευσης (όσον αφορά τα PGPR ριζοβακτήρια που διαθέτουν την ικανότητα της αζωτοδέσμευσης) (Malhotra & Srivastava, 2008).

Παρά το γεγονός ότι έχουν ανιχνευθεί πολλές φυτοορμόνες (γιβεριλίνες και κυτοκίνες), ο κυριότερος εκπρόσωπος των αυξινών (ποσοτικά), στα περισσότερα φυτά, είναι το ινδολοξικό οξύ (IAA) (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Αξιοσημείωτη είναι η ομοιότητα μεταξύ των βιοσυνθετικών μονοπατιών ινδολοξικού οξέος σε φυτά και βακτήρια. Στα βακτήρια η κύρια πρόδρομος ένωση για την παραγωγή IAA είναι η τρυπτοφάνη. Στο σχήμα που ακολουθεί (σχήμα 3.8) απεικονίζονται όλα τα γνωστά, έως σήμερα, μονοπάτια βιοσύνθεσης IAA, μέσω τρυπτοφάνης καθώς και ένα μονοπάτι ανεξάρτητο αυτής. Το πιο σημαντικό όλων, είναι το μονοπάτι του ινδολοπυρουβικού οξέος (IPyA), το οποίο έχει εντοπιστεί και σε ορισμένα παθογόνα βακτήρια, αλλά του οποίου τα γονίδια/ένζυμα κλειδιά δεν είναι ακόμα γνωστά. Στο προαναφερθέν μονοπάτι, το ινδολοπυρουβικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται δίνοντας ινδολο-ακεταλδεϋδη, η οποία αποτελεί την πρόδρομο ένωση του IAA. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την αποκαρβοξυλίωση του ινδολοπυρουβικού οξέος είναι το *ipdC*. Το εν λόγω γονίδιο έχει απομονωθεί από αρκετά βακτήρια, όπως το *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas putida* και άλλα. Σχετικές έρευνες έδειξαν ότι κατά την απενεργοποίηση του γονιδίου *ipdC*, σε στελέχη *Azospirillum brasilense*, η παραγωγή IAA μειώθηκε έως και 90%, γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία του γονιδίου *ipdC* στην παραγωγή IAA. Ευρέως διαπιστωμένη είναι η συνεισφορά του IAA στην προώθηση της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος των φυτών, και πιθανώς να είναι σημαντικότερη από αυτήν της αζωτοδέσμευσης (Sraepen *et al.*, 2007). Επομένως η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των γονιδίων που εμπλέκονται στα μονοπάτια της βιοσύνθεσης του IAA κρίνονται απαραίτητα.



**Σχήμα 3.8.** Μονοπάτια βιοσύνθεσης IAA στα βακτήρια. Το όνομα του μονοπατιού προκύπτει από τις ενδιάμεσες ενώσεις που είναι υπογραμμισμένες. IAAld: ινδολο-ακεταλδεΐδη, IAM: ινδολο-ακεταμίδι, IpdC: αποκαρβοξυλάση του ινδολοπυρουβικού, Trp: τρυπτοφάνη (Sraeren *et al.*, 2007).

### 3.3.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ipdC*


Για την πραγματοποίηση της μοριακής ανάλυσης του γονιδίου *ipdC*, ενισχύθηκε τμήμα ~1278 bp, το οποίο αποτελεί το 78,02% του συνολικού *ipdC* γονιδίου, μέσω της αντίδρασης PCR, κατόπιν επιλογής των κατάλληλων εκκινητών.

Σύμφωνα με τους Zimmer και συν. (1998), τα ζεύγη των εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος *ipdC* είναι:

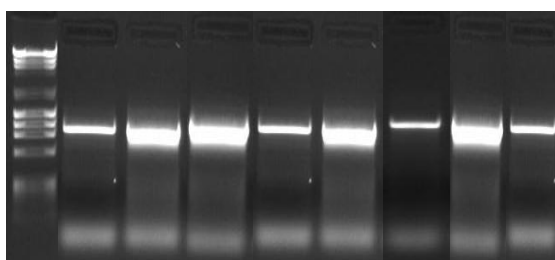
**2a Forward: 5' - GGCTTCGCGGGGGACGCGGCGGCGCGTTAC - 3'**

**2b Reverse: 3' - CTTAGCCGGAAGTTGCTGGACCTGCTGACC - 5'**

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR ήταν οι ακόλουθες:

Αρχική αποδιάταξη	94 °C για 4 min	 35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94 °C για 1 min	
Υβριδισμός εκκινητών	66 °C για 1 min	
Επιμήκυνση	72 °C για 1,5 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C για 10 min.	

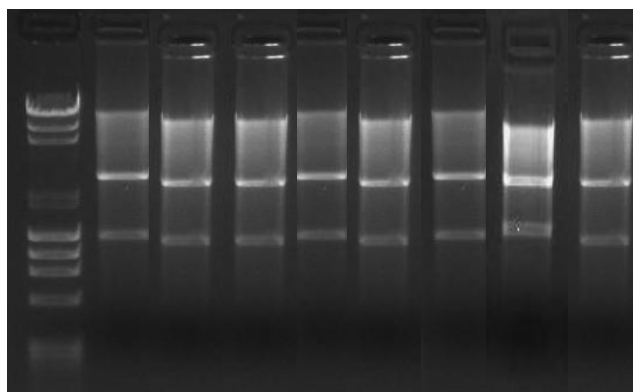
M 22 23 24 30 36 37 40 42



**Σχήμα 3.9.** Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ipdC*, μεγέθους 1278 bp, στο ολικό γονιδιωματικό DNA των υπό μελέτη δειγμάτων, μέσω της αντίδρασης PCR (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III).

Τα προϊόντα της PCR, τα οποία προέκυψαν, υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα PGEM-T easy (Promega) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing).

M 22 23 24 30 36 37 40 42



**Σχήμα 3.10.** Πέψεις με το ένζυμο *EcoRI* των πλασμιδίων, από τους PGEM-T κλώνους *ipdC* των υπό μελέτη δειγμάτων (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III).

## 3.3.2 Αποτελέσματα BLAST και συχρότητα νουκλεοτιδίων

Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των υποκλώνων *ipdC*, των οποίων η μοριακή ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA, υποδηλώνει ότι αναφερόμαστε σε στελέχη του γένους *Azospirillum*, με τα στοιχεία της βάσης δεδομένων του National Center of Biotechnology Information, μέσω του διαδικτυακού προγράμματος BLAST, προβάλλονται στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 3.7).

Strain	Υποκλώνος	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max identity
Gr22	pGEM T ipdC 22	L26240.1/ AB052841.1	<i>Azospirillum brasilense</i> indole-3-pyruvate decarboxylase gene, complete cds/	2178/	2178/	100%/	97%/
			<i>Azospirillum lipoferum ipdc</i> gene for indole-3-pyruvic acid decarboxylase, complete cds	2122	2122	100%	96%
Gr23	pGEM T ipdC 23	L26240.1/ AB052841.1	<i>Azospirillum brasilense</i> indole-3-pyruvate decarboxylase gene, complete cds/	2172/	2117/	100%/	97%/
			<i>Azospirillum lipoferum ipdc</i> gene for indole-3-pyruvic acid decarboxylase, complete cds	2117	2117	100%	96%
Gr24	pGEM T ipdC 24	L26240.1 / AB052841.1	<i>Azospirillum brasilense</i> indole-3-pyruvate decarboxylase gene, complete cds/	2161/	2161/	100%/	97%/
			<i>Azospirillum lipoferum ipdc</i> gene for indole-3-pyruvic acid decarboxylase, complete cds	2100	2100	100%	96%
Gr30	pGEM T ipdC 30	L26240.1/ AB052841.1	<i>Azospirillum brasilense</i> indole-3-pyruvate decarboxylase gene, complete cds/	2132/	2132/	100%/	96%/
			<i>Azospirillum lipoferum ipdc</i> gene for indole-3-	2093	2093	100%	96%

			pyruvic acid decarboxylase, complete cds				
Gr37	pGEM T ipdC 37	L26240.1/AB052841.1	<i>Azospirillum brasilense</i> indole-3-pyruvate decarboxylase gene, complete cds/ <i>Azospirillum lipoferum</i> ipdc gene for indole-3-pyruvic acid decarboxylase, complete cds	2145/ 2084	2145/ 2084	100%/ 100%	96%/ 96%
Gr42	pGEM T ipdC 42	L26240.1/DQ490109.1	<i>Azospirillum brasilense</i> indole-3-pyruvate decarboxylase gene, complete cds/ <i>Azospirillum brasilense</i> strain SM indole pyruvate decarboxylase (ipdC) gene, complete	2122/ 2100	2122/ 2100	100%/ 100%	96%/ 96%

**Πίνακας 3.7.** Αποτελέσματα σύγκρισης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *ipdC*, των αναγνωρισμένων ως *Azospirillum* στελεχών (βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA), με τη βάση δεδομένων του NCBI, μέσω του προγράμματος BLAST.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *ipdC*, των αναγνωρισμένων ως *Azospirillum* (βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA), ως προς τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων και των αθροισμάτων A+T(U) και G+C, που εμφανίζονται στην κάθε αλληλουχία (πίνακας 3.8).

Strain	% A	% G	% T (U)	% C	% A+T (U)	% C+G	Σύνολο
Gr22	14,24	36,31	14,08	35,37	28,33	71,67	1278
Gr23	14,16	36,46	14,01	35,37	28,17	71,83	1278
Gr24	14,48	36,07	14,24	35,21	28,72	71,28	1278
Gr30	14,1	36,26	14,1	35,55	28,19	71,81	1277
Gr37	14,55	36,54	14,4	34,51	28,95	71,05	1278
Gr42	14,32	36,07	13,77	35,84	28,09	71,91	1278
Μέσος όρος	14,31	36,29	14,1	35,31	28,41	71,6	-

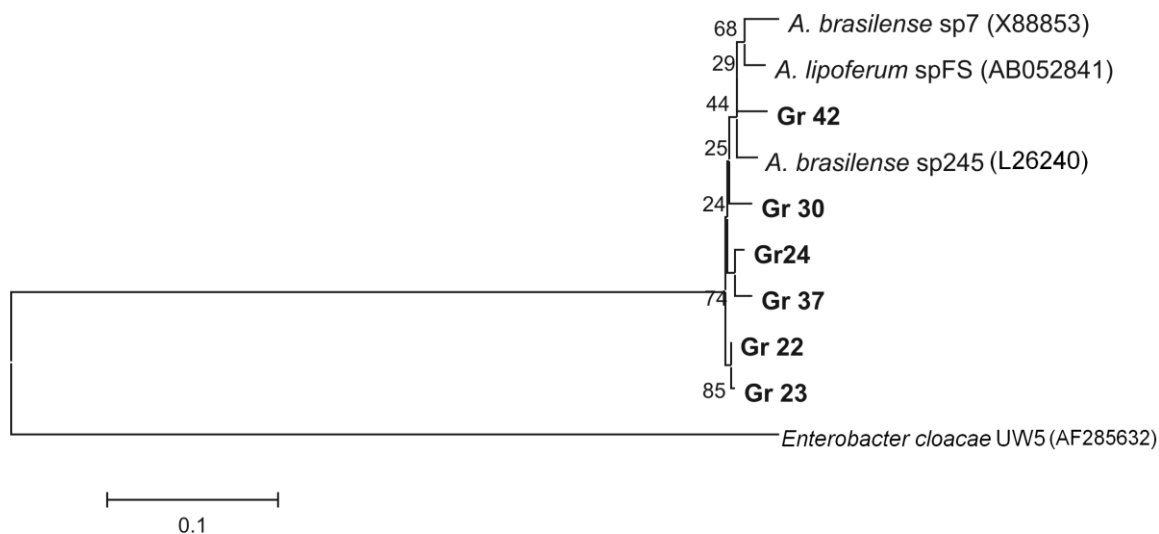
**Πίνακας 3.8.** Συχνότητα νουκλεοτιδίων, αθροισμάτων A+T(U) και G+C καθώς και ο μέσος όρος αυτών, στην κάθε αλληλουχία των υποκλώνων *ipdC*, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum* (βάσει μοριακής ανάλυσης 16S rRNA). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Lasergene 7.0.



Ολοκληρώνοντας τη μοριακή ανάλυση των υποκλώνων *ipdC*, έλαβε χώρα η ευθυγράμμιση και η εκτίμηση των εξελικτικών αποστάσεων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών αυτών, με ακολουθίες διαθέσιμες στο διαδίκτυο (accession numbers), μέσω του αλγόριθμου Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) και της μεθόδου Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) αντίστοιχα, με το πρόγραμμα DNASTar. Τα αποτελέσματα αυτών, παρουσιάζονται στα παρατήματα Δ' και Ε'.

### 3.3.3 Φυλογενετικό δέντρο των ακολουθιών *ipdC*

Εν συνεχεία κατασκευάστηκε το δενδρόγραμμα των ακολουθιών *ipdC* (σχήμα 3.11), με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), μέσω του προγράμματος MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tamura *et al.*, 2007).



**Σχήμα 3.11.** Εξελεγκτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει τμήματος του γονιδίου *ipdC*. Η απεικόνιση της εξελεγκτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονιστεί η εξελεγκτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa (10 taxa). Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μια ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν στο σύνολο των δεδομένων (επιλογή πλήρους επάλειψης). Σύνολο 1245 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2004)

Accession Numbers

*Azospirillum brasilense* sp7, *ipdc* gene (partial)  
GenBank: X88853

*Azospirillum lipoferum* spFS, *ipdc* gene for indole-3-pyruvic acid  
GenBank: AB052841

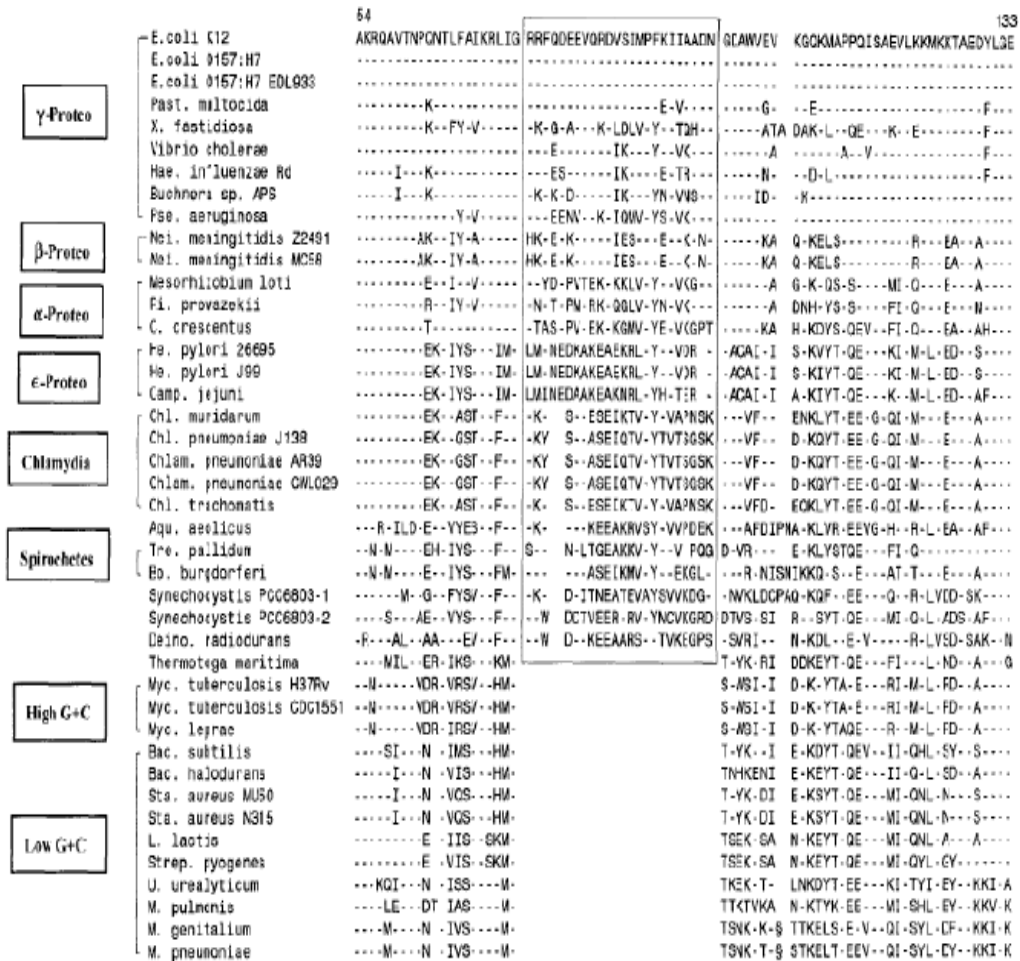
*Azospirillum brasilense* sp245, indole-3-pyruvate decarboxylase gene, complete cds.  
GenBank: L26240

*Enterobacter cloacae* UW5, indolepyruvate decarboxylase (*ipdC*) gene, partial cds.  
GenBank: AF285632

### 3.4 Μοριακή ανάλυση γονιδίου *dnaK*

Η οικογένεια των πρωτεϊνών Hsp70/DnaK εντοπίζεται σε όλα τα γονιδιώματα των βακτηρίων των οποίων η αλληλούχηση έχει ολοκληρωθεί. Οι εν λόγω πρωτεΐνες έχουν βασικό ρόλο σε λειτουργίες δίπλωσης πρωτεϊνών και άλλες κυτταρικές λειτουργίες, ως μόρια τσαπερόνης (chaperone). Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη πρωτεΐνη DnaK είναι ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ των οργανισμών στους οποίους εντοπίζεται. Εμφανής διαφορά παρατηρείται στην αλληλουχία του γονιδίου *dnaK* μεταξύ Gram<sup>-</sup> και Gram<sup>+</sup> βακτηρίων.

Μια ομόλογη περιοχή 21-23 αμινοξέων είναι παρούσα σε όλα τα Gram αρνητικά βακτήρια αλλά δεν υπάρχει σε κανένα Gram θετικό. (σχήμα 3.12). Βάσει ισχυρών ενδείξεων, η προαναφερθείσα περιοχή είναι πιθανό να προστέθηκε από Gram αρνητικά βακτήρια παρά να παραλήφθηκε από Gram θετικά (Grupta, 2001). Επιπλέον, εντός της ίδιας περιοχής διακρίνεται μια ακολουθία δύο αμινοξέων η οποία εντοπίζεται μόνο στα Πρωτεοβακτήρια. Τέλος, έχει εντοπιστεί και μια τρίτη ακολουθία αποτελούμενη από τέσσερα αμινοξέα, η οποία υπάρχει μόνο σε β- και γ-Πρωτεοβακτήρια και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαφοροποιητικό εργαλείο στη μοριακή ταξινόμηση Πρωτεοβακτηρίων. Και οι δύο περιοχές υποδηλώνουν εξελικτικά φαινόμενα πρόσθεσης των συγκεκριμένων ακολουθιών σε κοινό πρόγονο των Πρωτεοβακτηρίων (Grupta, 2000).



Σχήμα 3.12. Ευθυγράμμιση ομόλογων Hsp70 από ολοκληρωμένα βακτηριακά γονιδιώματα. Εντός του παραλληλογράμμου διακρίνεται η περιοχή η οποία είναι χαρακτηριστική των Gram αρνητικών βακτηρίων (Gurpta, 2001).

### 3.4.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *dnaK*


Για τη μοριακή ανάλυση του γονιδίου *dnaK*, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος ~327 bp, μέσω της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR), κατόπιν επιλογής των κατάλληλων εκκινητών.

Σύμφωνα με τους Stepkowski και συν. (2003), τα ζεύγη των εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος *dnaK* είναι:

*TSdnaK3 Forward: 5' –AAGGAGCAGCAGATCCGCATCCA- 3'*

*TSdnaK2 Reverse: 5' –GTACATGGCCTCGCCGAGCTTCA- 3'*

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR ήταν οι ακόλουθες:

Αρχική αποδιάταξη	94 °C για 4 min		35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94 °C για 1 min		
Υβριδισμός εκκινητών	54 °C για 1 min		
Επιμήκυνση	72 °C για 1 min		
Τελική επιμήκυνση	72 °C για 10 min.		

Τα προϊόντα της PCR τα οποία προέκυψαν, υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα PGEM-T easy (Promega) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αυτόματη αλληλούχηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing).

### 3.4.2 Ανάλυση 8 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *dnaK*, των βακτηριακών στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum*, βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA

#### 3.4.2.1 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων, των αναγνωρισμένων ως *Azospirillum*, βακτηριακών στελεχών

Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των 8 υποκλώνων *dnaK*, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum*, βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA, με τα στοιχεία της βάσης δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (NCBI), μέσω του διαδικτυακού προγράμματος BLAST, παρατίθενται παρακάτω (πίνακας 3.9).

Strain	Υποκλώνος	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max identity
Gr22	pGEM T dnaK 22	FN813550.1/ AP010946.1	<i>Azospirillum brasilense</i> partial <i>dnaK</i> gene for putative molecular chaperon DnaK, strain LMG13127 (BCCM/LMG)/ <i>Azospirillum</i> sp. B510 DNA, complete genome	527/ 405	527/ 405	100%/ 100%	95%/ 89%
Gr23	pGEM T dnaK 23	FN813550.1/ FN813551.1	<i>Azospirillum brasilense</i> partial <i>dnaK</i> gene for putative molecular chaperon DnaK, strain LMG13127 (BCCM/LMG)/ <i>Azospirillum lipoferum</i> partial <i>dnaK</i> gene for putative molecular chaperon DnaK, strain LMG13128(BCC M/LMG)	532/ 327	532/ 327	100%/ 100%	96%/ 91%
Gr24	pGEM T dnaK 24	AP010946.1/ FN813551.1	<i>Azospirillum</i> sp. B510 DNA, complete genome/ <i>Azospirillum lipoferum</i> partial <i>dnaK</i> gene for	521/ 499	521/ 499	100%/ 100%	95%/ 94%

			putative molecular chaperon DnaK, strain LMG13128(BCCM/LMG)				
Gr29	pGEM T dnaK 29	FN813550.1/AP010946.1	<i>Azospirillum brasilense</i> partial <i>dnaK</i> gene for putative molecular chaperon DnaK, strain LMG13127 (BCCM/LMG)/ <i>Azospirillum</i> sp. B510 DNA, complete genome	560/ 460	560/ 460	100%/ 100%	97%/ 92%
Gr30	pGEM T dnaK 30	FN813550.1/AP010946.1	<i>Azospirillum brasilense</i> partial <i>dnaK</i> gene for putative molecular chaperon DnaK, strain LMG13127 (BCCM/LMG)/ <i>Azospirillum</i> sp. B510 DNA, complete genome	560/ 460	560/ 460	100%/ 100%	97%/ 92%
Gr35	pGEM T dnaK 35	AP010946.1/FN813551.1	<i>Azospirillum</i> sp. B510 DNA, complete genome/ <i>Azospirillum lipoferum</i> partial <i>dnaK</i> gene for putative molecular chaperon DnaK, strain LMG13128(BCCM/LMG)	540/ 518	540/ 518	99%/ 99%	96%/ 95%
Gr37	pGEM T dnaK 37	FN813550.1/AP010946.1	<i>Azospirillum brasilense</i> partial <i>dnaK</i> gene for putative molecular chaperon DnaK, strain LMG13127 (BCCM/LMG)/ <i>Azospirillum</i> sp. B510 DNA, complete genome	527/ 416	527/4 16	100%/ 100%	95%/ 89%
Gr42	pGEM T dnaK 42	FN813550.1/AP010946.1	<i>Azospirillum brasilense</i> partial <i>dnaK</i> gene for putative molecular	538/ 427	538/ 427	100%/ 99%	96%/ 90%

			chaperon DnaK, strain LMG13127 (BCCM/LMG)/ <i>Azospirillum</i> sp. B510 DNA, complete genome				
--	--	--	--	--	--	--	--

**Πίνακας 3.9.** Αποτελέσματα σύγκρισης των 8 υποκλώνων *dnaK*, αναγνωρισμένων ως *Azospirillum* (βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA), με τη βάση δεδομένων του NCBI, μέσω του προγράμματος BLAST.

Τα προκύπτοντα στατιστικά στοιχεία της συχνότητας των νουκλεοτιδίων και των αθροισμάτων A+T(U) και G+C, στην κάθε αλληλουχία των 8 υποκλώνων *dnaK*, οι οποίοι βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum*, παρουσιάζονται στον πίνακα 3.10.

Strain	% A	% G	% T (U)	% C	% A+T (U)	% C+G	Σύνολο
Gr22	22,63	36,70	9,79	30,89	32,42	67,58	327
Gr23	22,63	36,39	9,79	31,19	32,42	67,58	327
Gr24	24,16	33,03	9,79	33,03	33,94	66,06	327
Gr29	22,63	35,47	8,87	33,03	31,50	68,50	327
Gr30	22,94	35,78	8,56	32,72	31,50	68,50	327
Gr35	22,63	33,03	11,31	33,03	33,94	66,06	327
Gr37	23,24	35,78	8,56	32,42	31,80	68,20	327
Gr42	22,94	35,78	9,17	32,11	32,11	67,89	327
Μέσος όρος	22,98	35,25	9,48	32,3	32,24	67,76	-

**Πίνακας 3.10.** Συχνότητα νουκλεοτιδίων, αθροισμάτων A+T(U) και G+C καθώς και ο μέσος όρος αυτών, στην κάθε αλληλουχία των 8 υποκλώνων *dnaK*, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum* βάσει μοριακής ανάλυσης 16S rRNA. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Lasergene 7.0.



### 3.4.3 Ανάλυση 3 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *dnaK*, των βακτηριακών στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas*, βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA

#### 3.4.3.1 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων, των αναγνωρισμένων ως *Pseudomonas*, βακτηριακών στελεχών,

Στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 3.11), παρουσιάζονται τα συγκριτικά αποτελέσματα των 3 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *dnaK*, των οποίων η μοριακή ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA, έδειξε ότι πρόκειται για στελέχη του γένους *Pseudomonas*, με τα στοιχεία της βάσης δεδομένων του NCBI (National Center of Biotechnology Information), μέσω του διαδικτυακού προγράμματος BLAST.

Strain	Υποκλώνος	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max identity
Gr44	pGEM T dnaK 44	AY344804.1/ FR669263.1/	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A15 heat shock protein ( <i>dnaK</i> ) gene, partial cds; heat shock protein ( <i>dnaJ</i> ) and dihydrodipicolinate reductase ( <i>dapB</i> ) genes, complete cds; and carbamoyl-phosphate synthase small chain ( <i>carA</i> ) gene, partial cds/ <i>Pseudomonas stutzeri</i> partial <i>dnaK</i> gene for putative molecular chaperone DnaK, strain CMT.9.A	483/ 477	483/ 477	100%/ 100%	98%/ 98%
Gr45	pGEM T dnaK 45	AY344804.1/ FR669263.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A15 heat shock protein ( <i>dnaK</i> ) gene, partial cds; heat shock protein ( <i>dnaJ</i> ) and dihydrodipicolinate reductase ( <i>dapB</i> ) genes,	483/ 477	483/ 477	100%/ 100%	98%/ 98%

			complete cds; and carbamoyl-phosphate synthase small chain (carA) gene, partial cds/ Pseudomonas stutzeri partial dnaK gene for putative molecular chaperone DnaK, strain CMT.9.A/				
Gr46	pGEM T dnaK 46	AY344804.1/ FR669263.1	Pseudomonas stutzeri A15 heat shock protein (dnaK) gene, partial cds; heat shock protein (dnaJ) and dihydrodipicolinate reductase (dapB) genes, complete cds; and carbamoyl-phosphate synthase small chain (carA) gene, partial cds/ Pseudomonas stutzeri partial dnaK gene for putative molecular chaperone DnaK, strain CMT.9.A	483/ 477	483/ 477	100%/ 100%/ 100%	98%/ 98%/ 98%

**Πίνακας 3.11.** Αποτελέσματα σύγκρισης των 3 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *dnaK*, των αναγνωρισμένων ως *Pseudomonas* στελεχών (βάσει μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA), με τη βάση δεδομένων του NCBI, μέσω του προγράμματος BLAST.

Από τη μοριακή ανάλυση των 3 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *dnaK*, που αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas* (βάσει μοριακής ανάλυσης γονιδίου 16S rRNA), προέκυψαν τα παρακάτω στατιστικά στοιχεία, ως προς τη συχνότητα εμφάνισης των νουκλεοτιδίων και των αθροισμάτων G+C και A+T(U) στην κάθε αλληλουχία, μέσω του λογισμικού DNASTar (Lasergene)(πίνακας 3.12).

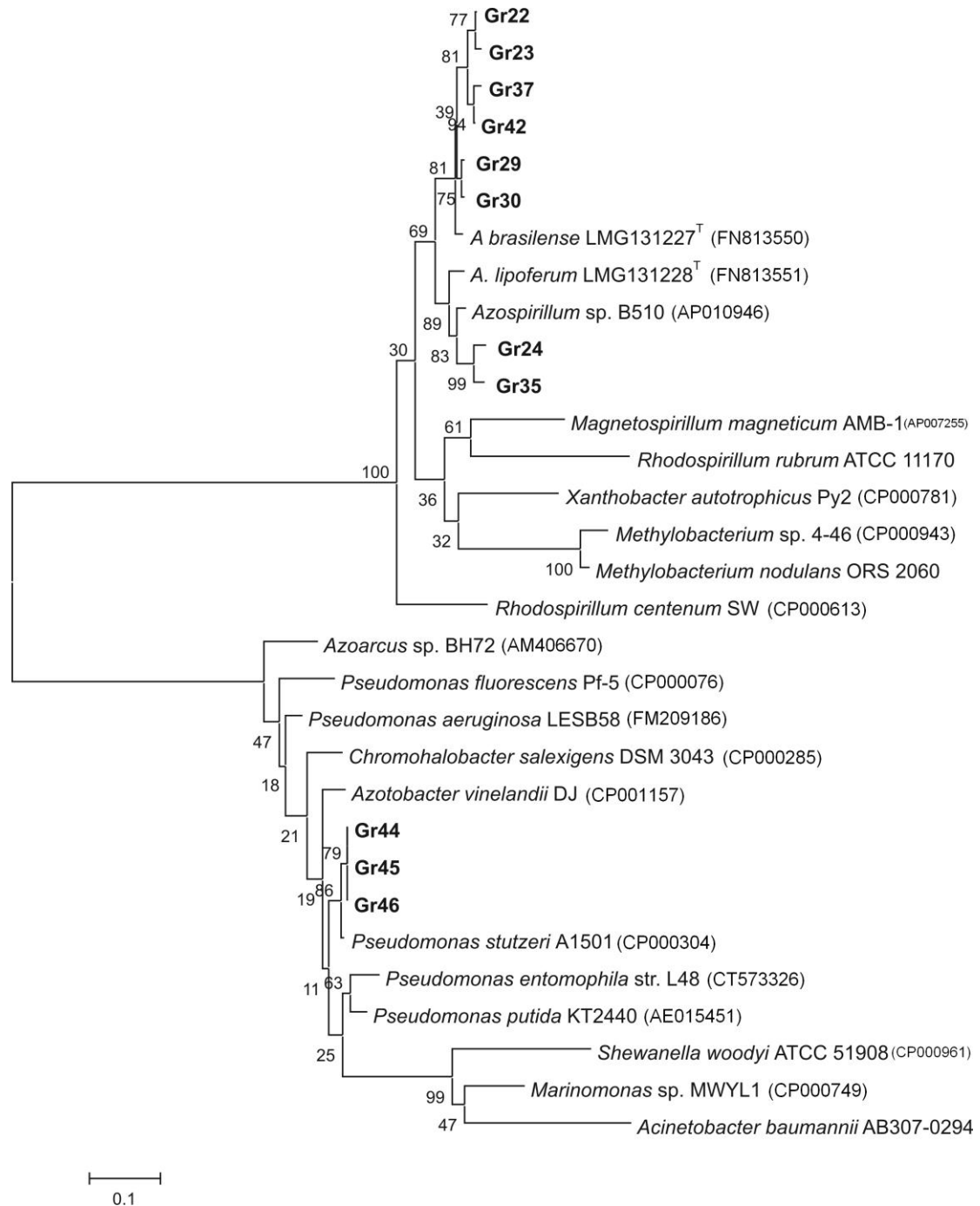
Strain	% A	% G	% T (U)	% C	% A+T (U)	% C+ G	Σύνολο
Gr44	23,33	28,15	15,93	32,56	39,26	60,74	270
Gr45	23,33	28,15	15,93	32,56	39,26	60,74	270
Gr46	23,33	28,15	15,93	32,56	39,26	60,74	270
Μέσος όρος	23,33	28,15	15,93	32,56	39,26	60,74	-

**Πίνακας 3.12.** Συχνότητα νουκλεοτιδίων, αθροισμάτων G+C και A+T(U) καθώς και ο μέσος όρος αυτών, στην κάθε αλληλουχία των 3 υποκλώνων *dnaK*, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas*, βάσει μοριακής ανάλυσης 16S rRNA. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Lasergene 7.0.

#### 3.4.4 Φυλογενετικό δέντρο των ακολουθιών *dnaK*

Ολοκληρώνοντας, τη μοριακή ανάλυση των προαναφερθέντων υποκλώνων *dnaK*, πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση και εκτίμηση των εξελικτικών αποστάσεων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών τους, μέσω του αλγόριθμου Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) του προγράμματος DNASTar (παράρτημα Δ' και Ε').

Ακολούθως κατασκευάστηκε το δενδρόγραμμα των ακολουθιών *dnaK* (σχήμα 3.13), με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987)



**Σχήμα 3.13.** Εξελεγκτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει τμήματος του γονιδίου *dnaK*. Η απεικόνιση της εξελεγκτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονιστεί η εξελεγκτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa (32 taxa). Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μια ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν στο σύνολο των δεδομένων (επιλογή πλήρους επάλειψης). Σύνολο 242 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2004)

Accession Numbers

*Azospirillum brasilense* partial dnaK gene for putative molecular chaperon DnaK, strain LMG13127 (BCCM/LMG)

GenBank: FN813550

*Azospirillum lipoferum* partial dnaK gene for putative molecular chaperon DnaK, strain LMG13128 (BCCM/LMG)

GenBank: FN813551

*Azospirillum* sp. B510 DNA, complete genome

GenBank: AP010946

*Magnetospirillum magneticum* AMB-1 DNA, complete genome

GenBank: AP007255

*Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170, complete genome

GenBank: CP000230

*Xanthobacter autotrophicus* Py2, complete genome

GenBank: CP000781

*Methylobacterium* sp. 4-46, complete genome

GenBank: CP000943

*Methylobacterium nodulans* ORS 2060, complete genome

GenBank: CP001349

*Rhodospirillum centenum* SW; ATCC 51521, complete genome

GenBank: CP000613

*Azoarcus* sp. BH72, complete genome

GenBank: AM406670

*Pseudomonas fluorescens* Pf-5, complete genome

GenBank: CP000076

*Pseudomonas aeruginosa* LESB58 complete genome sequence

GenBank: FM209186

*Chromohalobacter salexigens* DSM 3043, complete genome

GenBank: CP000285

*Azotobacter vinelandii* DJ; ATCC BAA-1303, complete genome

GenBank: CP001157

*Pseudomonas stutzeri* A1501, complete genome

GenBank: CP000304

*Pseudomonas entomophila* str. L48 chromosome, complete sequence  
GenBank: CT573326

*Pseudomonas putida* KT2440 complete genome  
GenBank: AE015451

*Shewanella woodyi* ATCC 51908, complete genome  
GenBank: CP000961

*Marinomonas* sp. MWYL1, complete genome  
GenBank: CP000749

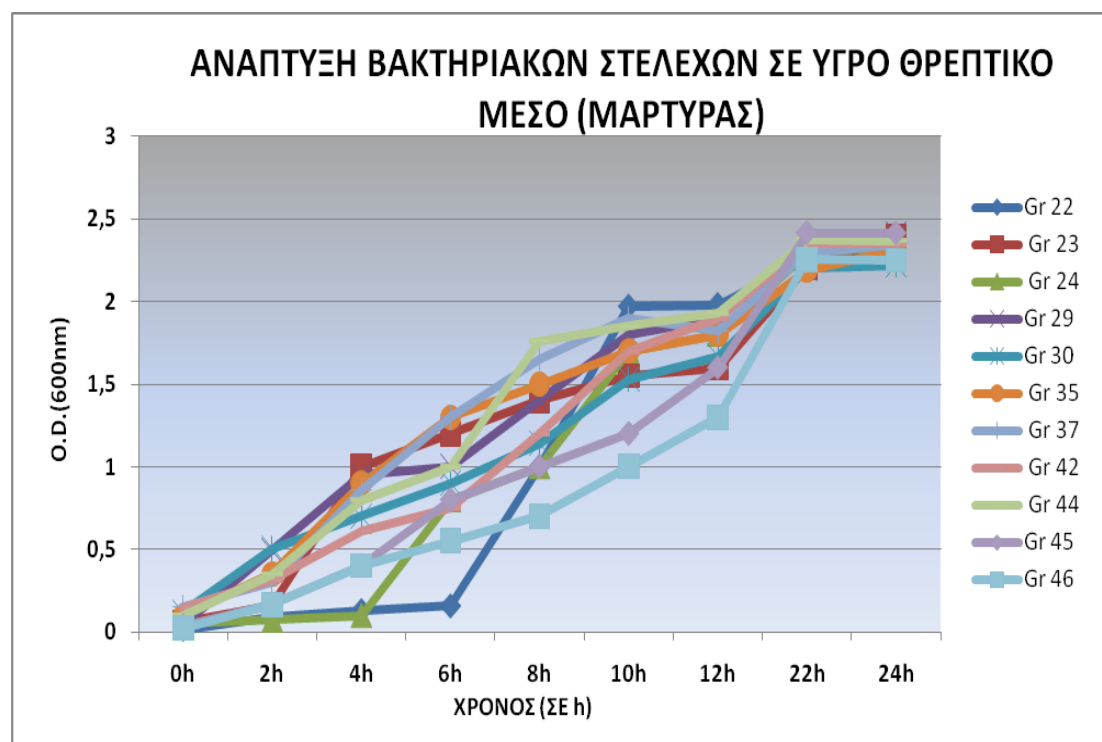
*Acinetobacter baumannii* AB307-0294, complete genome  
GenBank: CP001172

### 3.5 Ανθεκτικότητα βακτηριακών στελεχών παρουσία άλατος και αντιβιοτικού

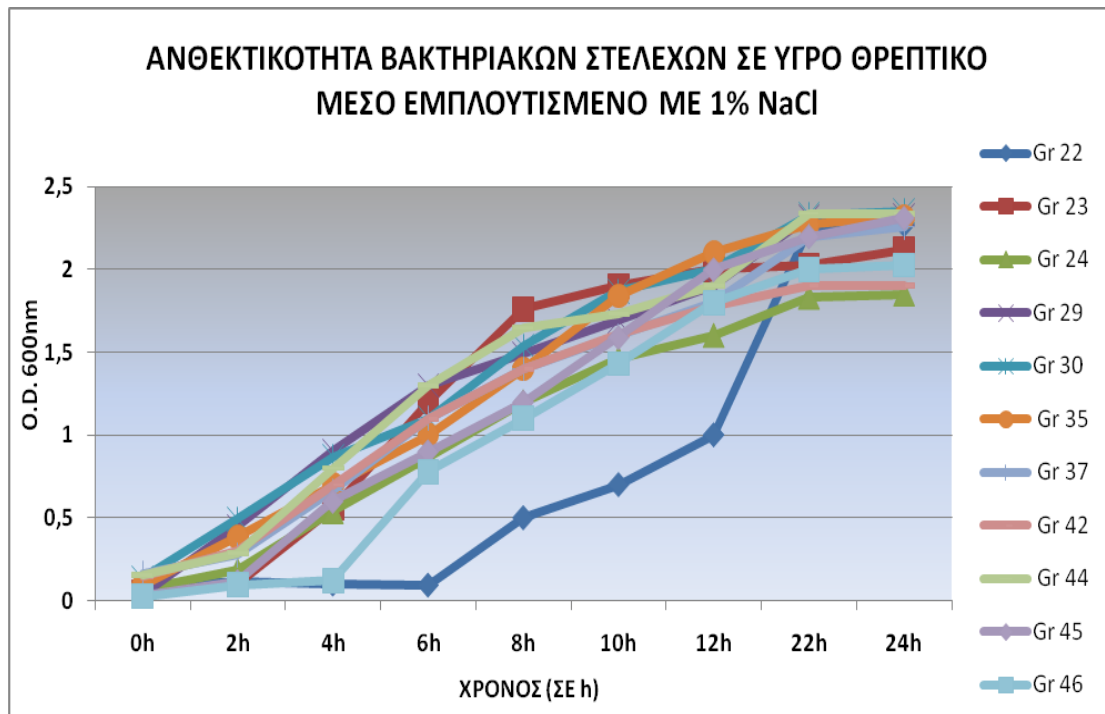
#### 3.5.1 Ανθεκτικότητα σε αλατότητα

Γνωρίζοντας ότι τα στελέχη του γένους *Azospirillum* επιδεικνύουν ανθεκτικότητα σε εδάφη με αλατότητα, εξετάστηκε η αντοχή των μελετώμενων βακτηριακών στελεχών σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με NaCl τελικής συγκέντρωσης, 1%, 5%, 10%.

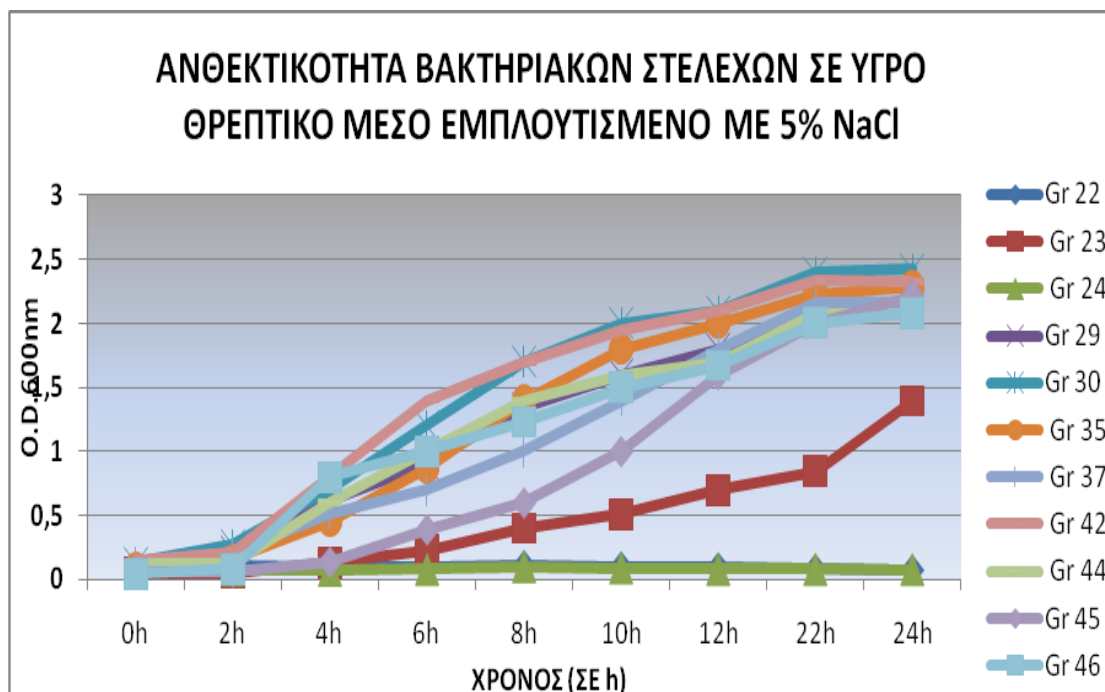
Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανθεκτικότητας των εν λόγω βακτηρίων στην αλατότητα (σχήμα 3.14, 3.15, 3.16 και 3.17).



**Σχήμα 3.14.** Ανάπτυξη των στελεχών Gr22, Gr23, Gr24, Gr29, Gr30, Gr35, Gr37, Gr42, Gr44, Gr45 και Gr46 σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία  $MgSO_4$  και  $CaCl_2$  τελικής συγκέντρωσης 2,5 Mm (Μάρτυρας). Επώαση υπό ανάδευση τους 30°C για 24h. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας ( $O.D._{600nm}$ ).

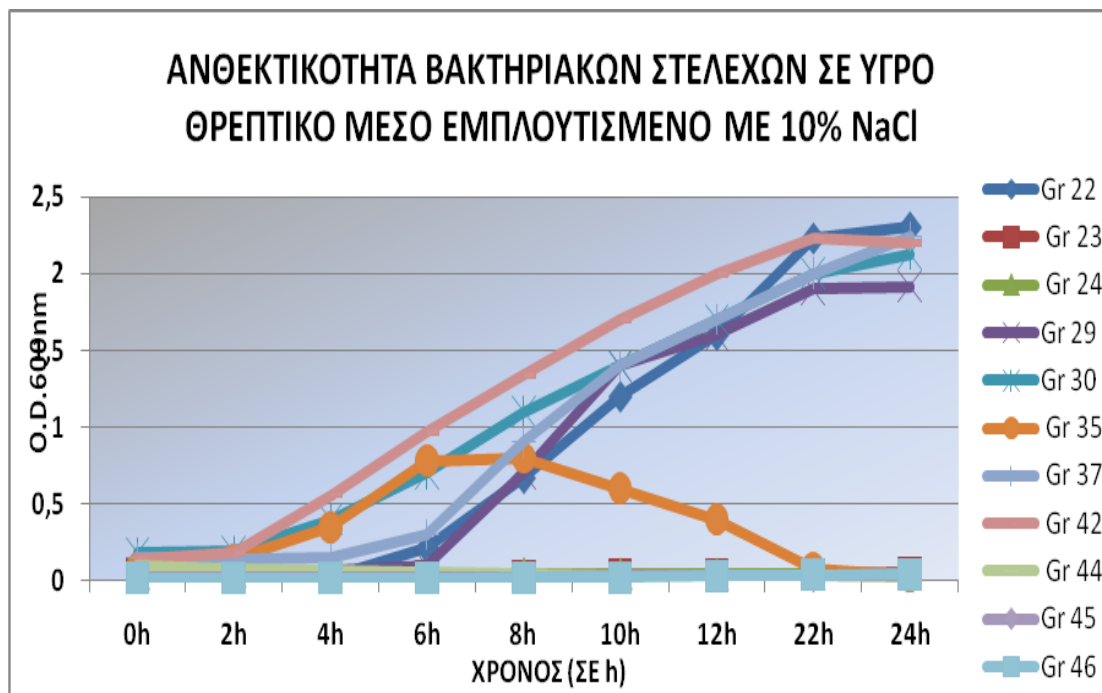


**Σχήμα 3.15.** Ανάπτυξη των στελεχών Gr22, Gr23, Gr24, Gr29, Gr30, Gr35, Gr37, Gr42, Gr44, Gr45 και Gr46 σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία  $MgSO_4$  και  $CaCl_2$  τελικής συγκέντρωσης 2,5 Mm, εμπλουτισμένο με 1% NaCl. Επώαση υπό ανάδευση τους 30°C για 24h. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (O.D.<sub>600nm</sub>).



**Σχήμα 3.16.** Ανάπτυξη των στελεχών Gr22, Gr23, Gr24, Gr29, Gr30, Gr35, Gr37, Gr42, Gr44, Gr45 και Gr46 σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία  $MgSO_4$  και  $CaCl_2$  τελικής συγκέντρωσης 2,5 Mm, εμπλουτισμένο με 5% NaCl. Επώαση υπό ανάδευση τους 30°C για 24h. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (O.D.<sub>600nm</sub>).





**Σχήμα 3.17.** Ανάπτυξη των στελεχών Gr22, Gr23, Gr24, Gr29, Gr30, Gr35, Gr37, Gr42, Gr44, Gr45 και Gr46 σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία  $MgSO_4$  και  $CaCl_2$  τελικής συγκέντρωσης 2,5 Mm, εμπλουτισμένο με 10% NaCl. Επώαση υπό ανάδευση τους 30°C για 24h. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (O.D.<sub>600nm</sub>).

### 3.5.2 Ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη (Rifampicin)

Το μόριο του αντιβιοτικού ριφαμπικίνης παρεμποδίζει στα βακτηριακά κύτταρα τη μεταγραφή του RNA και ακολούθως τη μετάφραση των πρωτεϊνών, μέσω της αναστολής της δράσης της DNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσθηκε επιπλέον, η ανθεκτικότητα των στελεχών *Gr35 – Azospirillum zeae* και *Gr37 – Azospirillum brasilense* στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη (Rif). Τα εν λόγω βακτηριακά στελέχη παρουσίασαν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό σε όλες τις συγκεντρώσεις υπό οποίες αναπτύχθηκαν (17, 8,5, 4,25 και 2,125  $\mu$ g Rif)

Εν συνεχεία η ανθεκτικότητά τους εξετάσθηκε σε ακόμα υψηλότερες συγκεντρώσεις ριφαμπικίνης, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο μεταλλαγμένα στελέχη ικανά να αναπτυχθούν σε συγκεντρώσεις μέχρι και 136  $\mu$ g/ml.

#### **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εστιάζει στην ανάπτυξη και εφαρμογή μοριακών τεχνικών με στόχο την ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών και την αξιολόγησή τους ως προς τις ευεργετικές τους ιδιότητες στα φυτά. Αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε ο μοριακός χαρακτηρισμός έντεκα στελεχών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα φυτών μαλακού σιταριού *Triticum aestivum*.

Τα μελετώμενα στελέχη έχουν ήδη απομονωθεί από το Εργαστήριο Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α. και έχουν χαρακτηριστεί βάσει κλασικών μεθόδων μικροβιολογίας (Κεφαλογιάννη, 2008). Οι απομονώσεις των βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκαν δειγματοληπτικά από διαφορετικά γεωγραφικά διαμερίσματα, τα οποία αποτελούν τους κύριους σιτοβολώνες της Ελλάδας, από διαφορετικές ποικιλίες και διαφορετικά σημεία της ρίζας και της ριζόσφαιρας του μαλακού σιταριού. Συγκεκριμένα από τις περιοχές: Στερεά Ελλάδα (Δομοκός, Φθιώτιδος), Θεσσαλία (Γόννοι, Λαρίσης) και Μακεδονία (Θεσσαλονίκη) και τις ποικιλίες: Vergina, Yecora, Siete Cerros και Generoso.

Στο εξαπλοειδικό (*Triticum aestivum*), το οποίο είναι το παραδοσιακό αρτοποιήσιμο σιτάρι και το πιο σπουδαίο είδος αγρονομικά και εξελικτικά, ανήκουν σχεδόν όλες οι ποικιλίες που είναι τώρα καλά προσαρμοσμένες σε ένα μεγάλο φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών σε ολόκληρο τον κόσμο.

Η εκθετική αύξηση του πληθυσμού, καταδεικνύει τη ραγδαίως αυξανόμενη ανάγκη για αποδοτικές καλλιέργειες σιτηρών, τα οποία αποτελούν βασική διατροφική ανάγκη 6,5 δισεκατομμυρίων ανθρώπων σε όλο τον πλανήτη. Βάσει αυτού, αποκτά ενδιαφέρον η διερεύνηση αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ελεύθερης διαβίωσης τα οποία μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά ποσά αζώτου (Frache *et al.*, 2008). Ο εμβολιασμός του εδάφους με ελεύθερα διαβιούντα διαζωτροφικά βακτήρια

διερευνάται τα τελευταία χρόνια ως μία ακόμη εναλλακτική πρακτική περιορισμού ή αντικατάστασης των ανόργανων χημικών αζωτούχων λιπασμάτων (Park *et al.*, 2005). Περιλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό γενών αναερόβιων και αερόβιων βακτηρίων τα οποία έχουν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα πολλών φυτικών ειδών (Park *et al.*, 2005). Οι πιθανοί μηχανισμοί που προάγουν τις αποδόσεις των φυτών δεν περιορίζονται μόνο στη δέσμευση και παροχή του αζώτου, αλλά αποδίδονται και στην παραγωγή φυτοορμονών και βιταμινών, στην πρόκληση ανθεκτικότητας σε παθογόνα, σε αυξημένη πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων και διαλυτοποίηση του φωσφόρου (Kennedy *et al.*, 2004).

Πριν χρησιμοποιηθούν τα προς ταυτοποίηση με μοριακές τεχνικές, βακτηριακά στελέχη, πραγματοποιήθηκε επανεκτίμηση της αζωτοδεσμευτικής τους ικανότητας με τη μέθοδο αναγωγής ακετυλενίου σε αιθυλένιο (δισ), ώστε να διασφαλισθεί η ενεργός δράση της χαρακτηριστικής ιδιότητας της αζωτοδέσμευσης των συγκεκριμένων βακτηριακών στελεχών.

Η μεθοδολογία η οποία υιοθετήθηκε για τη μοριακή προσέγγιση της ταυτοποίησης αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, περιλαμβάνει την επιλογή τεσσάρων γονιδίων προκειμένου να αναλυθεί τμήμα της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας. Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους, με τη χρήση κατάλληλων εκκινήτων, μέσω της τεχνικής PCR, ακολούθησε υποκλωνοποίηση και τέλος αλληλούχηση τμημάτων που κωδικοποιούν για τα συντηρημένα (housekeeping) γονίδια 16S rRNA και *dnaK* (chaperone protein DnaK), καθώς και τμημάτων δύο γονιδίων υπεύθυνων για τις σημαντικότερες ιδιότητες των αυξητικών βακτηρίων PGPR: το *nifH* (αζωτοδέσμευση) και το *ipdC* (παραγωγή φυτοορμόνης).

Το συντηρημένο γονίδιο του ριβοσωμικού RNA που κωδικοποιεί για την υπομονάδα 16S RNA, αποτελεί ένα δυναμικό φυλογενετικό εργαλείο, βάσει του οποίου έχουν δημιουργηθεί τα περισσότερα φυλογενετικά δέντρα προκαρυωτικών οργανισμών. Η χρήση του γονιδίου 16S rRNA αποτελεί μια προσέγγιση πλέον αποδεκτή και διαδεδομένη για τη βακτηριακή ταξινόμηση και φυλογένεια. Είναι παρόν, σχεδόν, σε όλα τα βακτήρια και έχει μέγεθος ~1500 bp, το οποίο εξυπηρετεί σε έρευνες βιοπληροφορικής (Janda & Abbott, 2007). Σύμφωνα με την ad-hoc επιτροπή για την επανεκτίμηση του προσδιορισμού ειδών στη βακτηριολογία, κατά την περιγραφή ενός νέου είδους η ακολουθία 16S rRNA, προκειμένου να είναι αντιπροσωπευτική, πρέπει να έχει μέγεθος μεγαλύτερο των 1300 βάσεων (<0,5% αμφιβολία) (Stackebrandt *et al.*, 2002). Για τον παραπάνω λόγο, στην παρούσα

έρευνα ενισχύθηκε τμήμα 1450 bp του 16S rRNA – επί του συνόλου ~1500 bp (96,6%-100%). Παρά την αναμφισβήτητη υπεροχή και αποδοχή του συγκεκριμένου γονιδίου, προτείνεται η μοριακή ανάλυση περισσότερων του ενός γονιδίου για την υποστήριξη αποτελεσμάτων των φυλογενετικών αναλύσεων.

Το συντηρημένο γονίδιο *dnaK* κωδικοποιεί για μόρια τσαπερόνης (chaperone protein) τα οποία επιτελούν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως το δίπλωμα των πρωτεϊνών και η προστασία έναντι υψηλών θερμοκρασιών. Χρησιμοποιείται ως φυλογενετικό εργαλείο κυρίως μεταξύ των Πρωτεοβακτηρίων αλλά και Gram<sup>-</sup> - Gram<sup>+</sup> βακτηρίων. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ανάλυση τμήματος νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεγέθους 327 bp.

Το δομικό γονίδιο *nifH*, το οποίο απαντάται σε όλους τους προκαρυωτικούς αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς, κωδικοποιεί για τη Fe-πρωτεΐνη της νιτρογενάσης (αναγωγή της νιτρογενάσης). Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ανάλυση τμήματος νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεγέθους 360 bp - επί του συνόλου 882 bp (40,8-100%). Οι εξελικτικές σχέσεις στελεχών, όπως προκύπτουν από μοριακές αναλύσεις του γονιδίου *nifH*, είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη φυλογενετικών αναλύσεων άλλων γονιδίων σε αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς. Η συγκεκριμένη διαπίστωση είναι απόρροια σχετικών ερευνών, οι οποίες επιβεβαιώνουν τη συμφωνία, σε μεγάλο βαθμό, της φυλογένειας του *nifH* με τη φυλογένεια του 16 S rRNA.

Η αυξίνη ινδολοξικό οξύ παράγεται από τα PGPR βακτήρια κυρίως μέσω του μονοπατιού της τρυπτοφάνης, του μονοπατιού του ινδολοπυρουβικού οξέος (IPyA). Η ινδολο-3-πυρουβική αποκαρβοξυλάση συμμετέχει σε αυτό το μονοπάτι και κωδικοποιείται από το γονίδιο *IpdC*. Η αυξίνη ινδολοξικό οξύ, ο κυριότερος εκπρόσωπος αυξινών (ποσοτικά) στα περισσότερα φυτά, συνεισφέρει στην προώθηση της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος των φυτών. (Spraeren *et al.*, 2007). Κατά τη μελέτη του γονιδίου *IpdC* πραγματοποιήθηκε ανάλυση τμήματος νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεγέθους 1278 bp - επί του συνόλου 1638 bp (78,02%-100%).

Μετά την αλληλούχηση των υποκλωνοποιημένων τμημάτων του εκάστου γονιδίου, πραγματοποιήθηκε σύγκριση με τη βάση δεδομένων του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Tool, Altschul *et al.*, 1990), των διαδικτυακών τόπων NCBI (National Center for Biotechnology Information) και EzTaxon (Chun *et al.*, 2007), για τον προσδιορισμό του πλησιέστερου τυπικού στελέχους. Τα αποτελέσματα

της αναζήτησης στο BLAST για το τμήμα του γονιδίου 16S rRNA (πίνακας 4.1), χρησιμοποιήθηκαν ως αναφορά για την ταξινόμηση και ταυτοποίηση των στελεχών.

Strain	16S rRNA similarities (highest match %)	Type strain (highest match %)
Gr22	<i>Azospirillum</i> sp. NS01; AY061963.2 (99)	<i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 49958 (98.194)
Gr23	<i>Azospirillum brasilense</i> strain ISSDS-855; EF634028.1 (99)	<i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 49958 (98.125)
Gr24	<i>Azospirillum</i> sp. TSH56; AB508852.1 (99)	<i>Azospirillum zeae</i> N7 DQ682470 (98.682)
Gr29	<i>Azospirillum</i> sp. YM 274; GU396258.1 (99)	<i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 49958 (97.639)
Gr30	<i>Azospirillum</i> sp. YM 274; GU396258.1 (99)	<i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 49958 (97.500)
Gr35	<i>Azospirillum</i> sp. Mat2-1a; AY118222.1 (98)	<i>Azospirillum zeae</i> N7 (98.058)
Gr37	<i>Azospirillum brasilense</i> strain ISSDS-855; EF634028.1 (99)	<i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 49958 (97.985)
Gr42	<i>Azospirillum</i> sp. DA10-2; AY118225.1 (99)	<i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 49958 (99.514)
Gr44	<i>Pseudomonas</i> sp. sampath10; HM749063.1 (99)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCUG 11256 (99.931)
Gr45	<i>Pseudomonas</i> sp. sampath10; HM749063.1 (99)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCUG 11256 (99.931)
Gr46	<i>Pseudomonas</i> sp. sampath10; HM749063.1 (99)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCUG 11256 (99.725)

**Πίνακας 4.1.** Κατάταξη των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών μετά από ταυτοποίηση βάσει του 16S rRNA γονιδίου. (Στήλη 1. Αποτέλεσμα Blast με το διαδικτυακό πρόγραμμα NCBI, Στήλη 2. Αποτέλεσμα Blast με το διαδικτυακό πρόγραμμα EzTaxon, για τον προσδιορισμό του πλησιέστερου τυπικού στελέχους (Chun *et al.*, 2007).

Οι συγκρίσεις που ακολούθησαν για τα γονίδια *dnaK*, *nifH* και *ipdC* συμφωνούν με τα δεδομένα που προέκυψαν για το 16S rRNA. Αυτό φαίνεται σαφώς στα αντίστοιχα φυλογενετικά δέντρα τα οποία παρατίθενται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων [Σχήμα 3.7 (σελ.139), 3.11 (σελ.147) και 3.13 (σελ.158)]. Παρατηρείται ότι η φυλογένεια των *dnaK*, *nifH* και *ipdC* ακολουθεί αυτή του 16S rRNA. Συγκεκριμένα, τα *Azospirillum brasilense* ομαδοποιούνται μεταξύ τους και

μεταξύ του τυπικού στελέχους τους. Ομοίως, τα *Azospirillum zeae* συγγενεύουν κυρίως με το τυπικό τους στέλεχος *A. zeae* N7 και το *Azospirillum* sp. B510, το οποίο πρόκειται ουσιαστικά για *A. lipoferum* (το *A. lipoferum* έχει μεγαλύτερη συγγένεια στο *A. zeae* παρά στο *A. brasilense*).

Σημειώνεται ότι για πρώτη φορά - μαζί με πρόσφατη δημοσίευση απομόνωσης από σκληρό σιτάρι (Venieraki *et al.*, 2010) - απομονώνεται το είδος *A. zeae* από μαλακό σιτάρι. Μέχρι στιγμής έχει απομονωθεί μόνο από ριζόσφαιρα φυτών αραβόσιτου (Mehnaz *et al.*, 2007).

Τα στελέχη *Pseudomonas* ομαδοποιούνται μεταξύ τους, μακριά από το cluster των *Azospirillum* όπως ήταν αναμενόμενο. Οι τρεις *Pseudomonas stutzeri* που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη φαίνεται να βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους φυλογενετικά. Αυτό είναι λογικό μιας και έχουν απομονωθεί από την ίδια ποικιλία μαλακού σιταριού (Generoso) και την ίδια γεωγραφική τοποθεσία (Θεσσαλονίκη). Η ομοιότητά τους είναι της τάξεως του 99,7% για το Gr46 με Gr44 και Gr45, και 99,9% για τα Gr44 και Gr45 μεταξύ τους.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε επιπλέον, η αντοχή των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών στην αλατότητα. Εκτελέστηκε πείραμα *in vitro* σε τρεις συγκεντρώσεις αλατότητας, 1%, 5%, 10% NaCl και μάρτυρας. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα η ανάπτυξη των στελεχών *Azospirillum brasilense* ακόμη και στην υψηλή συγκέντρωση NaCl. Αντιθέτως, τα στελέχη Gr24 και Gr35, που ταυτοποιήθηκαν ως *Azospirillum zeae*, δεν αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με NaCl, ιδιαίτερα το στέλεχος Gr24 δεν αναπτύσσεται καθόλου. Το στέλεχος Gr35 στην υψηλή συγκέντρωση 10% NaCl παρουσίασε στην αρχή μια μικρή αύξηση της οπτικής πυκνότητας και σε λιγότερο από 16 ώρες σταμάτησε η ανάπτυξη του βακτηρίου. Τα είδη του γένους *Azospirillum* επιδεικνύουν μια ανθεκτικότητα σε εδάφη με αλατότητα. Γενικά, τα βακτηριακά κύτταρα *Azospirillum*, κυρίως τα εγκυστωμένα κύτταρα, είναι ανθεκτικά στην ξηρασία και υψηλή θερμοκρασία μέχρι 40 °C και μετατρέπονται εύκολα σε βλαστικά κύτταρα με απλά θρεπτικά μέσα και προσκολλώνται αποτελεσματικά σε ρίζες και σπόρους.

Ακολούθως, στη συγκεκριμένη έρευνα εξετάστηκε η ανθεκτικότητα δύο στελεχών -των *A. zeae* Gr35 και *A. brasilense* Gr37- στο αντιβιοτικό ριφαμικίνη (Rifampicin). Το μόριο του συγκεκριμένου αντιβιοτικού παρεμποδίζει στα βακτηριακά κύτταρα την DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, δεσμεύοντας τη β-

υπομονάδα τους, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η μεταγραφή του RNA και κατά επέκταση η μετάφραση των πρωτεϊνών. Στα προαναφερθέντα στελέχη έγινε διαδοχική μετάλλαξη (step by step). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα στελέχη ανέπτυξαν ανθεκτικότητα σε αυξημένη συγκέντρωση του αντιβιοτικού, και δημιουργήθηκαν μεταλλαγμένα στελέχη, από τα *Gr35* και *Gr37*, ανθεκτικά σε υψηλή συγκέντρωση (ως 136 μg/ml) ριφαμπικίνης τα οποία στο μέλλον μπορούν να αλληλουχηθούν ως προς γονίδια που βρίσκονται μεταλλάξεις που αφορούν στην ριφαμπικίνη, όπως το *rrxB* και άλλα. Το *rrxB* είναι ένα συντηρημένο γονίδιο στα βακτήρια στο οποίο η ριφαμπικίνη δημιουργεί μεταλλάξεις.

Συμπερασματικά αναφέρεται ότι ταυτοποιήθηκαν 11 αζωτοδεσμευτικά βακτηριακά στελέχη από ριζόσφαιρα μαλακού σιταριού μεταξύ των οποίων, 6 *Azospirillum brasilense*, 2 *A. zea* και 3 *Pseudomonas stutzeri*. Μελετήθηκαν τα γονίδια 16S rRNA, *nifH*, *dnaK* και *ipdC* τα οποία υποκλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν.

Ολοκληρώνοντας την παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, αξίζει να σημειωθεί ότι τα στελέχη *Azospirillum* και *Pseudomonas* προωθούν την ανάπτυξη των σιτηρών και άλλων φυτών ως PGPRs (Creus *et al.*, 2005, Blaha *et al.*, 2006, Rodriguez *et al.*, 2006). Επιπλέον, βιοαποικοδομούν φυτοφάρμακα (Foster *et al.*, 2004). Ο εμβολιασμός φυτών με *Azospirillum* μπορεί να συμβάλει στη διασυστηματική προστασία των φυτών έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων και ιών. Εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων έδειξε ότι τα *Azospirillum* είναι δραστικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπερχλωριωδών αλάτων συγκριτικά με άλλους μικροοργανισμούς (Waller *et al.*, 2004).

Εν κατακλείδι, τα αζωτοδεσμευτικά *Azospirillum* και *Pseudomonas* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εμπλουτισμό των εδαφών σε βιολογικές καλλιέργειες και γενικότερα ως προωθητικοί παράγοντες ανάπτυξης. Η απομόνωση και η μελέτη της φυσιολογίας και οικολογίας στελεχών του γένους *Azospirillum* και *Pseudomonas* δίνουν τη δυνατότητα ευρείας μελλοντικής έρευνας.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄****ΣΥΝΘΕΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ**

**Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων *E.coli***

***I. Lysogeny broth (LB)***

a) Για την παρασκευή 1 l υγρού θρεπτικού διαλύματος LB, σε τελικό όγκο 1 l dH<sub>2</sub>O προστίθενται:

- 10 g NaCl
- 10g Bacto-Trypton (Casein) και
- 5 g εκχύλισμα ζύμης Yeast extract.

b) Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου προστίθεται στο παραπάνω διάλυμα 1,5% Agar.

- Συνθήκες ανάπτυξης: 37 °C για 16 h

**Εκλεκτικά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης των «μοντέλων βακτηριακών στελεχών» του γένους *Azospirillum***

***II. Oxoid CM3***

Για την παρασκευή 1 l υγρού θρεπτικού διαλύματος Oxoid CM3, σε τελικό όγκο 1 l dH<sub>2</sub>O προστίθενται:

- “Lab-Lemco” beef extract 1g
- Εκχύλισμα ζύμης 2 g
- Πεπτόνη 5 g
- NaCl 5g

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,4.

- Συνθήκες ανάπτυξης: 30 °C για 24 h



### III. Oxoid CM131

Για την παρασκευή 1 l υγρού θρεπτικού διαλύματος Oxoid CM131, σε τελικό όγκο 1 l dH<sub>2</sub>O προστίθενται:

- Τρυπτόνη 15 g
- Πεπτόνη σόγιας 5 g
- NaCl 5g

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,3.

- Συνθήκες ανάπτυξης: 30 °C για 24 h

### Εκλεκτικά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης των υπό μελέτη βακτηρίων

### IV. Congo red (RC) (Rodríguez Cáceres E. A, 1982)

Για την παρασκευή 1 l στερεού θρεπτικού διαλύματος RC, σε τελικό όγκο 1 l dH<sub>2</sub>O προστίθενται:

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g
- NaCl 0,2 g
- Yeast extract 0,1g
- FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0,5 g
- DL –malic acid 5 g
- KOH 48 g
- Agar 20 g
- dH<sub>2</sub>O 1000 ml

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,0 με προσθήκη KOH 1N.

- Συνθήκες ανάπτυξης: 30 °C για 24 h

### VI. Nfb (Lucia, Baldani & Böbereiner, 1980)

a) Για την παρασκευή υγρού θρεπτικού διαλύματος Nfb, σε τελικό όγκο 1 l dH<sub>2</sub>O προστίθενται:

- Malic acid 5,0 g
  - $K_2HPO_4$  0,5 g
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g
  - NaCl 0,1 g
  - $CaCl_2$  0,02 g
  - $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0,02 g
  - $MnSO_4 \cdot H_2O$  0,01 mg
  - FeEDTA 4 ml
  - Μπλε της βρωμοθυμόλης (0,5% w/v σε αιθανόλη) 3 ml
  - KOH 4,5 g
  - Βιταμινούχο διάλυμα 1 ml (Biotin 10 mg και Pyridoxin 20 mg σε 100 ml dH<sub>2</sub>O)
  - Yeast axtract 0,02 g
  - dH<sub>2</sub>O 1000 ml
- b) Για ημίρρευστο διάλυμα Nfb, προστίθεται επιπλέον 1,75 g agar και μοιράζεται σε σωλήνες veroject
- c) Για στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Nfb προστίθενται επιπλέον 15 g agar και 20 mg yeast extract

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 6,8 με NaOH.

- Συνθήκες ανάπτυξης: 30 °C για 24 h

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄****ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ****A. Διαλύματα απομόνωσης DNA**

1. **Tris-HCl 1M pH:7:** Σε τελικό όγκο 1 l H<sub>2</sub>O διαλύονται 121,14 g Tris-Base (BDH). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,0 με την προσθήκη πυκνού HCl. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
2. **TE:** Tris-HCl 10 mM pH:8, EDTA. 25 mM
3. **Λυσοζύμη:** 50 mg λυσοζύμης διαλύονται σε 1 ml dH<sub>2</sub>O (Boehringer-Mannheim). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.
4. **RNase A:** 10 mg RNase A διαλύονται σε 1 ml Tris-HCl 10 mM pH:7,5 / NaCl 15 mM. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100 °C για 15 min, με σκοπό την αδρανοποίηση τυχόν δράσης DNase, αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσεται στους -20 °C.

**B. Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων**

5. **TAE 1x:** Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα TAE 50x, το οποίο αραιώνεται 50 φορές. **TAE 50x:** 242 g Tris base, 57,1 ml οξικού οξέος και 0,5 ml EDTA pH:8,0 σε ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 1l.
6. **Βρωμιούχο αιθίδιο:** Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε dH<sub>2</sub>O και φυλάσσεται στους 4 °C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0,5 mg/ml.
7. **Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer):** 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου και 30% γλυκερόλη.

**C. Διαλύματα υποκλωνοποίησης τμημάτων DNA**

8. *Ρυθμιστικό διάλυμα λιάσης 10x*: Tris-HCl 0,66 M pH:7,6, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, DTT 50 mM και ATP 10 mM. Το πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα λιάσης φυλάσσεται σε μικρές ποσότητες στους -20 °C.

**D. Διαλύματα μετασηματισμού κυττάρων *E. coli***

9. *IPTG 100 mM*: 23,8 g IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, SIGMA) διαλύονται σε 1 ml ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0,22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20 °C.
10. *X-Gal 2%*: 0,02 g X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase, SIGMA) (Boehringer-Mannheim) προστίθενται σε 1 ml διμεθυλ-φορμαμίδιο.

**E. Διαλύματα αντίδρασης PCR**

11. *Ρυθμιστικό διάλυμα PCR 10x*: Tris-HCl 100 mM pH:8,3 , KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, 0,1% (w/v) και gelatin (BDH)

**F. Διαλύματα προσδιορισμού της αντοχής στην αλατότητα**

12. *1% NaCl* : Σε τελικό όγκο 100 ml LB διαλύεται 1 g χλωριούχου νατρίου.
13. *5% NaCl* : Σε τελικό όγκο 100 ml LB διαλύονται 5 g χλωριούχου νατρίου.
14. *10% NaCl* : Σε τελικό όγκο 100 ml LB διαλύονται 10 g χλωριούχου νατρίου

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ΄****ΜΗΤΡΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ**■ ***Αμπικιλλίνη (Ampicillin)***

Μητρικό διάλυμα: 100mg/ml σε dH<sub>2</sub>O

1. Τελική συγκέντρωση: 100μg/ml θεραπευτικού υλικού

■ ***Ριφαμπικίνη (Rifabacin)***

Μητρικό διάλυμα: 34mg/ml μεθανόλης

1. Τελική συγκέντρωση: 2,125μg/ml θεραπευτικού υλικού
2. Τελική συγκέντρωση: 4,25μg/ml θεραπευτικού υλικού
3. Τελική συγκέντρωση: 8,5μg/ml θεραπευτικού υλικού
4. Τελική συγκέντρωση: 17μg/ml θεραπευτικού υλικού
5. Τελική συγκέντρωση: 34μg/ml θεραπευτικού υλικού
6. Τελική συγκέντρωση: 68μg/ml θεραπευτικού υλικού
7. Τελική συγκέντρωση: 136μg/ml θεραπευτικού υλικού



Genomic data table with columns for sequence coordinates (370-420, 430-480, 490-540, 550-600, 610-660, 670-720, 730-780, 790-840, 850-900) and rows for sequence variants (361-368, 421-428, 491-498, 541-548, 601-608, 661-668, 721-728, 781-788, 841-848). The table includes a 'Majority' column and a 'seq' column with values like '22-165.seq' through '42-165.seq'. The data consists of a dense grid of nucleotide characters (A, T, C, G) representing sequence variations across different genomic regions.

A A C G C G C A G A A C C T T A C C A A C C C C T T G A C A T G T C C A T T G C C - G G T C C G A G A G A T T G G A C C -																																																																																																				Majority
910	920	930	940	950	960	22-16s.seq																																																																																														
901	901	901	901	901	901	23-16s.seq																																																																																														
901	901	901	901	901	901	24-16s.seq																																																																																														
901	901	901	901	901	901	25-16s.seq																																																																																														
901	901	901	901	901	901	26-16s.seq																																																																																														
901	901	901	901	901	901	27-16s.seq																																																																																														
901	901	901	901	901	901	42-16s.seq																																																																																														
T T C A G T T C G G C T G G A T G G A A C A C A G G T G C T G C A T G G C T G C G T C A G C T C G T G T C G T G A G A																																																																																																				Majority
970	980	990	1000	1010	1020	22-16s.seq																																																																																														
959	959	959	959	959	959	23-16s.seq																																																																																														
959	959	959	959	959	959	24-16s.seq																																																																																														
959	959	959	959	959	959	25-16s.seq																																																																																														
959	959	959	959	959	959	26-16s.seq																																																																																														
959	959	959	959	959	959	27-16s.seq																																																																																														
959	959	959	959	959	959	42-16s.seq																																																																																														
T G T T G G G T T A G T C C C C G C A A C G A G C C C A C C C T A C C C G C C A G T T G C C A T C A A T T C A G T T G G																																																																																																				Majority
1030	1040	1050	1060	1070	1080	22-16s.seq																																																																																														
1019	1019	1019	1019	1019	1019	23-16s.seq																																																																																														
1020	1020	1020	1020	1020	1020	24-16s.seq																																																																																														
1020	1020	1020	1020	1020	1020	25-16s.seq																																																																																														
1020	1020	1020	1020	1020	1020	26-16s.seq																																																																																														
1020	1020	1020	1020	1020	1020	27-16s.seq																																																																																														
1020	1020	1020	1020	1020	1020	42-16s.seq																																																																																														
G C A C T C T G G T G G A A C T G C C G C T G A C A A G C C G G A G G A A G C G G G A T G A C G T C A A G T C C T C																																																																																																				Majority
1090	1100	1110	1120	1130	1140	22-16s.seq																																																																																														
1079	1079	1079	1079	1079	1079	23-16s.seq																																																																																														
1080	1080	1080	1080	1080	1080	24-16s.seq																																																																																														
1080	1080	1080	1080	1080	1080	25-16s.seq																																																																																														
1080	1080	1080	1080	1080	1080	26-16s.seq																																																																																														
1080	1080	1080	1080	1080	1080	27-16s.seq																																																																																														
1080	1080	1080	1080	1080	1080	42-16s.seq																																																																																														
A T G G C C C T T A T G G G T T G G C T A C A C A C C G T C T A C A A T G G C G T G A C A G T G G G A C C C G A A G																																																																																																				Majority
1150	1160	1170	1180	1190	1200	22-16s.seq																																																																																														
1139	1139	1139	1139	1139	1139	23-16s.seq																																																																																														
1140	1140	1140	1140	1140	1140	24-16s.seq																																																																																														
1140	1140	1140	1140	1140	1140	25-16s.seq																																																																																														
1140	1140	1140	1140	1140	1140	26-16s.seq																																																																																														
1140	1140	1140	1140	1140	1140	27-16s.seq																																																																																														
1140	1140	1140	1140	1140	1140	42-16s.seq																																																																																														
T C G C A A G A T G G A G C A A A T C C C C A A A G C C G T C T C A G T T C G G A T T G C A C T C T G C A A C T C G G																																																																																																				Majority
1210	1220	1230	1240	1250	1260	22-16s.seq																																																																																														
1199	1199	1199	1199	1199	1199	23-16s.seq																																																																																														
1200	1200	1200	1200	1200	1200	24-16s.seq																																																																																														
1200	1200	1200	1200	1200	1200	25-16s.seq																																																																																														
1200	1200	1200	1200	1200	1200	26-16s.seq																																																																																														
1200	1200	1200	1200	1200	1200	27-16s.seq																																																																																														
1200	1200	1200	1200	1200	1200	42-16s.seq																																																																																														
G T G C A T G A A G T T G G A A T C C C T A G T A A T C G C G G A T C A G C A C C C G C G G T G A A T A C G T T C C																																																																																																				Majority
1270	1280	1290	1300	1310	1320	22-16s.seq																																																																																														
1259	1259	1259	1259	1259	1259	23-16s.seq																																																																																														
1260	1260	1260	1260	1260	1260	24-16s.seq																																																																																														
1260	1260	1260	1260	1260	1260	25-16s.seq																																																																																														
1260	1260	1260	1260	1260	1260	26-16s.seq																																																																																														
1260	1260	1260	1260	1260	1260	27-16s.seq																																																																																														
1260	1260	1260	1260	1260	1260	42-16s.seq																																																																																														
G G C C T T G T A C A C C C C C C G T C A C A C C A T G G G A G T T G G C T T T A C C G A A G G T G G T G C G C																																																																																																				Majority
1330	1340	1350	1360	1370	1380	22-16s.seq																																																																																														
1319	1319	1319	1319	1319	1319	23-16s.seq																																																																																														
1320	1320	1320	1320	1320	1320	24-16s.seq																																																																																														
1320	1320	1320	1320	1320	1320	25-16s.seq																																																																																														
1320	1320	1320	1320	1320	1320	26-16s.seq																																																																																														
1320	1320	1320	1320	1320	1320	27-16s.seq																																																																																														
1320	1320	1320	1320	1320	1320	42-16s.seq																																																																																														
T A A C C - G G C A A C C G - A G C A G C C A C A C C A C G G T C A G G T C A G C G A C T G G G T G A A G T C G T A																																																																																																				Majority
1390	1400	1410	1420	1430	1440	22-16s.seq																																																																																														
1379	1379	1379	1379	1379	1379	23-16s.seq																																																																																														
1380	1380	1380	1380	1380	1380	24-16s.seq																																																																																														
1380	1380	1380	1380	1380	1380	25-16s.seq																																																																																														
1380	1380	1380	1380	1380	1380	26-16s.seq																																																																																														
1380	1380	1380	1380	1380	1380	27-16s.seq																																																																																														
1380	1380	1380	1380	1380	1380	42-16s.seq																																																																																														
C A A G G T A G C C X X																																																																																																				Majority
1450	22-16s.seq																																																																																																			
1437	23-16s.seq																																																																																																			
1437	24-16s.seq																																																																																																			
1437	25-16s.seq																																																																																																			
1437	26-16s.seq																																																																																																			
1437	27-16s.seq																																																																																																			
1437	42-16s.seq																																																																																																			



2. Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών 16 S rRNA (*Pseudomonas*)

	- A G A G T T T G A T C T T G G C T C A G A T T G A A C G C T G C G G C A G G C C T A A C A C A T G C C A A G T C G A G	Majority
	10 20 30 40 50 60	
1	T A G A G T T T G A T C C T G C C T C A G A T T G A A C G C T G C G G C A G G C C T A A C A C A T G C C A A G T C G A G	44-16s.seq
1	A G A G T T T G A T C C T G C C T C A G A T T G A A C G C T G C G G C A G G C C T A A C A C A T G C C A A G T C G A G	45-16s.seq
1	A G A G T T T G A T C C T G C C T C A G A T T G A A C G C T G C G G C A G G C C T A A C A C A T G C C A A G T C G A G	46-16s.seq
	C G G A T G A G T T G G A G C T T G C T C A T G A T T C A G C G G C G G A C G G C T G A C T A A T G C C T A G G A A T C	Majority
	70 80 90 100 110 120	
61	C G G A T G A G T T G G A G C T T G C T C A T G A T T C A G C G G C G G A C G G C T G A C T A A T G C C T A G G A A T C	44-16s.seq
60	C G G A T G A G T T G G A G C T T G C T C A T G A T T C A G C G G C G G A C G G C T G A C T A A T G C C T A G G A A T C	45-16s.seq
60	C G G A T G A G T T G G A G C T T G C T C A T G A T T C A G C G G C G G A C G G C T G A C T A A T G C C T A G G A A T C	46-16s.seq
	T G C C T G G T A G T G G G G G A C A A C G C T T C G A A A G G A A C G C T A A T A C C G C A T A C G T C C T A G C G G	Majority
	130 140 150 160 170 180	
181	T G C C T G G T A G T G G G G G A C A A C G C T T C G A A A G G A A C G C T A A T A C C G C A T A C G T C C T A G C G G	44-16s.seq
120	T G C C T G G T A G T G G G G G A C A A C G C T T C G A A A G G A A C G C T A A T A C C G C A T A C G T C C T A G C G G	45-16s.seq
120	T G C C T G G T A G T G G G G G A C A A C G C T T C G A A A G G A A C G C T A A T A C C G C A T A C G T C C T A G C G G	46-16s.seq
	A G A A A G T G G G G A T C T T C T C G A C C T C A C G C T A T C A G A T G A G C C T A G G T C G G A T T A G C T A G G T	Majority
	190 200 210 220 230 240	
181	A G A A A G T G G G G A T C T T C T C G A C C T C A C G C T A T C A G A T G A G C C T A G G T C G G A T T A G C T A G G T	44-16s.seq
180	A G A A A G T G G G G A T C T T C T C G A C C T C A C G C T A T C A G A T G A G C C T A G G T C G G A T T A G C T A G G T	45-16s.seq
180	A G A A A G T G G G G A T C T T C T C G A C C T C A C G C T A T C A G A T G A G C C T A G G T C G G A T T A G C T A G G T	46-16s.seq
	T G G T G A G T A A A G G C T T C A C C A A G G C G A C G A T C C G T A A C T G G T C T G A G A G G A T G A T C A G T C	Majority
	250 260 270 280 290 300	
241	T G G T G A G T A A A G G C T T C A C C A A G G C G A C G A T C C G T A A C T G G T C T G A G A G G A T G A T C A G T C	44-16s.seq
240	T G G T G A G T A A A G G C T T C A C C A A G G C G A C G A T C C G T A A C T G G T C T G A G A G G A T G A T C A G T C	45-16s.seq
240	T G G T G A G T A A A G G C T T C A C C A A G G C G A C G A T C C G T A A C T G G T C T G A G A G G A T G A T C A G T C	46-16s.seq
	A C A C T G G A A C T G A G A C A C G C C A G A C T C T A C G G G A G C A G C A G T G G G G A A T A T T G G A C	Majority
	310 320 330 340 350 360	
391	A C A C T G G A A C T G A G A C A C G C C A G A C T C T A C G G G A G C A G C A G T G G G G A A T A T T G G A C	44-16s.seq
200	A C A C T G G A A C T G A G A C A C G C C A G A C T C T A C G G G A G C A G C A G T G G G G A A T A T T G G A C	45-16s.seq
200	A C A C T G G A A C T G A G A C A C G C C A G A C T C T A C G G G A G C A G C A G T G G G G A A T A T T G G A C	46-16s.seq
	A A T G G G C G A A A G C C T G A T C A A G C C A T G C C G C T G T G T G G A A G A A G G C T T T C G G A T T G T A A A	Majority
	370 380 390 400 410 420	
361	A A T G G G C G A A A G C C T G A T C A A G C C A T G C C A T G C C G C T G T G T G G A A G A A G G C T T T C G G A T T G T A A A	44-16s.seq
360	A A T G G G C G A A A G C C T G A T C A A G C C A T G C C A T G C C G C T G T G T G G A A G A A G G C T T T C G G A T T G T A A A	45-16s.seq
360	A A T G G G C G A A A G C C T G A T C A A G C C A T G C C A T G C C G C T G T G T G G A A G A A G G C T T T C G G A T T G T A A A	46-16s.seq
	G C A C T T T A A G T T T G G A G G A A G G C C A G T A A G T T A A A C C T T G C T C T G T T T G A C G T T A C C A A C	Majority
	430 440 450 460 470 480	
481	G C A C T T T A A G T T T G G A G G A A G G C C A G T A A G T T A A A C C T T G C T C T G T T T G A C G T T A C C A A C	44-16s.seq
420	G C A C T T T A A G T T T G G A G G A A G G C C A G T A A G T T A A A C C T T G C T C T G T T T G A C G T T A C C A A C	45-16s.seq
420	G C A C T T T A A G T T T G G A G G A A G G C C A G T A A G T T A A A C C T T G C T C T G T T T G A C G T T A C C A A C	46-16s.seq
	A G A A T A A G C C G G C T T A C C T T C G T G C C A G C A G C C G G G T A A T A C G A A G G G T G C A A G C C G T T	Majority
	490 500 510 520 530 540	
481	A G A A T A A G C C G G C T T A C C T T C G T G C C A G C A G C C G G G T A A T A C G A A G G G T G C A A G C C G T T	44-16s.seq
480	A G A A T A A G C C G G C T T A C C T T C G T G C C A G C A G C C G G G T A A T A C G A A G G G T G C A A G C C G T T	45-16s.seq
480	A G A A T A A G C C G G C T T A C C T T C G T G C C A G C A G C C G G G T A A T A C G A A G G G T G C A A G C C G T T	46-16s.seq
	A A T C G G A A T T A C T G G C G T A A A G C C G C C T A C G T G G T T C G T T A A G T T G A T G T G A A A G C C	Majority
	550 560 570 580 590 600	
541	A A T C G G A A T T A C T G G C G T A A A G C C G C C T A C G T G G T T C G T T A A G T T G A T G T G A A A G C C	44-16s.seq
540	A A T C G G A A T T A C T G G C G T A A A G C C G C C T A C G T G G T T C G T T A A G T T G A T G T G A A A G C C	45-16s.seq
540	A A T C G G A A T T A C T G G C G T A A A G C C G C C T A C G T G G T T C G T T A A G T T G A T G T G A A A G C C	46-16s.seq
	C C G G C T C A A C C T G G G A A C T G C A T C C A A A A C T G G C G A G C C T A G A G C T A T G C C A G G G T G G T	Majority
	610 620 630 640 650 660	
601	C C G G C T C A A C C T G G G A A C T G C A T C C A A A A C T G G C G A G C C T A G A G C T A T G C C A G G G T G G T	44-16s.seq
600	C C G G C T C A A C C T G G G A A C T G C A T C C A A A A C T G G C G A G C C T A G A G C T A T G C C A G G G T G G T	45-16s.seq
600	C C G G C T C A A C C T G G G A A C T G C A T C C A A A A C T G G C G A G C C T A G A G C T A T G C C A G G G T G G T	46-16s.seq
	G G A A T T T C T G T G T A G C G G T G A A A T G C G T A G A T A A G G A A G C A A C C A G T G G C G A A G G C	Majority
	670 680 690 700 710 720	
661	G G A A T T T C T G T G T A G C G G T G A A A T G C G T A G A T A A G G A A G C A A C C A G T G G C G A A G G C	44-16s.seq
660	G G A A T T T C T G T G T A G C G G T G A A A T G C G T A G A T A A G G A A G C A A C C A G T G G C G A A G G C	45-16s.seq
660	G G A A T T T C T G T G T A G C G G T G A A A T G C G T A G A T A A G G A A G C A A C C A G T G G C G A A G G C	46-16s.seq
	G A C C A C C T G G C T A A T A C T G A C A C T G G A G T G C G A A A G C C T G G G A G C A A A C A G U A T T A G A	Majority
	730 740 750 760 770 780	
721	G A C C A C C T G G C T A A T A C T G A C A C T G G A G T G C G A A A G C C T G G G A G C A A A C A G U A T T A G A	44-16s.seq
720	G A C C A C C T G G C T A A T A C T G A C A C T G G A G T G C G A A A G C C T G G G A G C A A A C A G U A T T A G A	45-16s.seq
720	G A C C A C C T G G C T A A T A C T G A C A C T G G A G T G C G A A A G C C T G G G A G C A A A C A G U A T T A G A	46-16s.seq

	T A C C C T G G T A G T C C A C G C C G T A A A C G A T G T C G A C T A G C C G T T G G G A T C C T T G A G A T C T T A	Majority
	790 800 810 820 830 840	
781	T A C C C T G G T A G T C C A C G C C G T A A A C G A T G T C G A C T A G C C G T T G G G A T C C T T G A G A T C T T A	44-165.seq
780	T A C C C T G G T A G T C C A C G C C G T A A A C G A T G T C G A C T A G C C G T T G G G A T C C T T G A G A T C T T A	45-165.seq
780	T A C C C T G G T A G T C C A C G C C G T A A A C G A T G T C G A C T A G C C G T T G G G A T C C T T G A G A T C T T A	46-165.seq
	G T G G G C A G C T A A C G C A T T A A G T C G A C C G C C T G G G G A G T A C G G C C G C A G G T T A A A C T C	Majority
	850 860 870 880 890 900	
941	G T G G G C A G C T A A C G C A T T A A G T C G A C C G C C T G G G G A G T A C G G C C G C A G G T T A A A C T C	44-165.seq
940	G T G G G C A G C T A A C G C A T T A A G T C G A C C G C C T G G G G A G T A C G G C C G C A G G T T A A A C T C	45-165.seq
940	G T G G G C A G C T A A C G C A T T A A G T C G A C C G C C T G G G G A G T A C G G C C G C A G G T T A A A C T C	46-165.seq
	A A A T G A A T T G A C G G G G C C C G C A C A A G C G G T T G G A G C A T G T G G T T T A A T T C G A A G C A C G C	Majority
	910 920 930 940 950 960	
901	A A A T G A A T T G A C G G G G C C C G C A C A A G C G G T T G G A G C A T G T G G T T T A A T T C G A A G C A C G C	44-165.seq
900	A A A T G A A T T G A C G G G G C C C G C A C A A G C G G T T G G A G C A T G T G G T T T A A T T C G A A G C A C G C	45-165.seq
900	A A A T G A A T T G A C G G G G C C C G C A C A A G C G G T T G G A G C A T G T G G T T T A A T T C G A A G C A C G C	46-165.seq
	G A G A A C C T T A C C A G C C C T T G A C A T G C A G A A C T T C C A G A G A T G G T G C C T T C G	Majority
	970 980 990 1000 1010 1020	
961	G A G A A C C T T A C C A G C C C T T G A C A T G C A G A A C T T T C C A G A G A T G G T G C C T T C G	44-165.seq
960	G A G A A C C T T A C C A G C C C T T G A C A T G C A G A A C T T T C C A G A G A T G G T G C C T T C G	45-165.seq
960	G A G A A C C T T A C C A G C C C T T G A C A T G C A G A A C T T T C C A G A G A T G G T G C C T T C G	46-165.seq
	G G A A C T C T G A C A C A G G T G C A T G G C T G T C A G C T C G T G T C G T G A G A T G T T G G G T T A	Majority
	1030 1040 1050 1060 1070 1080	
1021	G G A A C T C T G A C A C A G G T G C A T G G C T G T C A G C T C G T G T C G T G A G A T G T T G G G T T A	44-165.seq
1020	G G A A C T C T G A C A C A G G T G C A T G G C T G T C A G C T C G T G T C G T G A G A T G T T G G G T T A	45-165.seq
1020	G G A A C T C T G A C A C A G G T G C A T G G C T G T C A G C T C G T G T C G T G A G A T G T T G G G T T A	46-165.seq
	A G T C C C G T A A C G A G C C A A C C C T T G T C C T T A G T T A C C A G C A C G T T A A G G T G G G C A C T C T A	Majority
	1090 1100 1110 1120 1130 1140	
1081	A G T C C C G T A A C G A G C C A A C C C T T G T C C T T A G T T A C C A G C A C G T T A A G G T G G G C A C T C T A	44-165.seq
1080	A G T C C C G T A A C G A G C C A A C C C T T G T C C T T A G T T A C C A G C A C G T T A A G G T G G G C A C T C T A	45-165.seq
1080	A G T C C C G T A A C G A G C C A A C C C T T G T C C T T A G T T A C C A G C A C G T T A A G G T G G G C A C T C T A	46-165.seq
	A G G A G A C T G C C G G T G A C A A C C G G A G G A G T G G G G A T G G A C G T C A A G T C A T C A T G G C C C T	Majority
	1150 1160 1170 1180 1190 1200	
1141	A G G A G A C T G C C G G T G A C A A C C G G A G G A G T G G G G A T G G A C G T C A A G T C A T C A T G G C C C T	44-165.seq
1140	A G G A G A C T G C C G G T G A C A A C C G G A G G A G T G G G G A T G G A C G T C A A G T C A T C A T G G C C C T	45-165.seq
1140	A G G A G A C T G C C G G T G A C A A C C G G A G G A G T G G G G A T G G A C G T C A A G T C A T C A T G G C C C T	46-165.seq
	T A C G G C C T G G C C T A C A C A C G T G C T A C A A T G C C G G T A C A A G G T T G C C A A G C C C G C A G G	Majority
	1210 1220 1230 1240 1250 1260	
1201	T A C G G C C T G G C C T A C A C A C G T G C T A C A A T G C C G G T A C A A G G T T G C C A A G C C C G C A G G	44-165.seq
1200	T A C G G C C T G G C C T A C A C A C G T G C T A C A A T G C C G G T A C A A G G T T G C C A A G C C C G C A G G	45-165.seq
1200	T A C G G C C T G G C C T A C A C A C G T G C T A C A A T G C C G G T A C A A G G T T G C C A A G C C C G C A G G	46-165.seq
	T G G A G C T A A T C C C A T A A A C C G A T C G T A G T C C G G A T C G C A G T C T G C A A C T C G A C T G C G T G	Majority
	1270 1280 1290 1300 1310 1320	
1261	T G G A G C T A A T C C C A T A A A C C G A T C G T A G T C C G G A T C G C A G T C T G C A A C T C G A C T G C G T G	44-165.seq
1260	T G G A G C T A A T C C C A T A A A C C G A T C G T A G T C C G G A T C G C A G T C T G C A A C T C G A C T G C G T G	45-165.seq
1260	T G G A G C T A A T C C C A T A A A C C G A T C G T A G T C C G G A T C G C A G T C T G C A A C T C G A C T G C G T G	46-165.seq
	A A G T C G G A A T C C C T A G T A A T C G T G A A T C A G A A T G T C A C G G T G A A T A C G T C C C G G C C T T	Majority
	1330 1340 1350 1360 1370 1380	
1321	A A G T C G G A A T C C C T A G T A A T C G T G A A T C A G A A T G T C A C G G T G A A T A C G T C C C G G C C T T	44-165.seq
1320	A A G T C G G A A T C C C T A G T A A T C G T G A A T C A G A A T G T C A C G G T G A A T A C G T C C C G G C C T T	45-165.seq
1320	A A G T C G G A A T C C C T A G T A A T C G T G A A T C A G A A T G T C A C G G T G A A T A C G T C C C G G C C T T	46-165.seq
	G T A C A C A C C C C G T C A C A C C A T G G G A G T G G G T T G C C C A G A A G T A G T C T A A C C T T	Majority
	1390 1400 1410 1420 1430 1440	
1381	G T A C A C A C C C C G T C A C A C C A T G G G A G T G G G T T G C C C C A G A A G T A G C T A G T C T A A C C T T	44-165.seq
1380	G T A C A C A C C C C G T C A C A C C A T G G G A G T G G G T T G C C C C A G A A G T A G C T A G T C T A A C C T T	45-165.seq
1380	G T A C A C A C C C C G T C A C A C C A T G G G A G T G G G T T G C C C C A G A A G T A G C T A G T C T A A C C T T	46-165.seq
	C G G G G G A C G T T A C C A C G G A G T G A T T C A T G C A C T G G G T G A A G T C G T C A C A G G T A G C C G	Majority
	1450 1460 1470 1480 1490 1500	
1441	C G G G G G A C G T T A C C A C G G A G T G A T T C A T G A C T G G G G T G A A G T C G T A C A A G G T A G C C G	44-165.seq
1440	C G G G G G A C G T T A C C A C G G A G T G A T T C A T G A C T G G G G T G A A G T C G T A C A A G G T A G C C G	45-165.seq
1440	C G G G G G A C G T T A C C A C G G A G T G A T T C A T G A C T G G G G T G A A G T C G T A C A A G G T A G C C G	46-165.seq



4. Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *nifH* (*Pseudomonas*)

	T G C C G A T C C C G A A A G C G G A C T C C A C T C G C C T G A T C C T G C A C T C C A A G G C G C A G A A C A C C A T C	Majority
	10 20 30 40 50 60	
1	T T C C G A T C C C G A A A G C G G A C T C C A C T C G C C T G A T C C T G C A C T C C A A G G C G C A G A A C A C C A T C	44-nifH.seq
1	T T C C G A T C C C G A A A G C G G A C T C C A C T C G C C T G A T C C T G C A C T C C A A G G C G C A G A A C A C C A T C	45-nifH.seq
1	T T C C G A T C C C G A A A G C G G A C T C C A C T C G C C T G A T C C T G C A C T C C A A G G C G C A G A A C A C C A T C	46-nifH.seq
	A T G G A A A T G C C C G C G A G G C C G G T A C C G T G G A G A C T C G A G G A C C G T G C T C A A G	Majority
	70 80 90 100 110 120	
61	A T G G A A A T G C C C G C G A G G C C G G T A C C G T G G A G A C T C G A G G A C C G T G C T C A A G	44-nifH.seq
61	A T G G A A A T G C C C G C G A G G C C G G T A C C G T G G A G A C T C G A G G A C C G T G C T C A A G	45-nifH.seq
61	A T G G A A A T G C C C G C G A G G C C G G T A C C G T G G A G A C T C G A G G A C C G T G C T C A A G	46-nifH.seq
	A C C G G C T A C G C C G A C A T C A A G T G C C T C A G T C G G C C G G T C C G G A G C C G G C G T G G C C T G C	Majority
	130 140 150 160 170 180	
181	A C C G G C T A C G C C G A C A T C A A G T G C C T C A G T C G G C C G G T C C G G A G C C G G C G T G G C C T G C	44-nifH.seq
181	A C C G G C T A C G C C G A C A T C A A G T G C C T C A G T C G G C C G G T C C G G A G C C G G C G T G G C C T G C	45-nifH.seq
181	A C C G G C T A C G C C G A C A T C A A G T G C C T C A G T C G G C C G G T C C G G A G C C G G C G T G G C C T G C	46-nifH.seq
	G C C G G T C G C G C C G T G A T C A C C G C G A T C A A C T T C C T C G A A G A G A G C C C T A C G A G G A T	Majority
	190 200 210 220 230 240	
181	G C C G G T C G C G C C G T G A T C A C C G C G A T C A A C T T C C T C G A A G A G A G C C C T A C G A G G A T	44-nifH.seq
181	G C C G G T C G C G C C G T G A T C A C C G C G A T C A A C T T C C T C G A A G A G A G C C C T A C G A G G A T	45-nifH.seq
181	G C C G G T C G C G C C G T G A T C A C C G C G A T C A A C T T C C T C G A A G A G A G C C C T A C G A G G A T	46-nifH.seq
	G A C C T G G A C T T C G T T T C T A C G A C G T G C T C G G C G A C G T G G T C T G T G G C C G C T T C G C C A T G	Majority
	250 260 270 280 290 300	
241	G A C C T G G A C T T C G T T T C T A C G A C G T G C T C G G C G A C G T G G T C T G T G G C C G C T T C G C C A T G	44-nifH.seq
241	G A C C T G G A C T T C G T T T C T A C G A C G T G C T C G G C G A C G T G G T C T G T G G C C G C T T C G C C A T G	45-nifH.seq
241	G A C C T G G A C T T C G T T T C T A C G A C G T G C T C G G C G A C G T G G T C T G T G G C C G C T T C G C C A T G	46-nifH.seq
	C C C A T C C G C G A G A A C A A G G C C C A A G G A G A T C T A C G T G G T C T G C T C C G G C G A A T G A T G C C G	Majority
	310 320 330 340 350 360	
301	C C C A T C C G C G A G A A C A A G G C C C A A G G A G A T C T A C G T G G T C T G C T C C G G C G A A T G A T G C C G	44-nifH.seq
301	C C C A T C C G C G A G A A C A A G G C C C A A G G A G A T C T A C G T G G T C T G C T C C G G C G A A T G A T G C C G	45-nifH.seq
301	C C C A T C C G C G A G A A C A A G G C C C A A G G A G A T C T A C G T G G T C T G C T C C G G C G A A T G A T G C C G	46-nifH.seq
	A T	Majority
361	A T	44-nifH.seq
361	A T	45-nifH.seq
361	A T	46-nifH.seq







**7. Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *dnaK* (*Pseudomonas*)**

		A T C G A G A A G A A C A C C A C C A T C C C G A C C A A G A A G T C C A G G T G T T C C A C T G C C G A C G A C			Majority	
		10 20 30 40 50 60				
1		A T C G A G A A G A A C A C C A C C A T C C C G A C C A A G A A G T C C A G G T G T T C C A C T G C C G A C G A C				44-dnaK.seq
1		A T C G A G A A G A A C A C C A C C A T C C C G A C C A A G A A G T C C A G G T G T T C C A C T G C C G A C G A C				45-dnaK.seq
1		A T C G A G A A G A A C A C C A C C A T C C C G A C C A A G A A G T C C A G G T G T T C C A C T G C C G A C G A C				46-dnaK.seq
		A A C C A G A G C C C C G T G A C C A T T C A C G T G C T G C A G G G T G A G C G T A A G C A G C T G C C G A G A C			Majority	
		70 80 90 100 110 120				
61		A A C C A G A G C C C C G T G A C C A T T C A C G T G C T G C A G G G T G A G C G T A A G C A G C T G C C G A G A C				44-dnaK.seq
61		A A C C A G A G C C C C G T G A C C A T T C A C G T G C T G C A G G G T G A G C G T A A G C A G C T G C C G A G A C				45-dnaK.seq
61		A A C C A G A G C C C C G T G A C C A T T C A C G T G C T G C A G G G T G A G C G T A A G C A G C T G C C G A G A C				46-dnaK.seq
		A A G T C C C T G C C G T C C C T T C G A T C T G G C C C G A G A T T C C C C C C C C C C C C C C C C A T G C C C G A C G			Majority	
		130 140 150 160 170 180				
121		A A G T C C C T G C C G T C C C T T C G A T C T G G C C C G A G A T T C C C C C C C C C C C C C C C C A T G C C C G A C G				44-dnaK.seq
121		A A G T C C C T G C C G T C C C T T C G A T C T G G C C C G A G A T T C C C C C C C C C C C C C C C C A T G C C C G A C G				45-dnaK.seq
121		A A G T C C C T G C C G T C C C T T C G A T C T G G C C C G A G A T T C C C C C C C C C C C C C C C C A T G C C C G A C G				46-dnaK.seq
		A T C G A A G T C A C C T T C G A T A T T G A C C C C A A C C G C A T C C T G C A C G T G T C T G C C A A G C A C A A G			Majority	
		190 200 210 220 230 240				
181		A T C G A A G T C A C C T T C G A T A T T G A C C C C A A C C G C A T C C T G C A C G T G T C T G C C A A G C A C A A G				44-dnaK.seq
181		A T C G A A G T C A C C T T C G A T A T T G A C C C C A A C C G C A T C C T G C A C G T G T C T G C C A A G C A C A A G				45-dnaK.seq
181		A T C G A A G T C A C C T T C G A T A T T G A C C C C A A C C G C A T C C T G C A C G T G T C T G C C A A G C A C A A G				46-dnaK.seq
		G C C A C T G G C A A G C A G C A G T C C A T C C T G A T C			Majority	
		250 260 270				
241		G C C A C T G G C A A G C A G C A G T C C A T C C T G A T C				44-dnaK.seq
241		G C C A C T G G C A A G C A G C A G T C C A T C C T G A T C				45-dnaK.seq
241		G C C A C T G G C A A G C A G C A G T C C A T C C T G A T C				46-dnaK.seq



**ΠΑΡΑΤΗΜΑ Ε΄**

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΩΝ ΑΠΟΣΤΑΣΕΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ  
ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ**

**1. Εκτίμηση εξελικτικής απόστασης των ακολουθιών για το γονίδιο 16S  
rRNA (*Azospirillum*)**

Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8		
1	█	99.9	96.4	99.2	99.0	96.3	99.8	98.5	1	22-16s.seq
2	0.1	█	96.3	99.1	99.0	96.3	99.7	98.5	2	23-16s.seq
3	3.7	3.8	█	96.6	96.5	97.8	96.2	95.9	3	24-16s.seq
4	0.8	0.9	3.5	█	99.7	96.5	99.0	98.0	4	29-16s.seq
5	1.0	1.0	3.6	0.3	█	96.4	98.8	97.9	5	30-16s.seq
6	3.8	3.8	2.3	3.6	3.7	█	96.1	96.7	6	35-16s.seq
7	0.2	0.3	3.9	1.0	1.2	4.0	█	98.3	7	37-16s.seq
8	1.5	1.5	4.3	2.0	2.2	3.4	1.7	█	8	42-16s.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8		

**2. Εκτίμηση εξελικτικής απόστασης των ακολουθιών για το γονίδιο 16S  
rRNA (*Pseudomonas*)**

Percent Identity

	1	2	3		
1	█	99.9	99.7	1	44-16s.seq
2	0.1	█	99.7	2	45-16s.seq
3	0.3	0.3	█	3	46-16s.seq
	1	2	3		

3. Εκτίμηση εξελικτικής απόστασης των ακολουθιών για το γονίδιο *nifH*  
(*Azospirillum*)

Percent Identity										
	1	2	3	4	5	6	7	8		
1	█	98.6	93.6	98.3	98.9	93.9	98.6	97.8	1	22-nifH.seq
2	1.4	█	93.6	97.8	98.6	93.9	97.8	97.8	2	23-nifH.seq
3	6.7	6.7	█	93.6	94.2	97.8	93.9	93.6	3	24-nifH.seq
4	1.7	2.3	6.7	█	97.8	93.9	97.5	98.9	4	29-nifH.seq
5	1.1	1.4	6.1	2.3	█	93.9	98.1	97.8	5	30-nifH.seq
6	6.4	6.4	2.3	6.4	6.4	█	94.2	93.9	6	35-nifH.seq
7	1.4	2.3	6.4	2.5	2.0	6.1	█	96.9	7	37-nifH.seq
8	2.3	2.3	6.7	1.1	2.3	6.4	3.1	█	8	42-nifH.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8		

4. Εκτίμηση εξελικτικής απόστασης των ακολουθιών για το γονίδιο *nifH*  
(*Pseudomonas*)

Percent Identity					
	1	2	3		
1	█	99.4	100.0	1	44-nifH.seq
2	0.6	█	99.4	2	45-nifH.seq
3	0.0	0.6	█	3	46-nifH.seq
	1	2	3		

5. Εκτίμηση εξελικτικής απόστασης των ακολουθιών για το γονίδιο *ipdC*

Percent Identity								
	1	2	3	4	5	6		
1	█	99.6	98.4	98.1	97.9	96.5	1	22-ipdC.seq
2	0.4	█	98.4	98.0	97.8	96.4	2	23-ipdC.seq
3	1.6	1.7	█	97.5	98.2	96.5	3	24-ipdC.seq
4	1.9	2.0	2.5	█	96.9	96.7	4	30-ipdC.seq
5	2.1	2.2	1.8	3.1	█	95.8	5	37-ipdC.seq
6	3.6	3.7	3.6	3.4	4.4	█	6	42-ipdC.seq
	1	2	3	4	5	6		

**6. Εκτίμηση εξελικτικής απόστασης των ακολουθιών για το γονίδιο *dnaK* (*Azospirillum*)**

Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8		
<b>1</b>	█	98.5	88.7	96.3	96.0	88.7	97.2	98.2	<b>1</b>	22-dnaK.seq
<b>2</b>	1.5	█	89.9	96.0	96.3	89.9	96.3	97.2	<b>2</b>	23-dnaK.seq
<b>3</b>	12.3	10.8	█	89.9	89.9	97.9	88.7	89.3	<b>3</b>	24-dnaK.seq
<b>4</b>	3.8	4.1	10.8	█	99.4	89.9	96.3	96.9	<b>4</b>	29-dnaK.seq
<b>5</b>	4.1	3.8	10.8	0.6	█	89.9	96.0	96.6	<b>5</b>	30-dnaK.seq
<b>6</b>	12.3	10.8	2.2	10.8	10.8	█	88.7	89.3	<b>6</b>	35-dnaK.seq
<b>7</b>	2.8	3.8	12.3	3.8	4.1	12.3	█	99.1	<b>7</b>	37-dnaK.seq
<b>8</b>	1.9	2.8	11.6	3.1	3.4	11.5	0.9	█	<b>8</b>	42-dnaK.seq
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>		

**7. Εκτίμηση εξελικτικής απόστασης των ακολουθιών για το γονίδιο *dnaK* (*Pseudomonas*)**

Percent Identity

	1	2	3		
<b>1</b>	█	100.0	100.0	<b>1</b>	44-dnaK.seq
<b>2</b>	0.0	█	100.0	<b>2</b>	45-dnaK.seq
<b>3</b>	0.0	0.0	█	<b>3</b>	46-dnaK.seq
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		

**5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Achouak, W., Normand, P. and Heulin, T. (1999). Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the *Bacillaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49: 961-967.
- Ahn, Y. H. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochemistry*, 41: 1709–1721.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Amy, P. S., Haldeman, D. L., Ringelberg, D., Hall, D. H. and Russell, C. (1992). Comparison of identification systems for classification of bacteria isolated from water and endolithic habitats within the deep subsurface. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3367-3373.
- An, Q., Dong, Y., Wang, W., Li, Y. and Li, J. (2007). Constitutive expression of the *nifA* gene activates associative nitrogen fixation of *Enterobacter gergoviae* 57-7, an opportunistic endophytic diazotroph. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 613-620.
- Ash, C., Priest, F. G. and 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 van Leeuwenhoek*, 64: 253-260.

- Atlas, R. M. and Bartha, R. (1993). *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications* (3<sup>rd</sup> edn). Reading: Addison-Wesley.
- Baca, B. E. and Elmerich, C. (2007). Microbial production of plant hormones. In: C., Elmerich and W. E., Newton (Ed.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, 113-143.
- Bahkrouf, A., Gauthier, M. J., Jeddi, M. and Boudabbous, A. (1988). Starvation survival of *Pseudomonas aeruginosa* in seawater before and after adaptation to salinity. *Letters in Applied Microbiology*, 7: 59-62.
- Bailey, J. E. and Ollis, D. F. (1986). *Biochemical engineering fundamentals* (2<sup>nd</sup> edn.). Singapore, UK: McGraw- Hill International Ltd.
- Baldani, J. L. and Baldani, V. L. D. (2005). History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 77(3): 549-579.
- Baldani, J. L., Krieg, N. R., Baldani, V. L. D., Hartmann, A. and Döbereiner, J. (2005). Genus II *Azospirillum* Tarrand, Krieg and Döbereiner 1979, 978. In: G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn. (pp. 7-26). New York: Springer-Verlag
- Bally, R. and Elmerich, C. (2007). Biocontrol of Plant Diseases by Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria. In: C. Elmerich and W. E. Newton (Ed.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, 171-190.
- Barassi, C. A., Sueldo, R. J., Creus, C. M., Carrozzi, L. E., Casanovas, E. M. and Pereyra, M. A. (2007). *Azospirillum* spp., a dynamic soil bacterium favourable to vegetable crop production. *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, 1(2): 68-82.
- Bashan, Y. and Holguin, G. (1997). *Azospirillum*-plant relationships: environmental

- and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 103-121.
- Bashan, Y., Holguin, G., and Bashan, L. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 521–577.
- Bastolla, U., Lässig, M., Manrubia, S. C. and Valleriani, A. (2005). Biodiversity in model ecosystems, I: coexistence conditions for competing species. *Journal of Theoretical Biology*, 235(4): 521–530.
- Bazylnski, D. A., Dean, A. J., Schüler, D., Phillips, E. J. P. and Lovley, D. R. (2000). N<sub>2</sub>-dependent growth and nitrogenase activity in the metal-metabolizing bacteria, *Geobacter* and *Magnetospirillum* species. *Environmental Microbiology*, 2(3): 266-273.
- Becking, J. H. (2006a). The Genus *Beijerinckia*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer. and E. Stackebrandt (Ed.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> edn. (pp. 151-162). New York: Springer-Verlag.
- Becking, J. H. (2006b). The Genus *Beijerinckia*. In: M. Dworkin, S. Falko, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Ed.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> edn. (pp. 751-757). New York: Springer-Verlag.
- Below, E. F. (1995). Nitrogen Metabolism and Crop Productivity. In: M. Pessarakli (Ed.), *Handbook of plant and crop physiology* (pp. 275-301). New York: Marcell Dekker, Inc.
- Ben Dekhil, S., Cahill, M., Stackebrandt, E. and Sly, L. I. (1997). Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largimobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 20:

72-77.

- Beneduzi, A., Peres, D., Da Costa, P. B., Zanettini, M. B. and Passaglia, L. P. (2008). Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting *bacilli* isolated from wheat fields in southern Brazil. *Research in Microbiology*, 159: 244-250.
- Benson, D. R. and Clawson, M. L. (2000). Evolution of the actinorhizal plant nitrogen-fixing symbiosis. In: E. Triplett (Ed.), *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process* (pp. 207-224). Wymondham, England: Horizon Scientific Press.
- Benson, D. R. and Silvester, W. B. (1993). Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiology Reviews*, 57: 293-319.
- Berge, O., Guinebretière, M. H., Achouak, W., Normand, P. and Heulin, T. (2002). *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 607-616.
- Berge, O., Heulin, T. and Balandreau, J. (1991). Diversity of diazotroph populations in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) growing on different French soils. *Biology and Fertility of Soils*, 11: 210-215.
- Betancourt, D. A., Loveless, T. M., Brown, J. W. and Bishop, P. E. (2008). Characterization of diazotrophs containing Mo-independent nitrogenases, isolated from diverse natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11): 3471-3480.
- Bhattacharjee, R. B. and Singh, A. (2008). Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80:199-209.
- Blaha, D., Prigent-Comparet, C., Mizra, M. S. and Moenne-Loccoz, Y. (2006).

- Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, 56: 455-470.
- Boucher, Y., Douady, C. J., Papke, R. T., Walsh, D. A., Boudreau, M. R., Nesbø, C. L., Case, R. J. and Doolittle, W. F. (2003). Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups. *Annual Review of Genetics*, 37: 283-328.
- Bowman, J. (2005). Genus V. *Methylomonas* (Whittenburry and Krieg 1984a, 260). In: G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn. (pp. 265-268). New York: Springer-Verlag.
- Bowman, J. (2006). Genus V. *Methylomonas* (Whittenburry and Krieg 1984a, 260). In: G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn. (pp. 266-289). New York: Springer-Verlag.
- Brenner, D. J. and Farmer, J. J. (2005). Family I. *Enterobacteriaceae* Rahn 1937. In: G. Garrity, D. J. Brenner, N. R., Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn., (pp. 587-607). New York: Springer –Verlag.
- Brock. (2005). *Βιολογία των μικροοργανισμών*. Τόμος Ι. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Bruce, L. C., Hamilton, D., Imberger, J., Gal, G., Gophen, M., Zohary, T. and Hambright, K. D. (2006). A numerical simulation of the role of zooplankton in C, N and P cycling in Lake Kinneret. *Ecological Modeling*, 193: 412-436.
- Brundrett, M. C. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Review*, 79: 473-495.
- Burgess, B. K. and Lowe, D. J. (1996). Mechanism of molybdenum nitrogenase.



*Chemical Reviews*, 96: 2983-3011.

Busse, H. and Stolz, A. (2006). *Achromobacter*, *Alcaligenes* and related genera. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Ed.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> edn. (pp. 675-700). New York: Springer-Verlag.

Cacciari, I., Del Gallo, M., Ippoliti, S., Lippi, D., Pietrosanti, T. and Pietrosanti, W. (1986). Growth and survival of *Azospirillum brasilense* and *Arthrobacter giacomelloi* in binary continuous culture. *Plant and Soil*, 90: 107-116.

Chapelle, A., Ménesguen, A., Deslous-Paoli, J. M., Souchu, P., Mazouni, N., Vaquer, A. and Millet, B. (2000). Modelling nitrogen, primary production and oxygen in Mediterranean lagoon. Impact of oysters farming and inputs from the watershed. *Ecological Modelling*, 127: 161-181.

Chen, W. M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Be'na, G. and Boivin-Masson, C. (2003). Legume symbiotic nitrogen fixation by  $\beta$ -Proteobacteria is widespread in nature. *Journal of Bacteriology*, 7266-7272.

Cheng, Q. (2008). Perspectives in biological nitrogen fixation research. *Journal of integrative Plant Biology*, 50(7): 786-798.

Chien, Y., Auerbuch, V., Brabban, A. D. and Zinder, S. (2000). Analysis of genes encoding an alternative nitrogenase in the archaeon *Methanosarcina barkeri* 227. *Journal of Bacteriology*, 182(11): 3247-3253.

Chisnell, J. R., Premakumar, R. and Bishop P. E. (1988). Purification of a second alternative nitrogenase from a *nifHDK* deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 170(1): 27-33.

Choo, Q., Samian, M. and Najimudin, N. (2003). Phylogeny and characterization of three *nifH*-homologous genes from *Paenibacillus azotofixans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (6): 3658-3662.

- Christian, R. R., Forés, E., Comin, F., Viaroli, P., Naldi, M. and Ferrari, I. (1996). Nitrogen cycling networks of coastal ecosystems: influence of trophic status and primary producer form. *Ecological Modelling*, 87: 111-129.
- Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. and Lim, Y. W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2259-2261.
- Clerc, A., Manceau, C. Nesme, X. (1998). Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1180-1187.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Barka, E. A. (2005). Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4951-4959.
- Corbeels, M., McMurtrie, R. E., Pepper, D. A. and O'Connell, A. M. (2005). A process-based model of nitrogen cycling in forest plantations. Part II. Simulating growth and nitrogen mineralization of Eucalyptus globulus plantations in south-western Austral. *Ecological Modelling*, 187(4): 449-474.
- Crawford, M. N. and Glass, D. M. A. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 3: 389-395.
- Creus, C.M., Graziano, M., Casanovas, E. M., Pereyra, M. A., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Barassi, C. A. and Laratima, L. (2005). Nitric oxide is involved in the Azospirillum brasilense-induced lateral root formation in tomato. *Planta*, 221: 297-303.
- Criminger, J. D., Hazen, T. H., Sobczyk, P. A. and Lovell, C. R. (2007). Nitrogen

- fixation by *Vibrio parahaemolyticus* and its implications for a new ecological niche. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18): 5959-5961.
- De Meyer, G. and Hofte, M. (1997). Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology*, 87: 588-593.
- De Vos, P. and De Lay, J. (1983). Intra- and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(3): 487-509.
- De Vos, P., Goor, M., Gillis, M. and De Lay, J. (1985) .Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of phytopathogenic *Pseudomonas* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35(2): 169-184.
- Ding, Y., Wang, J., Liu, Y. and Chen, S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing *bacilli* from plant rizospheres in Beijing region. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 1271-1281.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzales, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J. F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S. and Okon, Y. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 871-879.
- Dobbelaere, S. and Okon, Y. (2007). The plant growth-promoting effect and plant responses. In: C. Elmerich and W. E. Newton (Ed.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, 145-170.
- Döbereiner, J. and Day, J. M. (1976). Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: W. E. Newton, C. J. Nyman (Ed.), *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on N<sub>2</sub> Fixation*. Pullman, Washington: State University Press.

- Eady, R. R. (1991). The dinitrogen-fixing bacteria. In: A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (Ed.), *The Prokaryotes* (pp. 534-553). New York: Springer-Verlag.
- Eady, R. R. (1996). Structure–function relationships of alternative nitrogenases. *Chemical Reviews*, 96: 3013-3030.
- Eckert, B., Weber, O. B., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M. and Hartmann, A. (2001). *Azospirillum doebereinae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:17-26.
- Ekelund, F., Rønn, R., Griffiths, B. S. (2001). Quantitative estimation of flagellate community structure and diversity in soil samples. *Protist*, 152: 301-314.
- Elo, S., Suominen, I., Kampfer, P., Juhanoja, J., Salkinoja-Salonen, M. and Haahtela, K. (2001). *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 535–545.
- Elmerich, C. (2007). Historical perspective: from bacterization to endophytes. In: C. Elmerich and W. E. Newton (Ed.), *Assosiative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, 1-20.
- Elomari, M., Coroler, L., Izard, D. and Leclerc, H. (1995). A numerical taxonomic study of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters. *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 71-81.
- Enkh-Amgalan, J., Kawasaki, H., Oh-oka, H. and Seki, T. (2006). Cloning and characterization of a novel gene in nitrogen fixation in *Heliobacterium chlorum*: a possible regulatory gene. *Archives of Microbiology*, 186: 327-337.
- Eriksson, J. A., Nyborg, C. A., Johnson, J. L., Truscott, S. M., Gunn, A., Nordmeyer,

- F. R. and Watt, G. D. (1999). Enhanced efficiency of ATP hydrolysis during nitrogenase catalysis utilizing reductants that form the all-ferrous redox state of the Fe protein. *Biochemistry*, 38: 14279-14285.
- Euzéby, J. P. (1997). List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2): 590-592. (List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Last full update on *January 12, 2011* by <http://www.bacterio.net>).
- Evans, H. J. and Burris, R. (1992). Highlights in biological nitrogen-fixation during the last 50 years. In: G. Stacey, R. H. Burris and H. J. Evans (Ed.), *Biological Nitrogen Fixation* (pp. 1-42). New York: Chapman and Hall.
- Falkovski, P. G. (1997) Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO<sub>2</sub> in the ocean. *Nature*, 387: 272-275.
- Farmer, J. J. III, Janda, M., Brenner, W. F., Cameron, D. N. and Birkhead, K. M. (2005). Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411<sup>AL</sup>. In: G. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn. (pp. 494-546). New York: Springer-Verlag.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Flores-Mireles, A. L., Winans, S. C. and Holguin, G. (2007). Molecular characterization of diazotrophic and denitrifying bacteria associated with mangrove roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22): 7308-7321.
- Foster, L. J. R., Kwan, B. H. and Vancov, T. (2004). Microbial degradation of the organophosphorous pesticide, Ethion. *FEMS Microbiology Letters*, 240(1): 49-53.
- Forde, G. B. (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation.

*Review. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465: 219-235.

Fuentes-Ramirez, L. E. and Caballero-Mellado, J. (2005). Bacterial biofertilizers. In: Z. A. Siddiqui (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 143-172.

Fouts , D. E., Tyler, H. L., Deboy, R. T., Daugherty, S., Ren, Q., Badger, J. H., Durkin, A. S., Huot, H., Shrivastava, S., Kothari, S., Dodson, R. J., Mohamound, Y., Khouri, H., Roesch, L. F. W., Krogfelt, K. A., Struve, C., Triplett, E. W. and Methé, B. A. (2008). Complete genome sequence of the N<sub>2</sub>-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneuminiae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genetics*, 4(7): e10000141.

Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S. Balch, W. E., Tanner, R. S., Magrum, L. J., Jeblen, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B. J., Stahl, D. A., Luehrsen, K. R., Chen, K. N., and Woese, C. R. (1980). The phylogeny of procaryotes. *Science*, 209: 457-463.

Franche, C., Lindström, K. and Elmerich, C. (2008). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*. Published on line on *December 03, 2008* as doi 10.1007/s11104-008-9833-8.

Fritzsche, C. and Niemann, E. G. (1990). Nitrogen fixation in continuous culture with NH<sub>4</sub>Cl-containing media. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1160-1161.

Fritzsche, C., Ueckert, J. and Niemann, E. J. (1990). Growth parameters of microaerobic diazotrophic rhizobacteria determined in continuous culture. In: M. Polsinelli, R. Materassi and M. Vincenzini (Ed.), *Nitrogen Fixation* (pp. 232-234). Dordrecht, Boston, London: Kluwer. Academic Publishers.

Galli, E. (1994). The role of microorganisms in the environment decontamination. In: A. Renzoni, N. Mattei, L. Lari and M. C. Fossi (Ed.), *Contaminants in the*

*Environment* (pp.235-246). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press Inc.

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Inanyi, I., Appel, R. D. and Bairoch, A. (2003). ExPaSy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31: 3784-3788.

Geuenich, H. H., Muller, H. E. (1984). Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in wastewater and behavior under biological treatment. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene [B]*, 179: 259-265.

Gibson, G. R. (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 69: 769-797.

Gioia, J., Yerrapragada, S., Qin, X., Jiang, H., Igboeli, O. C., Muzny, D., Dugan-Rocha, S., Ding, Y., Hawes, A., Liu, W., Perez, L., Kovar, C., Dinh, H., Lee, S., Nazareth, L., Blyth, P., Holder, M., Buhay, C., Tirumalai, M. R., Liu, Y., Dasgupta, I., Bokhetache, L., Fujita, M., Karouia, F., Moorthy, P. E., Siefert, J., Uzman, A., Buzumbo, P., Verma, A., Zwiya, H., McWilliams, B. D., Olowu, A., Clinkenbeard, K. D., Newcombe, D., Golebiewski, L., Petrosino, J. F., Nicholson, W. L., Fox, G. E., Venkateswaran, K., Highlander, S. K. and Weinstock, G. M. (2007). Paradoxical DNA repair and peroxide resistance gene conservation in *Bacillus pumilus* SAFR-032. *PLoS One*, 2(9): e928.

Glass, D. M. A., Britto, T. D., Kaiser, N. B., Kinghorn, R. J., Kronzucker, J. H., Kumar, A., Okamoto, M., Rawat, S., Siddiqi, Y. M., Unkles, E. S. and Vidmar J. J. (2002). The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 855–864.

Govindarajulu, M., Pfeffer, P. E., Jin, H., Abubacer, J., Douds, D. D., Allen J. W., Bucking H., Lammers P. J. and Shachan-Hill, Y. (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 435: 819-823.

Grau, F. H. and Wilson, P. W. (1962). Physiology of nitrogen-fixation by *Bacillus*

- polymyxa*. *Journal Bacteriology*, 83(3): 490-496.
- Grimont, P. A. D. and Grimont, F. (2005a). Genus XII. *Enterobacter* Hormaeche and Edwards 1960b, 72<sup>AL</sup>. In: G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn. (pp. 661-669). New York: Springer-Verlag.
- Grimont, P. A. D. and Grimont, F. (2005b). Genus XVI. *Klebsiella* Trevisan 1885, 105<sup>AL</sup>. In: G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn. (pp. 685-693). New York: Springer-Verlag.
- Grimont, P. A. D. and Grimont, F. (2005c). Genus XXIII. *Pantoea* Gavini, Mergaert, Beji, Mielcarek, Izard, Kersters and De Ley 1989b, 343<sup>VP</sup>. In: G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn. (pp. 713-720). New York: Springer-Verlag.
- Grimont, P. A. D. and Grimont, F. (2005d). Genus XXXIV. *Serratia* Bizio 1823, 288<sup>AL</sup>. In: G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn. (pp. 799-811). New York: Springer-Verlag.
- Gupta, R. S. (2000). The phylogeny of Proteobacteria: relationships to others eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 367-402.
- Gupta, R. S. (2001). The branching order and phylogenetic placement of species from completed bacterial genomes, based on conserved indels found in various proteins. *International Microbiology*, 4: 187-202.
- Gyaneshwar, P., James, E. K., Mathan, P. M., Reinhold-Hurek, B. and Ladha, J. K. (2001). Endophytic colonization of rice by a diazotrophic starin of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 183: 2634-2645.



- Haase, A., Melder, A., Smith-Vaughan, H., Kemp, D. and Currie, B. (1995a). RAPD analysis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from patients with recurrent melioidosis. *Epidemiology and Infection*, 115: 115-121.
- Halbleib, C. M. and Ludden, P. W. (2000). Regulation of biological nitrogen-fixation. *Journal of Nutrition*, 130: 1081-1084.
- Hales, B. J, Case, E. E, Morningstar, J. E., Dzeda, M. F. and Mauterer, L. A. (1986). Isolation of a new vanadium-containing nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*, 25(23): 7251–7255.
- Handelsman, J., & Stabb, E. V. (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell*, 8(10): 1855-1869.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S. and Van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10): 463-471.
- Hartmann, A. and Baldani, J. I. (2006). The Genus *Azospirillum*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and Stackebrandt E. (Ed.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> edn. (pp. 115-140). New York: Springer-Verlag.
- Haselkorn, R. (2007). Heterocyst differentiation and nitrogen fixation in *Cyanobacteria*. In: C. Elmerich and W. E. Newton (Ed.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, 233-255.
- Hashimoto, J. G., Stevenson, B. S. and Schmidt, T. M. (2003). Rates and consequences of recombination between rRNA operons. *Journal of Bacteriology*, 185(3): 966-972.
- Hayaishi, O. (1996). Discovery of Oxygenases in Pseudomonads. pp. 3-7. In: T. Nakarawa, K. Furukawa, D. Haas and Silver S. (Ed.), *Molecular Biology of Pseudomonads* (pp. 3-7). Washington D.C., USA: ASM Press.

- Hayaishi, O. and Hashimoto, Z. (1950). Pyrocatechase. A new enzyme catalyzing oxidative breakdown of pyrocatechin. *Journal of Biochemistry*, 37: 317-374.
- Heldt, H. W. (1999). *Plant biochemistry and molecular biology* (pp. 278-288). Oxford University Press.
- Henson, B. J., Watson, L. E. and Barnum, S. R. (2004). The evolutionary history of nitrogen fixation, as assessed by *nifD*. *Journal of Molecular Evolution*, 58: 390-399.
- Heulin, T., Berge, O., Mavingui, P., Gouzou, L., Hebbbar, K. P. and Balandreau, J. (1994). *Bacillus polymyxa* and *Rhizobium aquantilis*, the dominant N<sub>2</sub>-fixing bacteria associated with wheat rhizosphere in French soils. *European Journal of Soil Biology*, 30: 35-42.
- Holguin, G. and Glick, B. R. (2003). Transformation of *Azospirillum brasilense* Cd with an ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 fused to the Tetr gene promoter improves its fitness and plant growth promoting ability. *Microbial Ecology*, 46: 122-133.
- Holguin, G., Guzman, M. A. and Bashan, Y. (1992). Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiology Ecology*, 101: 207-216.
- Holguin, G., Patten, C. L., and Glick, B. R. (1999). Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. *Biology and Fertility of Soils*, 29: 10-23.
- Holmes, D. E., Nevin, K. P. and Lovley, D. R. (2004). In situ expression of *nifD* in *Geobacteraceae* in subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12): 7251-7259.
- Holmes, D. S. and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of

- bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114: 193-197.
- Hsu, S. F. and Buckley, D. H. (2009). Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. *ISME Journal*, 3: 124-136.
- Hubbell, D. H. and Kidder, G. (2003). Biological nitrogen fixation. University of Florida IFAS Extension SL16, USA.
- Hurek, T., Handley, L. L., Reinhold-Hurek, B. and Piché, Y. (2002). *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15 (3): 233–242.
- Hurek, T. and Reinhold-Hurek, B. (2003). *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *Journal of Bacteriology*, 106: 169-178.
- Hurek, T., Reinhold, B. and Niemann, E. G. (1987). Effect of oxygen on  $\text{NH}_4^+$ -grown continuous cultures of *Azospirillum* spp. and diazotrophic rods closely associated with Kallar grass. *Canadian Journal of Microbiology*, 33: 919–922.
- Ikeda, E., Andou, S., Iwama, U., Kato, C., Horikoshi, K. and Tamegai, H. (2009). Physiological roles of two dissimilatory nitrate reductases in the deep-sea denitrifier *Pseudomonas* sp. strain MT-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73 (4): 896-900.
- Imhoff, J. F. (2005). Genus I. *Ectothiorhodospira* Pelsh 1936, 120<sup>AL</sup>. In: G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn. (pp. 43-48). New York: Springer-Verlag..
- Imhoff, J. F. (2006). The phototropic Betaproteobacteria. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Ed.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> edn. (pp. 593-601). New York: Springer-Verlag.
- Janda, J. M. and Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial

- identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9): 2761-2764.
- Jenkinson, S. D. (2001). The impact of humans on the nitrogen cycle, with focus on temperate arable agriculture. *Plant and Soil*, 228: 3-15.
- Jin, H. J., Lv, J. and Chen, S. F. (2010). *Paenibacillus sophorae* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Sophora japonica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Published online ahead of print on April 30, 2010 as doi:10.1093/ijs/0.021709-0.
- Jones, D. L. and Hinsinger, P. (2008). The rhizosphere: complex by design. *Plant and Soil*, 312: 1-6.
- Jung, S., Lee, M., Oh, T. and Yoon, J. (2007). *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2284-2288.
- Kechris, K. J., Lin, J. C., Bickel, P. J. and Glazer, A. N. (2006). Quantitative exploration of the occurrence of lateral gene transfer by using nitrogen fixation genes as a case study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 123(25): 9584-9589.
- Kefalogianni, I. and Aggelis, G. (2002). Modelling growth and biochemical activities of *Azospirillum* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 352-357.
- Kelly, D. P. and Wood, A. P. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 511-516.
- Kelly, D. P. and Wood, A. P. (2005). Genus I. *Acidithiobacillus* Kelly and Wood

- 2000, 513<sup>VP</sup>. In: G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn. (pp. 60-62). New York: Springer-Verlag.
- Kennedy, C and Bishop, P. (2004). Genetics of nitrogen fixation and related aspects of metabolism in species of *Azotobacter*: history and Current Status. In: W. Klipp, B. Masepohl, J.R. Gallon and W. E. Newton (Ed.), *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria*, 27-52.
- Kennedy, C., Rudnick, P., MacDonald, M. L. and Melton, T. (2003). Genus *Azotobacter*. In: G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume II, *The proteobacteria*. New York: Springer-Verlag.
- Kennedy, C., Rudnick, P., MacDonald, M. L. and Melton, T. (2005). Genus III. *Azotobacter* Beijerinck 1901, 567<sup>AL</sup>. In: G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn. (pp. 384-402). New York: Springer-Verlag.
- Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. M. A. and Kecskés, M. L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1229-1244.
- Kercher, J. R. and Chambers, J. Q. (2001). Parameter estimation for a global model of terrestrial biogeochemical cycling by an iterative method. *Ecological Modelling*, 139: 137-175.
- Kessler, P. S., Bank, C. and Leigh, J. A. (1998). The *nif* gene operon of the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Journal of Bacteriology*, 180(6): 1504-1511.
- Kessler, P. S., McLarnan, J. and Leigh, J. A. (1997). Nitrogenase phylogeny and the

- molybdenum dependence of nitrogen fixation in *Methanococcus maripaludis*. *Journal of Bacteriology*, 179(2): 541-543.
- Khammas, K. M., Ageron, E., Grimont, P. A. and Kaiser, P. (1989). *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology*, 140: 679.
- Kloepper, J. W., Rodriguez-Ubana, R., Zehnder, G. W., Murphy, J. F., Sikora, E. and Fernández, C. (1999). Plant root-bacteria interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systematic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*, 28: 21-26.
- Klucas, R. V. (1991). Associative nitrogen fixation in plants. In: M. J. Dilworth and A. R. Glenn (Ed), *Biology and biochemistry of nitrogen fixation*. Amsterdam: Elsevier.
- Knowles, R. and Baraqqio, W. L. (1994) Free-living dinitrogen-fixing bacteria. In: R. W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicsek, S. Smith, A. Tabatabai and A. Wollum (Ed.), *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties* (pp. 179-197). Soil Science Society of America, Madison: Wisconsin Inc.
- Koga, J., Adaehi, T. and Hidaka, H. (1991). Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. *Molecular and General Genetics*, 226: 10-16.
- Koga, J., Adaehi, T. and Hidaka, H. (1992). Purification and characterization of indolepyruvate decarboxylase. A novel enzyme for indole-3-acetic-acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. *Journal of Biological Chemistry*, 267(22): 15823-15828.
- Koike, N, Hyakumachi, M, Kageyama, K, Tsuyumu, S and Doke, N. (2001). Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant

- growth-promoting fungus: Lignification and superoxide generation. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 523–533.
- Krotzky, A. and Werner, D. (1987). Nitrogen fixation in *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of Microbiology*, 147: 48-57.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 376: 514-516.
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., Garcia-Valdés, E. and Palleroni, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2): 510-547.
- Lawson, D. M. and Smith, B. E. (2002). Molybdenum nitrogenases: a crystallographic and mechanistic view. *Metal Ions in Biological Systems*, 39: 75-119.
- Lee, K. B., De Backer, P., Aono, T., Liu, C. T., Suzuki, S., Suzuki, T., Kaneko, T., Yamada, M., Tabata, S., Kupfer, D. M., Najjar, F. Z., Wiley, G. B., Roe, B., Binnewies, T. T., Ussery, D. W., D'Haese, W., Herder, J. D., Gevers, D., Vereecke, D., Holsters, M., Oyaizu, H. (2008). The genome of the versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *BMC Genomics*, 9:271.
- Leigh, J. A. (2000). Nitrogen fixation in methanogens: the archaeal perspective. *Current Issues in Molecular Biology*, 2(4): 125-131.
- Li, C. Y., Massicote, H. B. and Moore, L. V. H. (1992). Nitrogen-fixing *Bacillus* sp. associated with Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae. *Plant and Soil*, 140(1): 35-40.
- Li, J., Wang, E., Chen, W. and Chen, W. (2008) Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 238–246.

- Lin, B. L., Sakoda, A., Shibasaki, R., Goto, N. and Suzuki, M. (2000). Modelling a global biogeochemical nitrogen cycle in terrestrial ecosystems. *Ecological Modelling*, 135: 89–110.
- Lin, S. Y., Young, C. C., Hupfer, H., Siering, C., Arun, A. B., Chen, W. M., Lai, W. A., Shen, F. T., Rekha, P. D. and Yassin, A. F. (2009). *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarder tar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(4): 761-765.
- Lindemann, W. C. and Grover, C. R. (2003). *Nitrogen fixation by legumes*. New Mexico State University Guide-129. USA.
- Lobo, A. L. and Zinder, S. H. (1992). Nitrogen fixation by methanogenic bacteria. In: G. Stacey, R. H. Burris and H. J. Evans (Ed.), *Biological Nitrogen Fixation* (pp. 191-211). New York: Chapman and Hall.
- Lovell, C. R., Piceno, Y. M., Quattro, J. M. and Bagwell, C. E. (2000). Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9): 3814-3822.
- Lucia, V., Baldani, D. and Döbereiner, J. (1980). Host-Plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 12: 433-439.
- Ludwig, W. and Klenk, H. P. (2005). Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In: G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn. (pp. 49-66). New York: Springer-Verlag.
- Ma, Y. and Chen, S. (2007). *Paenibacillus sabinae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 6-11.



- Ma, Y. and Chen, S. (2008). *Paenibacillus forsythiae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of *Forsythia mira*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 319-323.
- Ma, Y., Zhang, J. and Chen, S. (2007). *Paenibacillus zanthoxyli* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Zanthoxylum simulans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 873–877.
- Madigan, M. T. (1995). Microbiology of nitrogen fixation by anoxygenic photosynthetic bacteria. In: R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (Ed.), *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (pp. 915-928). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Madigan, M. T. (2006). The family Heliobacteriaceae. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Ed.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> edn. (pp. 951-964). New York: Springer-Verlag.
- Madigan, M. T., Cox, S. S. and Stegeman, R. A. (1984). Nitrogen fixation and nitrogenase activities in members of the family Rhodospirillaceae. *Journal of Bacteriology*, 157: 73-78.
- Malhotra, M. and Srivastava, S. (2008). Organization of the *ipdC* region regulates IAA levels in different *Azospirillum brasilense* strains: molecular and functional analysis of *ipdC* in strain SM. *Environmental Microbiology*, 10(5): 1365-1373.
- Mantelin, S. and Touraine, B. (2004). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, 55(394): 27-34.
- Martin-Didonet, C. C., Chubatsu, L. S., Souza, E. M., Kleina, M., Rego, F. G., Rigo, L. U., Yates, M. G. and Pedrosa, F. O. (2000). Genome structure of the genus *Azospirillum*. *Journal of Bacteriology*, 182: 4113-4116.

- Martinez, J., Martinez, L., Rosenblueth, M., Silva, J. and Martinez-Romero, E. (2004). How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. *International Microbiology*, 7(4): 261-268.
- Masepohl, B., Drepper, T., Paschen, A., Groß, S., Pawlowski, A., Raabe, K., Riedel, K. and Klipp, W. (2002). Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 4(3): 243–248.
- Matthew Sattley, W., Madigan, M. T., Swingley, W. D., Cheung, P. C., Clocksin, K. M., Conrad, A. L., Dejesa, L. C., Honchak, B. M., Jung, D. O., Karbach, L. E., Kurdoglu, A., Lahiri, S., Mastrian, S. D., Page, L. E., Taylor, H. L., Wang, Z. T., Raymond, J., Chen, M., Blankenship, R. E. and Touchman, J. W. (2008). The genome of *Heliobacterium modesticaldum*, a phototrophic representative of the Firmicutes containing the simplest photosynthetic apparatus. *Journal of Bacteriology*, 190(13): 4687-4696.
- McNeil, B. E., Martell, R. E. and Read, J. M. (2006). GIS and biogeochemical models for examining the legacy of forest disturbance in the Adirondack Park, N.Y, USA. *Ecological Modelling*, 195: 281-295.
- Megalhaes, F. M., Baldani, J. I., Souto, S. M., Kuykendall, J. R. and Döbereiner, J. (1983). A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 55(4): 417-430.
- Mehnaz, S. and Lazarovits, G. (2006). Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans* and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*, 51: 326-335.
- Mehnaz, S. Weselowski, B. and Lazarovits, G. (2007a). *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 620-624.

- Mehnaz, S. Weselowski, B. and Lazarovits, G. (2007). *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rizosphere soil of *Zea mays*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2805-2809.
- Methé, B. A. Webster, J., Nevin, K., Butler, J. and Lovley, D. R. (2005). DNA micorarray analysis of nitrogen fixation and Fe (III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5): 2530-2538.
- Metting, F. B., Jr. (1993). Structure and physiological ecology of soil microbial communities. In: F.B. Metting (Ed.), *Soil Microbial Ecology Applications in Agricultural and Environmental Management* (pp. 17-21). New York: Marcel Dekher Inc.
- Miyamoto, T., Kawahara, M. and Minamisawa, K. (2004). Novel endophytic nitrogen-fixing clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11): 6580-6586.
- Moore, E. R. B., Tindall, B. J., Martins Dos Santos, V. A. P., Pieper, D. H., Ramos, J. L. and Palleroni, N. J. (2006). Nonmedical: *Pseudomonas*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Ed.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> edn. (pp. 664-703). New York: Springer-Verlag.
- Morais, P. V., Mesquita, C., Andrade, J. L. and Da Costa, M. S. (1997). Investigation of persistent colonization by *Pseudomonas aeruginosa*-like strains in a spring water bottling plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 851-856.
- Moreno, E. (1998). Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibits more than one different chromosome? *FEMS Microbiology Reviews*, 22: 255-275.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335-350.

- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(1): 263-273.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S. and Lakshminarasimhan, C. (2002). *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*, 83(2): 137-145.
- Nandakumar, R., Babu, S. Viswanathan, R. Raguchander, T. and Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(4-5): 603-612.
- Nelson, D. C., Waterbury, J. B. and Jannasch, H. W. (1982). Nitrogen fixation and nitrate utilization by marine and freshwater *Beggiatoa*. *Archives of Microbiology*, 133: 172-177.
- Norse, D. (2003). Fertilizers and world food demand-implications for environmental stresses, *IFA-FAO Agriculture Conference 2003*.
- Okon, Y., Albrecht, S. L. and Burris, R. H. (1976). Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*, 127: 1248-1254.
- Overmann, J. (2005). Green sulfur bacteria. In: G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn. (pp. 601-605). New York: Springer-Verlag.
- Palleroni, N. J. (1984). Genus I. *Pseudomonas*. In: N. R. Krieg and J. G. Holt (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (pp. 141-199). Baltimore: The Williams & Wilkins Co.
- Palleroni, N. J., Bradbury, J. F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for

- Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.*, 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43: 606-609.
- Palleroni, N. J., Kunisawa, R., Contopoulou, R. and Doudoroff, M. (1973). Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23(4): 333-339.
- Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S. and Sa, T. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160: 127-133.
- Parvathi, A., Krishna, K., Jose, J., Joseph, N. and Nair, S. (2009). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(2): 269-275.
- Paul, E. A. and Clark, F. E. (1989). *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press.
- Pedraza, R. O. (2008). Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 25-35.
- Pedrosa, F. O. and Elmerich, C. (2007). Regulation of nitrogen fixation and ammonium assimilation in associative and endophytic nitrogen fixing bacteria. In: C. Elmerich and W. E. Newton (Ed.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, 41-71.
- Peng, G., Wang, H., Zhang, G., Hou, W., Liu, Y., Wang, E. T. and Tan, Z. (2006). *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 1263-1271.
- Poly, F., Lucile, L. J., and Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for

- studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 152: 95-103.
- Postgate, J. R. (1982). *The fundamentals of nitrogen fixation*. Cambridge, London: University Press.
- Pot, B., Gillis, M. and De Ley, J. (2006). The Genus *Aquaspirillum*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Ed.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> edn. (pp. 710-722). New York: Springer-Verlag.
- Pötter, M., Oppermann-Sanio, F. B. and Steinbüchel, A. (2001). Cultivation of bacteria producing polyamino acids with liquid manure as carbon and nitrogen source. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 617–622.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, D. A. (1999). *Microbiology* (4<sup>th</sup>edn). Boston: McGraw-Hill.
- Pretorius, I. M., Rawlings, D. E., O'Neil, E. G., Jones, W. A., Kirby, R. and Woods, D. R. (1987). Nucleotide sequence of the gene encoding the nitrogenase iron protein of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 169(1): 367-370.
- Rameshkumar, N., Fukui, Y., Sawabe, T. and Nair, S. (2008). *Vibrio porteresiae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a mangrove-associative wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1608-1615.
- Raupach, G. S. and Kloepper, J. W. (1998). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88(11): 1158-1164.
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R. and Blankenship, R. E. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution*, 21(3): 541–554.
- Rediers, H., Vanderleyden, J. and De Mot, R. (2004). *Azotobacter vinelandii*: a

- Pseudomonas* in disguise? *Microbiology* 150: 1117-1119.
- Rediers, H., Vanderleyden, J. and De Mot, R. (2007). Nitrate respiration in *Pseudomonas stutzeri* A15 and its involvement in rice and wheat root colonization. *Microbiological Research*, 164(4): 461-468.
- Rees, D .C. and Howard, J. B. (2000). Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4: 559-556.
- Rees, D. C., Tezcan, A. F, Haynes, C. A, Walton, M. Y, Andrade, S., Einsle, O., James, B. and Howard, J. B. (2005). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 363: 971–984.
- Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Pot, B., Gillis, M., Kertsers, K., Thielemans, D. and De Ley, J. (1987). *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 43-51.
- Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T. (1998). Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology*, 6(4): 139-144.
- Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T. (2006). The Genera *Azoarcus*, *Azovibrio*, *Azospira* and *Azonexus*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Ed.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> edn. (pp. 873-891). New York: Springer-Verlag.
- Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T. (2007). Endophytic associations of *Azoarcus* spp. In: C. Elmerich and W. E. Newton (Ed.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, 191-211.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M., Hoste, B., Vancanneyt, M., Kersters, K. and De Ley, J. (1993). *Azoarcus* gen nov., nitrogen-foxing Proteobacteria associated with roots of Kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two

- species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(3): 574-584.
- Reis, V., Lee, S. and Kennedy, C. (2007). Biological Nitrogen Fixation in Sugarcane. In: C. Elmerich and W.E. Newton (Ed.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, 213-232.
- Rhame, F. S. (1980). The ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. In: L. D. Sabath (Ed.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment* (pp. 31-51). Bern, Switzerland: Hans Huber Publishers.
- Ridley, M. A., Mele, M. P. and Beverly, R. C. (2004). Legume-based farming in Southern Australia: developing sustainable systems to meet environmental challenges. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1213-1221.
- Rius, N., Fusté, M. C., Guasp, C., Lalucat, J. and Lorén, J. G. (2001). Clonal population structure of *Pseudomonas stutzeri*, a species with exceptional genetic diversity. *Journal of Bacteriology*, 183(2):736-744.
- Roberts, A. and Stone, L. (2004). Advantageous indirect interactions in systems of competition. *Journal of Theoretical Biology*, 228: 367–375.
- Roberts, G. P. and Ludden, P. W. (1992). Nitrogen fixation by photosynthetic bacteria. In: G. Stacey, R. H. Burris and H. J. Evans (Ed.), *Biological Nitrogen Fixation* (pp. 135-165). New York: Chapman and Hall.
- Robson, R. L., Chesshyre, J. A., Wheeler, C., Jones, R., Woodley, P. R and Postgate, J. R. (1984). Genome size and complexity in *Azotobacter chroococcum*. *Journal of General Microbiology*, 130: 1603-1612.
- Rodelas, B., Gonzáles-López, J., Martínez-Toledo, M. V., Pozo, C. and Salmerón, V. (1999). Influence of *Rhizobium/Azotobacter* and *Rhizobium/Azospirillum* combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba* L.).



*Biology and Fertility of Soils*, 29: 165-169.

Rodríguez Cáceres, E. A. (1982). Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 990-991.

Rodríguez-Díaz, M., Lebbe, L., Rodelas, B., Heyrman, J., De Vos, P. and Logan, N. A. (2005). *Paenibacillus wynnii* sp. nov., a novel species harbouring the *nifH* gene, isolated from Alexander Island, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 2093–2099.

Rodriguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T. and Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant-growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287: 15-21.

Rosado, A. S., Duarte, G. F., Seldin, L. and Elsas, J. (1998). Genetic Diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (8): 2770–2779.

Rozzak, D. B. and Colwell, R. R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews*, 5: 365-379.

Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J. and Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278: 1-9.

Saikia, S. P. and Jain, V. (2007). Biological nitrogen fixation with non-legumes: An achievable target or a dogma? *Current Science*, 92 (3): 317-322.

Saitou, N. and Nei, M. (1987). The Neighbour-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.

Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S. and Bhatti, A. S. (2007). Perspective of plant

- growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34: 635-648.
- Sallal, A. K., Abu-Alteen, K. H., Jafri, A. M. (1989). Enumeration of *Pseudomonas* species and *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages in domestic sewage. *Microbios*, 60: 35-43.
- Sambrook, P. N., Champion, G. D., Browne, C. D., Cairns, D., Cohen M. L., Day, R. O., Graham, S., Handel, M., Jaworski, R., Kempler, S. and Wachter, T. (1989). Corticosteroid injection for osteoarthritis of the knee: peripatellar compared to intra-articular route. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 7: 609-613.
- Saravanan, V. S., Madhaiyan, M., Osborne, J., Thangaraju, M. and Sa, T. M. (2008). Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: their possible role in plant growth promotion. *Microbial Ecology*, 55: 130-140.
- Sarita, S., Priefer, U. B., Prell, J. and Sharma, P. K. (2008). Diversity of *nifH* gene amplified from rhizosphere soil DNA. *Current Science*, 94(1): 109-115.
- Schmid, M. and Hartmann, A. (2007). Molecular phylogeny and ecology of root associated diazotrophic  $\alpha$ - and  $\beta$ -Proteobacteria. In: C. Elmerich and W. E. Newton (Ed.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, 21-40.
- Seefeldt, L. C., Dance, I. G. and Dean, D. R. (2004). Substrate interactions with nitrogenase: Fe versus Mo. *Biochemistry*, 43(6): 1401-1409.
- Segers, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Torck, U., Hoste, B., Dewettinck, D., Falsen, E., Kersters, K. and De Vos, P. (1994). Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Büsing, Döll and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *International Journal of*

- Systematic Bacteriology*, 44(3): 499-510.
- Seldin, L., Van Elsas, J. D. & Penido, E. G. C. (1984). *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34: 451-456.
- Senoo, K., and Wada, H. (1989). Isolation and identification of an aerobic  $\gamma$ -HCH-decomposing bacterium from soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 35: 79-87.
- Sensi, A. (1999). Agriculture and Acidification. In: *Agriculture, Environment, Rural Development: Facts and Figures-A Challenge for Agriculture*. European Commission Report.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K. and Komagata, K. (1997a). Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 147: 289-298.
- Sikorski, J., Lalucat, J. and Wackernage, W. (2005). Genomovars 11 to 18 of *Pseudomonas stutzeri*, identified among isolates from soil and marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1767-1770.
- Šimek, M. and Cooper, E. J. (2001). Nitrogen use efficiency in temperate zone Arable Lands. In: M. Shiyomi and H. Koizumi (Ed.), *Structure and Function in Agroecosystem Design and Management* (pp. 228-251). Boca Raton, London, New York, Washington D.C.: CRC Press.
- Skerman, V. B. D., McGowan, V. and Sneath, P. H. A. (1980). Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30: 225-420.
- Sly, L. I. and Stackebrandt, E. (1999). Description of *Sermanella parooensis* gen.

- nov., to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 541.
- Smil, V. (1997). *Global Population and the Nitrogen Cycle* (pp. 76-81). Scientific American Inc.
- Smith, M. R. (1990). The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation*, 1: 191-206.
- Smith, S. E. and Read, D. J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis* (2<sup>nd</sup> edn). London: Academic Press.
- Solé, R. V., Bascompte, J. and Valls, J. (1992). Stability and complexity of spatially extended two-species competition. *Journal of Theoretical Biology*, 159: 469–480.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Morgan, D. R., Swensen, S. M., Mullin, B. C., Dowd, J. M. and Martin, P. G. (1995). Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 2647-2651.
- Somers, E., Vanderleyden, J. and Srinivasan, M. (2004). Rhizosphere signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*, 30: 205-240.
- Sørensen, J., Skouv, J., Jørgensen, A. and Nybroe, O. (1992). Rapid identification of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* and *P. putida* by SDS-PAGE analysis of whole-cell protein patterns. *FEMS Microbiology Ecology*, 101: 41-50.
- Sorokin, L. D., Kravchenko, I. K., Tourova, T. P., Kolganova, T. V., Boulygina, S. B.

- and Sorokin, D. Y. (2008). *Bacillus alcalidiazotrophicus* sp. nov., a diazotrophic, low salt-tolerant alkaliphile isolated from Mongolian soda soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 2459-2464.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31: 425-448.
- Spiers, A. J., Buckling, A. and Rainey, P. B. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 146: 2345-2350.
- Spring, S. and Rosenzweig, F. (2006). The Genera *Desulfitobacterium* and *Desulfosporosinus*: Taxonomy. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Ed.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> edn. (pp. 771-786). New York: Springer-Verlag.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kämpfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C. and Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1043-1047.
- Steenhoudt, O. and Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 487-506.
- Stepkowski, T., Czaplinska, M., Miedzinska, K. and Moulin, L. (2003). The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. *Systematic and Applied microbiology*, 26: 483-494.

- Stoate, C., Boatman, D. N., Borralho, J. R., Carvalho, R. C., De Snoo, R. G. and Eden, P. (2001). Ecological impacts of arable intensification in Europe. *Journal of Environmental Management*, 63: 337-365.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K.-S., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S. and Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964.
- Swings, J., De Vos, P., Van den Mooter, M., De Ley, J. (1983). Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33: 409-413.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., De Lajudie, P., Prin, Y, Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C. and Dreyfus, B. (2001). Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology*, 183(1): 214-220.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (1998). *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates Inc.
- Tamura, K., Dudley, J, Nei, M and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Tamura, K., Nei, M. and Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbour-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 11030-11035.

- Tarrand, J. J., Krieg, N. R. and Döbereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 24: 967-980.
- Tcherpakov, M., Ben-Jacob, E. and Gutnick, D.L. (1999). *Paenibacillus dendritiformis* sp. nov., proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 239-246.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-ific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Thompson, J. P. and Skerman, V. B. D. (1979). *Azotobacteriaceae, the taxonomy and ecology of the aerobic nitrogen fixing bacteria* (pp. 417). London: Academic Press.
- Thorneley, R. N. F. and Lowe, D. J. (1985). Kinetics and mechanism of the nitrogenase enzyme system. In: T. G. Spiro (Ed.), *Molybdenum enzymes* (pp. 221-284). New York: John Wiley.
- Tilak, K. V. B. R., Ranganayaki, N., Pal, K. K., De, R., Saxena, A. K., Shekhar Nautiyal, C., Mittal, S., Tripathi, A. K. and Johri, B. N. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, 89(1): 136-150.
- Tilman, D., Cassman, G. K., Matson, A. P., Naylor, R. and Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418: 671-677.

- Tischner, R. (2000). Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants (invited review). *Plant, Cell and Environment*, 23: 1005-1024.
- Todar, K. (2004a). *Pseudomonas* and its relatives. In: Todar's Online Textbook of Bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net>.
- Triplett, E. W. (2007). Prospects for significant nitrogen fixation in grasses from bacterial endophytes. In: C. Elmerich and W. E. Newton (Ed.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, 303-314.
- Tsagou, V. and Aggelis, G. (2006). Growth dynamics of *Azospirillum lipoferum* at steady and transitory states in the presence of  $\text{NH}_4^+$ . *Journal of Applied Microbiology*, 100: 286–295.
- Tsagou, V., Kefalogianni, I., Sini, K. and Aggelis, G. (2003). Metabolic activities in *Azospirillum lipoferum* grown in the presence of  $\text{NH}_4^+$ . *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 574-578.
- Tyson, G. W., Lo, L., Baker, B. J., Allen, E. E., Hugenholtz, P. and Banfield, J. F. (2005). Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov., from an acidophilic microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10): 6319-6324.
- Urdaci, M. C., Stal, L. J. and Marchand, M. (1988). Occurrence of nitrogen-fixation among *Vibrio* spp. *Archives of Microbiology*, 150: 224-229.
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R. J., Tettelin, H., Blake II, R., Eisen, J. A. and Holmes, D. S. (2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics*, 9: 597. Published on line on December 11, 2008 as doi: 10.1186/1471-2164-9-597.
- Vall, P. M. and Vidal, C. (1999). Nitrogen in agriculture. In: *Agriculture, Environment, Rural Development: Facts and Figures-A Challenge for*



*Agriculture*. European Commission Report.

- Van Beilen, J. B., Wubbolts, M., Chen, Q., Nieboer, M. and Witholt, B. (1996). Effects of two-liquid-phase systems and expression of *alk* genes on the physiology of alkane-oxidizing systems. In: T. Nakarawa, K. Furukawa, D. Haas, and S. Silver (Ed.), *Molecular Biology of Pseudomonads* (pp. 35-47). Washington D.C., USA: ASM Press.
- Van Dam, D. and Van Breemen, N. (1995). NICCE: a model for cycling of nitrogen and carbon isotopes in coniferous forest ecosystems. *Ecological Modelling*, 79: 255–275.
- Van der Maarel, M. J., Veen, A. and Wijnbenga, D. J. (2000). *Paenibacillus granivorans* sp. nov., a new *Paenibacillus* species which degrades native potato starch granules. *Systematic and Applied microbiology*, 23(3): 344-348.
- Van Dommelen, A. and Vanderleyden, J. (2007). Associative nitrogen fixation. In: H. Bothe, S. J. Ferguson and W. E. Newton (Ed.), *Biology of the Nitrogen Cycle*, 179-192.
- Van Hove, C. and Lejeune, A. (2002). The *Azolla-Anabaena* symbiosis. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish academy*, 102B(1): 23-26.
- Vanbleu, E. and Vanderleyden, J. (2007). Molecular genetics of rhizosphere and plant-root colonization. In: C. Elmerich and W. E. Newton (Ed.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, 85-112.
- Vancanneyt, M., Torck, U., Dewettinck, D., Vaerewijck, M. and Kersters, K. (1996). Grouping of *Pseudomonas* by SDS-PAGE of whole-cell proteins. *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 556-568.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial classification.

*Microbiological Review*, 60: 407-438.

- Venieraki, A., Dimou, M., Pergalis, P., Kefalogianni, I., Chatzipavlidis, I. and Katinakis, P. (2010). The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. *Microbial Ecology*, 61(2): 277-285
- Vermeiren, H., Willems, A., Schoofs, G., De Mot, R., Keijers, V., Hai, W. and Vanderleyden, J. (1999). The rice inoculant strain *Alcaligenes faecalis* A15 is a nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri*. *Systematic and Applied Microbiology*, 22: 215-224.
- Vitousek, M. P., Aber, D. J., Howarth, W. R., Likens, E. G., Matson, A. P., Schindler, W. D., Schlesinger, H. W. and Tilman, G. D. (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications*, 7(3): 737-750.
- Vitousek, M. P., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C. B., Grimm, N. B., Howarth, R. W., Marino, R., Martinelli, L., Rastetter, E. B. and Spret, J. I. (2002). Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry*, 57/58: 1-45.
- Von der Weid, I., Duarte, G., Elsas, J. and Seldin, L. (2002). *Paenibacillus brasilensis* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 2147-2153.
- Von Wirén, N., Gazzarrini, S. and Frommer, W. B. (1997). Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil*, 196: 199-206.
- Von Wirén, N., Gazzarrini, S., Gojon, A., and Frommer, B. W. (2000). The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 254-261.

- Wahlund, T. M. and Madigan, M. T. (1993). Nitrogen fixation by the thermophilic green sulphur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Journal of Bacteriology*, 175(2):474-478.
- Wang, S., Chen, J. and Johnson, J. L. (1988). The presence of five *nifH*-like sequences in *Clostridium pasteurianum*: sequence divergence and transcription properties. *Nucleic Acids Research*, 16(2): 439-454.
- Weaver, R. W. and Graham, P. H. (1994). Legume nodule symbionts. In: R. W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai and A. Wollum (Ed.), *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties* (pp. 199-222). Soil Science Society of America, Madison: Wisconsin Inc.
- Wei, H., Gui-Xiang, P., Zhi-Jun, X., Shi-Xian, C. and Zhi-Yuan, T. (2007). Diversity of endophytic diazotrophs isolated from *Bambusa blumeana* in Guangdong province. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 4(2): 105-109.
- Weir, B. S. (2008). The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website. Last updated on November 16, 2008 by <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A and Lanne, D. J. (1991). 16 S ribosomal RNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697-703.
- Widdel, F. (2006). The genus *Desulfotomaculum*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Ed.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> edn. (pp. 787-794). New York: Springer-Verlag.
- Wiegel, J. (2006). The genus *Xanthobacter*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Ed.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> edn. (pp. 290-314). New York: Springer-Verlag.

- Wiegel, J., Tanner, R. and Rainey, F. A. (2006). An introduction to the family Clostridiaceae. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Ed.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> edn. (pp. 654-678). New York: Springer-Verlag.
- Willems, A., De Ley, J., Gillis, M., Kersters, K. (1991). *Comamonadaceae*, a new family encompassing the acidovorans rRNA complex, including *Variovax paradoxus* gen. nov., comb. nov. for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41: 445-450.
- Witz, D. F., Detroy, R. W. & Wilson, P. W. (1967). Nitrogen fixation by growing cells and cell-free extracts of the Bacillaceae. *Archives of Mikrobiology*, 55: 369-381.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Review*, 51:221-271.
- Xie, C. H. and Yokota, A. (2005a). *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1435-1438.
- Xie, C. H. and Yokota, A. (2005b). Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 2419-2425.
- Xie, C. H. and Yokota, A. (2006). *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 889-893.
- Xie, G. H, Cui, Z., Yu, J., Yan, J., Hal, W. and Steinberger, Y. (2006). Identification of *nif* genes in N<sub>2</sub>-fixing bacterial strains isolated from rice fields along the Yangtze River Plain. *Journal Basic of Microbiology*, 46(1):56-63.

- Xie, G. H., Su, B. and Cui, Z. (1998). Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River Valley. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 38(6): 480-483.
- Xu, D. and Côte, J. C. (2003). Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 39 end 16S rDNA and 59 end 16S–23S ITS nucleotide sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 695–704
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. and Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology*, 36(12): 1251-1275.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff, 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology*, 39: 897-904.
- Yan, Y., Yang, J., Dou, Y., Chen, M., Ping, S., Peng, J., Lu, W., Zhang, W., Yao, Z., Li, H., Liu, W., He, S., Geng, L., Zhang, X., Yang, F., Yu, H., Zhan, Y., Li, D., Lin, Z., Wang, Y., Elmerich, C., Lin, M. and Jin, Q. (2008). Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(21): 7564-7569.
- Yoon, J. H., Kang, S. J., Park, S., Lee, S. Y. and Oh, T. K. (2007). Reclassification of *Aquaspirillum itersonii* and *Aquaspirillum peregrinum* as *Novispirillum itersonii* gen. nov., comb. nov. and *Insolitospirillum peregrinum* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2830-2835.

- Young, C. C., Hupfer, H., Siering, C., Ho, M. J., Arun, A. B., Lai, W. A., Rekha, P. D., Shen, F. T., Hung, M. H., Chen, W. M. and Yassin, A. F. (2008). *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 58: 959-963.
- Young, J. M. and Park, D. C. (2007). Probable synonymy of the nitrogen-fixing genus *Azotobacter* and the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2894-2901.
- Young, J. P. W. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: G. Stacey, R. H. Burris and H. J. Evans (Ed.), *Biological Nitrogen Fixation* (pp. 43-86). New York: Chapman and Hall.
- Zehnder, G. W., Murphy, J. F., Sikora, E. and Kloepper, J. W. (2001). Application of rhizobacteria for induced resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 39-50.
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M. and Steward, G. F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology*, 5(7): 539-554.
- Zimmer, W. Wesche, M. and Timmermans L. (1998). Identification and isolation of indolo-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum* sp7: sequencing and functional analysis of the genus locus. *Current Microbiology*, 36: 327-331.
- Zhou, J., Fries, M. R., Chee-Sanford, J. C. and Tiedje, J. M. (1995). Phylogenetic analysis of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluence and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 500-506.
- Zuberer, D. A. (1998). Biological dinitrogen fixation: introduction and nonsymbiotic. In: D. M. Sylvia, J. J. Furhmann, P. G. Hartel and D. A. Zuberer (Ed.), *Principles and Applications of Soil Microbiology* (pp. 295-321). New Jersey,

USA: Prentice Hall.

Zuckerkanld, E. and Pauling, L. (1965b). Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: V. Bryson and H. J. Vogel (Ed.), *Evolving and Proteins* (pp. 97-166). New York: Academic Press.

### **ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Αναλογίδης, Α. Δ. (2000). *Έδαφος, θρεπτικά στοιχεία και φυτική παραγωγή*. Αθήνα: Εκδόσεις ΑΓΡΟ-τύπος Α.Ε.

Αρσένη, Α. (1996). *Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων* (4<sup>η</sup> έκδοση). Εκδόσεις Ζήτα Ιατρικές.

Διαμαντίδης, Γ. (1994). *Εισαγωγή στη Βιοχημεία* (2<sup>η</sup> έκδοση). Θεσσαλονίκη: Univesrity Studio Press.

Ευθυμίου, Γ., Μερτζάνης, Α., Σαπουντζής, Μ. Και Ζακυνθινός, Γ. (2005). Ανθρωπογενείς επιδράσεις στο δέλτα του ποταμού Σπερχιού-μέτρα προστασίας, ανάδειξης και διαχείρισης των φυσικών οικοσυστημάτων. (HELECO '05, TEE, Αθήνα).

Κεφαλογιάννη, Η. (2008). Οικο-φυσιολογική μελέτη βακτηρίων του γένους *Azospirillum*. (Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών).

Κοράκης, Γ. και Αθανασιάδης, Ν. (2006). Η βλάστηση των δασών ανατολικού πλατάνου (*Platanus orientalis* L.) στο όρος Πάικο. *Δασική έρευνα*, 19: 59-98.

Τζάμος, Ε. (2004). *Φυτοπαθολογία*. Αθήνα: Εκδόσεις Α. Σταμούλης.

Φωτιάδης, Γ. (2005). Χαρακτηριστικά στοιχεία της βλάστησης και της χλωρίδας του Πηλίου. Ελληνική εταιρεία εθνοφαρμακολογίας. (Πρακτικά Επιστημονικής Διημερίδας: Το ελληνικό φασκόμηλο. Ζαγορά Πηλίου).







