

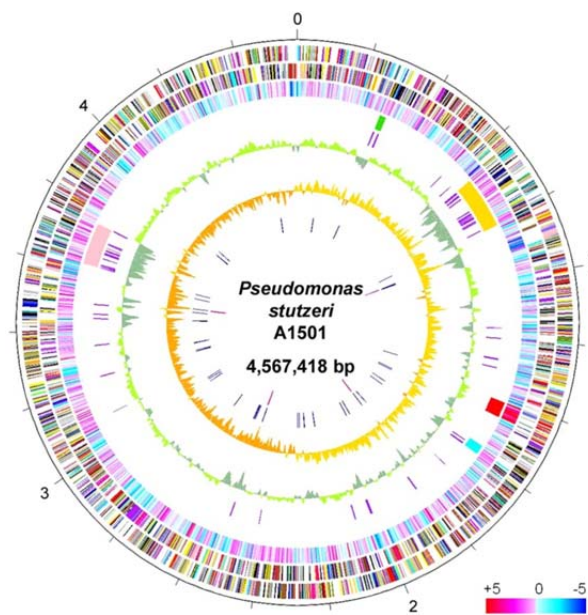
# ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**“Χαρακτηρισμός και Φυλογενετική ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς απονιτροποίησης αζωτοδεσμευτικών στελεχών της *Pseudomonas stutzeri*”**

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΒΑΜΒΑΚΑΣ**



Π.Μ.Σ. «Βιοτεχνολογία και εφαρμογές στη γεωπονία»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ»

**ΑΘΗΝΑ 2012**

Π.Μ.Σ. «Βιοτεχνολογία και εφαρμογές στη γεωπονία»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ  
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**“Χαρακτηρισμός και Φυλογενετική ανάλυση γονιδίων που  
εμπλέκονται στους μηχανισμούς απονιτροποίησης αζωτοδεσμευτικών  
στελεχών της *Pseudomonas stutzeri*”**

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΒΑΜΒΑΚΑΣ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:  
ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΚΑΤΙΝΑΚΗΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

**ΑΘΗΝΑ 2012**

Η ΑΝΑΘΕΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΜΕ ΘΕΜΑ:  
**«Χαρακτηρισμός και Φυλογενετική ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς απονιτροποίησης αζωτοδεσμευτικών στελεχών της *Pseudomonas stutzeri*»**, ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΜΕ ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΙΚΗΣ ΣΥΝΕΛΕΥΣΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ (20<sup>η</sup>/5-7-2011) ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ. Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ, ΟΡΙΣΤΙΚΕ ΜΕ ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΓΣΕΣ (20<sup>η</sup>/5-7-2011) ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.

#### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΚΑΤΙΝΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (επιβλέπων)

ΤΑΜΠΑΚΑΚΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ (μέλος)

ΧΑΤΖΗΠΑΥΛΙΔΗΣ ΙΟΡΔΑΝΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (μέλος)

# Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών 'Μοριακή Οικολογία & ανίχνευση Γενετικά τροποποιημένων Οργανισμών'.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή κ. Παναγιώτη Κατινάκη, αφενός για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο προσωπικό μου και με δέχθηκε στην ερευνητική του ομάδα και αφετέρου για το ενδιαφέρον και την υπομονή που επέδειξε καθ'όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας, τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε συγγραφικό επίπεδο της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Επίκουρο καθηγητή κ. Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη και τη Επίκουρη καθηγήτρια κ. Αναστασία Ταμπακάκη, για το ενδιαφέρον και το χρόνο που αφιέρωσαν για την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Επιπλέον, η συμβολή της διδάκτορος κ. Αναστασίας Βενιεράκη ήταν καταλυτική και χωρίς τη δική της καθοδήγηση, η παρούσα εργασία θα ήταν ημιτελής και ελλιπής. Για αυτό θα ήθελα να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την υπομονή της, τη βοήθειά της και την άψογη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα. Επίσης, ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας για την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος ευχαριστώ τα άτομα που είναι κοντά μου και κυρίως την οικογένειά μου που με στήριξαν και με στηρίζουν οικονομικά, ψυχικά και που είναι κοντά μου σε όποια απόφαση και αν πάρω στη ζωή μου.

## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν γονίδια τα οποία είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στις διαδικασίες της απονιτροποίησης και αφομοίωσης των νιτρικών. Τα υπό μελέτη γονίδια ήταν τα *nirS*, *narJ*, *nosZ*, *napA*, *nasA* και *nasB*. Τα γονίδια αυτά απομονώθηκαν από τα στελέχη αναφοράς της *Pseudomonas stutzeri* A1501 και DMS4166 καθώς και από άλλα έντεκα στελέχη αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (Gr 16, Gr 17, Gr 18, Gr 19, Gr 20, Gr 21, Gr 45, Gr 46, Gr 50, Gr 57 και Gr 65) τα οποία απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα σιτηρών. Η ενίσχυση των προαναφερθέντων γονιδίων των στελεχών A1501, DMS4166 καθώς και των εννέα στελεχών (Gr 16, Gr 17, Gr 18, Gr 19, Gr 20, Gr 21, Gr 45, Gr 46, Gr 50) έδωσε προϊόν ίδιου μεγέθους. Τα στελέχη Gr 57 και Gr 65 έδωσαν προϊόντα διαφορετικού μεγέθους. Με βάση την αλληλουχία των ενισχυμένων γονιδίων, κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δενδρογράμματα. Για κάθε ένα γονίδιο από αυτά αποκαλύφθηκε ότι τα εννέα στελέχη (Gr 16, Gr 17, Gr 18, Gr 19, Gr 20, Gr 21, Gr 45, Gr 46, Gr 50) ομαδοποιούνται στον ίδιο κλάδο με τα στελέχη αναφοράς A1501, DMS4166 της *P. stutzeri*, ενώ τα Gr 57 και Gr 65 ομαδοποιούνται σε έναν ξεχωριστό κλάδο, ο οποίος δεν ανήκει στην *P. stutzeri* και πιθανά ανήκουν σε ένα νέο είδος *Pseudomonas*.

## Abstract

Genes involved in the process known as denitrification and nitrate assimilation were studied. These genes were *nirS*, *narJ*, *nosZ*, *napA*, *nasA*, and *nasB*. They were isolated from the reference strains of *Pseudomonas stutzeri* A1501 and DMS4166 and from eleven (Gr 16, Gr 17, Gr 18, Gr 19, Gr 20, Gr 21, Gr 45, Gr 46, Gr 50, Gr 57, Gr 65) nitrogen-fixing bacteria strains. These strains were isolated from the rhizosphere of cereals. The amplification products of the aforementioned genes from strains A1501, DMS4166 and from Gr 16, Gr 17, Gr 18, Gr 19, Gr 20, Gr 21, Gr 45, Gr 46, Gr 50 stains were of the same size. On the contrary, amplicons from strains Gr 57, Gr 65 were of different size. Based on the sequences of the amplified genes phylogenetic trees were constructed for each gene. It was revealed that the nine strains (Gr 16, Gr 17, Gr 18, Gr 19, Gr 20, Gr 21, Gr 45, Gr 46, Gr 50) are grouped in the same branch with reference strains A1501, DMS4166 of *P. stutzeri*, For the other two studied stains (Gr 57, Gr 65) it is proposed that they are grouped in a separate branch, which does not belong to *P. stutzeri* and may belong to a new *Pseudomonas* sp.

I.	Εισαγωγή.....	1
I.1.	Γενικά.....	2
I.2.	Βακτήρια.....	5
I.2.1.	Ταξινόμηση Βακτηρίων .....	6
I.3.	Βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i> .....	7
I.3.1.	<i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	8
I.3.1.1.	Απομόνωση .....	8
I.3.1.2.	Διαδικασίες απομόνωσης .....	8
I.3.1.3.	Φαινοτυπικές Ιδιότητες.....	10
I.3.1.3.1.	Τύπος και δομή αποικιών.....	11
I.3.1.3.2.	Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	12
I.3.1.3.3.	Χημικός χαρακτηρισμός και χημειοταξινόμηση .....	14
I.3.1.3.3.1.	Σύσταση βάσεων DNA.....	14
I.3.1.3.3.2.	Πρωτεϊνικό πρότυπο .....	14
I.3.1.3.3.3.	LPS και ανοσολογικά χαρακτηριστικά .....	15
I.3.1.3.3.4.	Σύσταση λιπαρών οξέων .....	15
I.3.1.3.3.5.	Ενδοκυττάριο περιεχόμενο κινόνης και πολυαμινών .....	16
I.3.1.3.3.6.	Περιεχόμενο πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων (PHA) .....	16
I.3.1.4.	Χαρακτηρισμός γονιδιώματος και φυλογένεση .....	17
I.3.1.4.1.	DNA-DNA Υβριδισμοί .....	17
I.3.1.4.2.	Μέγεθος γονιδιώματος.....	17
I.3.1.5.	Ταυτοποίηση.....	18
I.3.1.5.1.	Φαινοτυπική ταυτοποίηση .....	18
I.3.1.5.2.	Μοριακή ταυτοποίηση.....	19
I.3.1.5.3.	Πολυφασική ταυτοποίηση .....	19
I.3.1.6.	Αζωτοδέσμευση .....	20
I.3.1.6.1.	Σημασία βιολογικής δέσμευσης του αζώτου.....	21
I.3.1.7.	Απονιτροποίηση.....	22
I.3.1.7.1.	Η φύση της απονιτροποίησης και η ομάδα των γονιδίων που απαιτούνται .....	23
I.3.1.7.1.1.	Γονίδια <i>Nar</i> .....	24
I.3.1.7.1.2.	Γονίδια <i>nir</i> .....	25
I.3.1.7.1.3.	Γονίδια <i>nor</i> .....	26
I.3.1.7.1.4.	Γονίδια <i>nar</i> .....	27

I.3.1.7.1.5. Γονίδια nos.....	28
Σκοπός .....	29
II. Γλυκά και Μέθοδοι.....	30
II.1. Βακτηριακά στελέχη .....	31
II.2. Μοριακές τεχνικές ταξινόμησης βακτηριακών στελεχών .....	32
II.2.1. Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από Gram - βακτήρια .....	32
II.2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) 33	
II.2.2.1. Αρχή της μεθόδου.....	33
II.2.2.2. Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR).....	34
II.2.2.3. Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτική αгарόζης.....	36
II.2.2.4. Ανάκτηση κλάσματος δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων από πηκτική αгарόζης 37	
II.2.2.5. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων 38	
II.2.3. Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα .....	39
II.2.3.1. Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα .....	39
II.2.3.2. Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation) .....	40
II.2.4. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων Escherichia coli.....	41
II.2.4.1. Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων E. coli.....	41
II.2.4.2. Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων E. coli δεκτικών για μετασχηματισμό (Competent cells).....	41
II.2.4.3. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E. coli με πλασμίδιο .....	42
II.2.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα E. coli 43	
II.2.6. Πέψη DNA με χρήση ενζύμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού.....	44
II.2.7. Αλληλούχηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequencing) .....	45
II.2.8. Σύγκριση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση .....	45
III. Αποτελέσματα.....	47
III.1. Μοριακή ανάλυση των γονιδίων nirS narJ nosZ narA nasA και nasB.....	48
III.2. Φυλογενετική ανάλυση.....	49
IV. Συζήτηση - Συμπεράσματα .....	59
V. Βιβλιογραφία .....	65



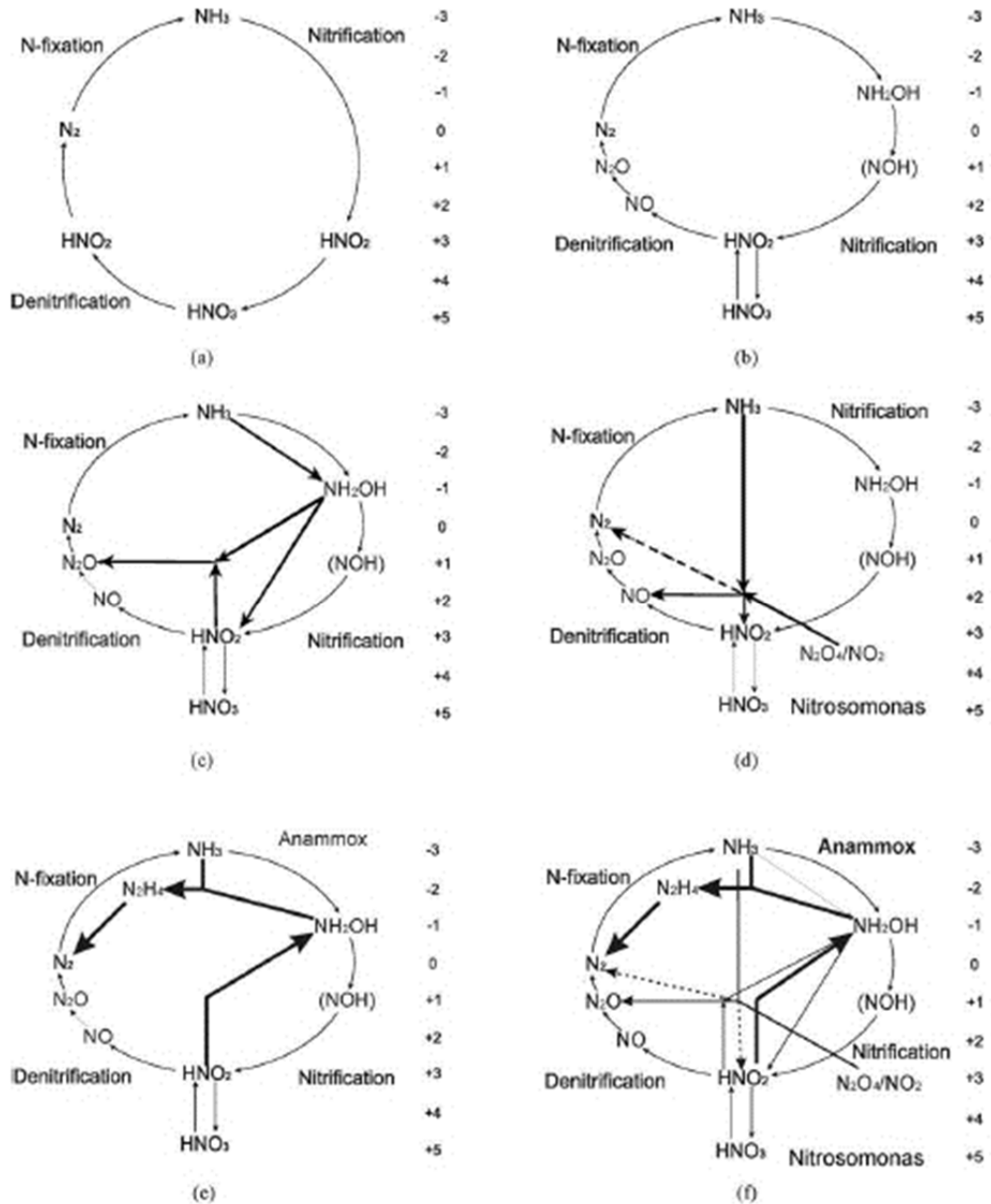
# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Γενικά

Το άζωτο είναι ένα από τα πλέον απαραίτητα χημικά στοιχεία για την ύπαρξη οποιουδήποτε ζωντανού οργανισμού. Το 96% κ.β. των ζωντανών οργανισμών αποτελείται από άζωτο, άνθρακα, υδρογόνο και οξυγόνο. Ειδικότερα, το άζωτο είναι απαραίτητο γιατί αποτελεί βασικό συστατικό των αμινοξέων και των νουκλεϊκών οξέων.

Το έδαφος είναι ένα σημαντικό συστατικό της βιόσφαιρας με καθοριστικές λειτουργίες για τη διατήρηση των οικοσυστημάτων. Αναμφισβήτητα συντελεί στην ευημερία του ανθρώπου (Jones and Hinsinger, 2008). Μεγάλοι πληθυσμοί κατώτερων και ανώτερων οργανισμών διαβούν στο έδαφος και συντελούν στην αναγέννηση και διατήρηση της ποιότητας του, συνεισφέροντας στους κύκλους των θρεπτικών στοιχείων (Εικόνα 1.1), στις μετατροπές της οργανικής ουσίας και στη δημιουργία εδαφικής δομής. Αυτές οι πολύπλοκες και ποικίλες λειτουργικές ομάδες των οργανισμών του εδάφους δίνουν στο έδαφος σταθερότητα ή τη 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 and Zeiger, 1998), συμβάλλοντας έτσι στην διατήρηση της γονιμότητας των εδαφών.



**Εικόνα 1.1:** 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) Γενικό δίκτυο του αζώτου (Ahn, 2006).

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. Ο Metting, εκτίμησε

## Εισαγωγή

ότι ένα γραμμάριο γόνιμου εδάφους περιέχει  $10^5$ – $10^8$  cfu βακτήρια,  $10^6$ – $10^7$  cfu ακτινομύκητες και  $10^5$ – $10^6$  μύκητες (Metting, 1993). Η μικροβιακή δραστηριότητα στο έδαφος είναι συνάρτηση της διαθεσιμότητας του άνθρακα.

Τα περισσότερα βακτήρια του εδάφους είναι μεσόφιλα με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους να κυμαίνεται από 25–35°C και όρια από 15 έως και 45°C. Λιγότερα είναι τα ψυχρόφιλα με άριστη τους  $\leq 20^\circ\text{C}$ , ενώ πολλά ανήκουν στα θερμοφιλα με άριστη θερμοκρασία που κυμαίνεται ανάμεσα στους 45 και 65°C. *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Achromobacter*, *Bacillus* και *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. Η ριζόσφαιρα αποτελεί ένα χώρο υψηλών μικροβιακών πληθυσμών, έντονης μικροβιολογικής δραστηριότητας και ταχύτατων αλλαγών, όπου η παροχή άνθρακα είναι σταθερή. Βροχόπτωση, ξηρασία, pH, άλατα και οργανική ουσία αλληλοεπηρεάζονται με αποτέλεσμα έντονες διακυμάνσεις (Handelsman and Stabb, 1996). Ρίζες, ριζικά εκκρίματα, βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα, νηματώδης, ακάρεα και γαιοσκώληκες αλληλεπιδρούν σε ένα περιβάλλον που χαρακτηρίζεται ως ριζόσφαιρα. Το σύνολο των μικροοργανισμών, αναπτύσσονται μέσω παροχής θρεπτικών συστατικών από το ριζικό σύστημα των φυτών. Οι αποικούντες μικροοργανισμοί επηρεάζουν την ανάπτυξη, τη θρέψη και την υγεία του φυτού και της ρίζας (Mantelin and 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 μικροοργανισμοί 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.

## 1.2. Βακτήρια

Τα βακτήρια αποτελούν ένα μεγάλο κλάδο των προκαρυωτικών μικροοργανισμών (στους οποίους συμπεριλαμβάνονται εκτός από τα Βακτήρια και τα Αρχαία). Η πρώτη παρατήρηση βακτηρίων έγινε με τη χρήση ενός αυτοσχέδιου μικροσκοπίου από το 1676 από τον Antonie van Leeuwenhoek (Porter, 1976). Η πρώτη ονομασία που τους δόθηκε ήταν “ζωύφια”. Το σημερινό τους όνομα δόθηκε το 1828 από τον Christian Gottfried Ehrenberg.

Πρόκειται για μονοκύτταρους (σπάνια πολυκύτταρους), μικροσκοπικούς προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίοι συναντώνται σε πολύ μεγάλους πληθυσμούς σε κάθε είδους βίοτοπο. Έχουν μέγεθος μερικά μικρόμετρα (0,5-5 μm), και ποικίλα σχήματα. Τα περισσότερα είναι τριών μορφών: σφαιρικού (coccus), ραβδοειδούς (bacillus), σπειροειδούς (spirillum).

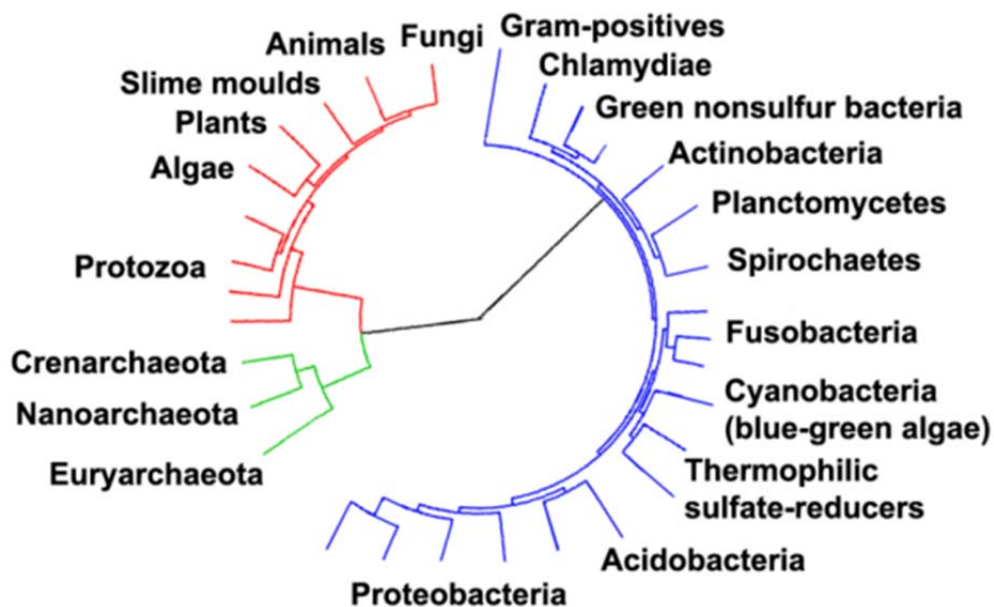
Το γενετικό υλικό των προκαρυωτικών κυττάρων είναι το DNA το οποίο εμφανίζεται με τη μορφή κυκλικού μορίου (βακτηριακό χρωμόσωμα). Το βακτηριακό χρωμόσωμα εντός του κυττάρου εμφανίζεται με μια συσπειρωμένη μορφή και η περιοχή όπου εντοπίζεται ονομάζεται πυρηνοειδές. Οι περισσότεροι προκαρυωτικοί οργανισμοί φέρουν μόνο ένα χρωμόσωμα, κάτι που από γενετικής άποψης, τους καθιστά απλοειδείς οργανισμούς, καθώς φέρουν ένα μοναδικό αντίτυπο κάθε γονιδίου. Επίσης δύναται να περιέχουν μικρές ποσότητες μη χρωμοσωμικού κυκλικού DNA που ονομάζονται πλασμίδια. Τα περισσότερα βακτήρια δεν έχουν ή έχουν ελάχιστες εσωτερικές μεμβράνες, πράγμα το οποίο συνεπάγεται την έλλειψη αρκετών οργανιδίων, ενώ τα περισσότερα από αυτά φέρουν κυτταρικό τοίχωμα το οποίο είναι διαφορετικό από αυτό των ανώτερων οργανισμών πλούσιο σε πεπτιδογλυκάνες. Διακρίνονται σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια στα οποία τα μόρια πεπτιδογλυκάνης βρίσκονται τοποθετημένα σε μια στοιβάδα, και σε θετικά κατά Gram βακτήρια όπου τα μόρια πεπτιδογλυκάνης βρίσκονται σε πολλαπλές αλληλεπικαλυπτόμενες στοιβάδες (Siefert et al., 1998).

Τα βακτήρια εντοπίζονται στα περισσότερα περιβάλλοντα (έδαφος, νερό, οργανική ύλη, ζωντανούς ιστούς, ραδιενεργά, τοξικά απόβλητα κ.α.), ενώ τυπικά φαίνεται να υπάρχουν περισσότερα από 40 εκατ. βακτηριακά κύτταρα σε κάθε γραμμάριο εδάφους και 1 εκατ. κύτταρα σε κάθε ml φρέσκου νερού. Μεγάλο μέρος των βακτηρίων υπολογίζεται ότι δεν έχουν ταυτοποιηθεί, ενώ μόνο τα μισά φύλα από τα διάφορα είδη βακτηρίων μπορούν να καλλιεργηθούν σε συνθήκες εργαστηρίου (Madigan et al., 2005).

### 1.2.1. Ταξινόμηση Βακτηρίων

Τα βακτήρια αρχικά είχαν τοποθετηθεί στο βασίλειο των Plantae, αποτελώντας την τάξη Schizomycetes όπου μαζί με τα Schizophyceae (μπλε-πράσινα φύκη/ Κυανοβακτήρια) αποτελούσαν το φύλο Σχιζόφυτα. Το 1866 ο Ernst Haeckel στο βιβλίο του *Generelle Morphologie der Organismen* τοποθετεί τα Βακτήρια στο βασίλειο των Πρωτίστων και στο φύλο Μονήρη. Υποδιαιρεί μάλιστα το φύλο Μονήρη σε δυο ομάδες: στα βακτήρια με βακτηριακό φάκελο (περιελάμβανε γένη όπως *Bacterium*, *Bacillus* και *Spirillum*) και στα βακτήρια χωρίς βακτηριακό φάκελο (που περιελάμβανε τα γένη *Protomonas* και *Vampyrella* τα οποία πλέον ταξινομούνται στους Ευκαρυώτες).

Σήμερα, τα Βακτήρια (Cavalier-Smith, 2004) ανήκουν στο δικό τους Βασίλειο (αυτό των Βακτηρίων) το οποίο φέρει δυο υποδιαιρέσεις, τα Negibacteria (που περιλαμβάνουν τα φύλα *Eobacteria*, *Sphingobacteria*, *Spirochaetae*, *Proteobacteria*, *Planctobacteria*, *Cyanobacteria*) και τα Unibacteria (με τα φύλα *Posibacteria* και *Archaeobacteria*) (Εικόνα.1.2).



Εικόνα 1.2: Φυλογενετικό Δέντρο της Ζωής (<http://en.wikipedia.org/wiki/Bacteria> )

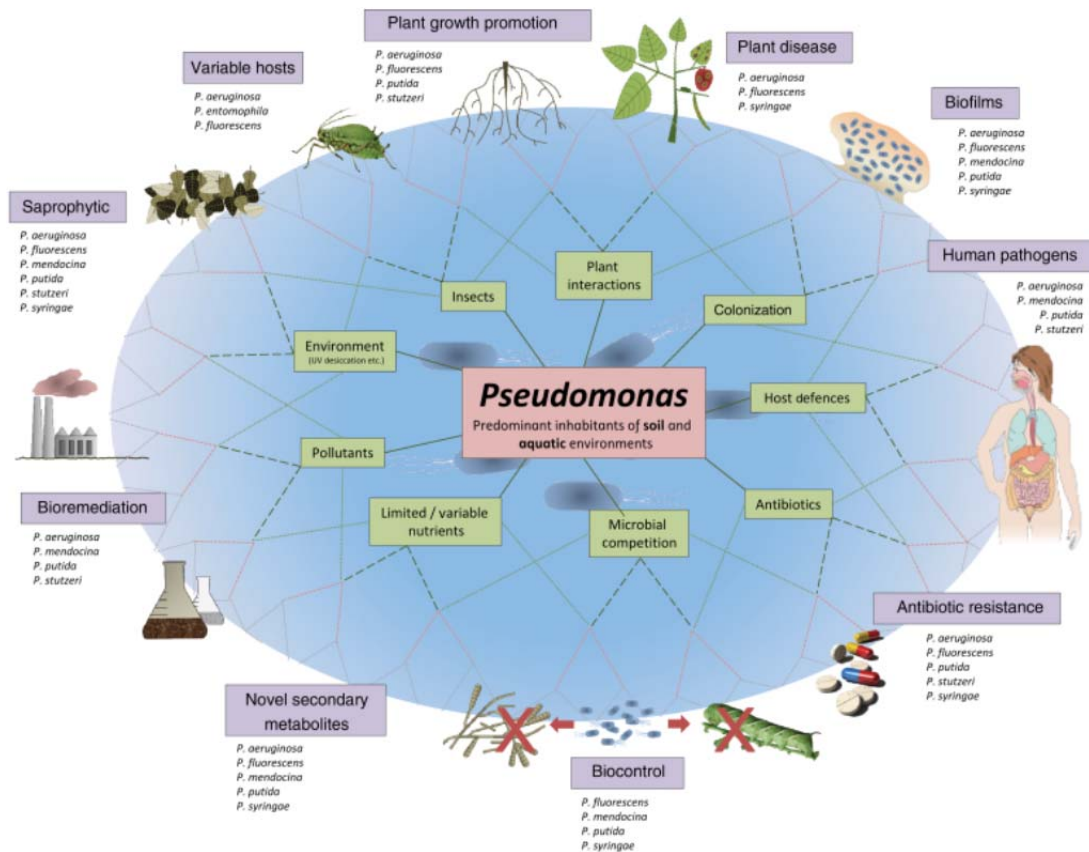
### 1.3. Βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

Το γένος *Pseudomonas* ανήκει στα γ-πρωτεοβακτήρια, στην οικογένεια των Pseudomonaceae, ενώ περιλαμβάνει περισσότερα από 191 είδη (Euzeby, 1997). Μέλη του γένους *Pseudomonas* εμφανίζουν αξιοσημείωτη μεταβολική και φυσιολογική ποικιλομορφία, γεγονός που τους επιτρέπει να αποικίζουν διάφορους χερσαίους και υδάτινους οικολογικούς θώκους (Εικόνα 1.3). Μέλη του γένους έχουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της σπουδαιότητας τους σε ασθένειες των φυτών και των ανθρώπων καθώς και της δυνατότητας να αξιοποιηθούν σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Τα είδη του γένους *Pseudomonas* ταξινομήθηκαν προς τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, ενώ η ετυμολογία του ονόματος τους είναι Ψευδής Μονάδα (Palleroni, 2010). Κατά τον Krieg (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984) τα διάφορα είδη του γένους *Pseudomonas* εμφανίζουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- ραβδόμορφα
- αρνητικά κατά Gram
- με ένα ή περισσότερα πολικά μαστίγια
- αερόβια
- μη σποροπαραγωγά

Σχετικά πρόσφατα (Anzai, 2000) η αλληλούχηση του 16S rRNA, μας οδήγησε στη διαπίστωση ότι είδη που μέχρι τώρα συγκαταλέγονταν στο γένος *Pseudomonas* ανήκαν σε διαφορετικά γένη (π.χ. *Ralstonia*) και αντίστροφα, αλλάζοντας έτσι την ταξινομική κατάταξη πολλών βακτηρίων.



**Εικόνα 1.3:** Συγκεντρωτική απεικόνιση των οικολογικών θόκων που απαντάται η *P. stutzeri*

### 1.3.1. *Pseudomonas stutzeri*

#### 1.3.1.1. Απομόνωση

Η *P. stutzeri* απομονώθηκε για πρώτη φορά από τους Burri & Stutzer το 1895 ως *Bacillus denitrificans* II και ονομάστηκε *P. stutzeri* από τους Van Niel & Allen το 1952. Η πρώτη διαπίστωση της ικανότητάς του να δεσμεύει ατμοσφαιρικό άζωτο έγινε το 1987 από την έρευνα των Krotzky & Werner.

#### 1.3.1.2. Διαδικασίες απομόνωσης

Η ανίχνευση της *P. stutzeri* στηρίζεται σε δύο μεθόδους: 1) τον εμπλουτισμό και την απομόνωση καθαρών καλλιεργειών, 2) την άμεση ανάλυση χωρίς την ανάγκη καλλιέργειας. Και οι δύο μέθοδοι είναι απαραίτητες για οικολογικές μελέτες και για την κατανόηση του ρόλου των ειδών στο περιβάλλον. Μια καλή μέθοδος καλλιέργειας για τον εμπλουτισμό των απονιτροποιητικών βακτηρίων γενικά και την απομόνωση της *P. stutzeri* ανακαλύφθηκε από τον Iterson το 1902 (αυτή η ανακάλυψη περιγράφηκε το 1952 από τους Van Niel και Allen. Για την καλλιέργεια της *P. stutzeri* χρησιμοποιείται ένα θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο αποτελείται από 2% νιτρικά, σε αναερόβιες συνθήκες και τρυγικό οξύ (ή μηλικό, κιτρικό, ηλεκτρικό, οξικό, αιθανόλη). Το τρυγικό οξύ υπό αναερόβιες συνθήκες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικό



υπόστρωμα κι από άλλα βακτήρια του δείγματος. Η επώαση σε θερμοκρασία 37 °C κι άνω, σε συνδυασμό με συνθήκες απονιτροποίησης μας προσδίδει καλύτερο εμπλουτισμό. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανάγνωση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA έχουν σχεδιαστεί για να ανιχνεύεται η ύπαρξη της *P. Stutzeri*, στο ολικό DNA του δείγματος που έχει συλλεχθεί από το περιβάλλον. Ο Bennasar et al., το 1998, σχεδίασε εκκινητές για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), λαμβάνοντας υπόψη τα μέχρι τότε γνωστά *genomovars*, της *P. stutzeri*. Η διαδικασία αυτή χρησιμεύει ως δοκιμασία επιβεβαίωσης όπως επίσης χρησιμεύει και η πέψη του PCR προϊόντος με την περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII (Bennasar et al., 1998). Ο Amann et al. εξέτασε την δημιουργία ενός DNA-ιχνηθέτη ώστε να καταστεί δυνατή η ανίχνευσή όλων των στελεχών της *P. stutzeri* (Amann et al., 1996). Αποτέλεσμα αυτής της μελέτης ήταν ο σχεδιασμός ενός DNA-ιχνηθέτη για συγκεκριμένη DNA αλληλουχία που ανήκει εντός του 23S rRNA. Ο ιχνηθέτης αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα φθορισμού *in situ* DNA-υβριδισμού, για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της *P. stutzeri* σε περιβαλλοντικά δείγματα. Παρόλα αυτά δεν είναι δυνατή η ανίχνευση όλων των στελεχών της *P. stutzeri* λόγω της μεγάλης ποικιλότητας του είδους ακόμα και όταν χρησιμοποιείται ως στόχος το σπερόνιο *rrn*. Εκτός των γονιδίων *rrn* και άλλα γονίδια χρησιμοποιούνται σήμερα για την λειτουργική ανάλυση των οικοσυστημάτων. Τα γονίδια που χρησιμοποιούνται είναι τα *nirS* ή *nosZ* τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της απονιτροποίησης (Braker et al., 2000) και *nifH* για την ανάλυση διαζωτροφικών βακτηρίων στη ριζόσφαιρα (Dialo et al., 2004). Το 2001 οι Grüntzig και συνεργάτες ανέπτυξε μια πολύ ευαίσθητη μέθοδο βασισμένη στην PCR πραγματικού χρόνου, όπου αναλύθηκε DNA το οποίο απομονώθηκε από χώμα (Grüntzig et al., 2001). Εντούτοις, με τη μέθοδο αυτή, δε μπορεί να ενισχυθεί το DNA όλων των στελεχών του είδους. Η ταυτόχρονη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών PCR καθώς και ενός ανιχνευτή που δεσμεύεται σε περιοχή εσωτερικά του απονιτροποιητικού γονιδίου *nirS*, καθιστά δυνατή την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ελάχιστου αριθμού κυττάρων (λιγότερα από 100) που εντοπίζονται σε ένα δείγμα.

Κατά την ανάλυση του πληθυσμού της *P. stutzeri* σε δείγματα θαλασσίων υδάτων, οι Ward και Cockcroft χρησιμοποίησαν μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης του στελέχους ZoBell του οποίου η πρωταρχική ονομασία ήταν *Pseudomonas perfectomarina* (Ward and Cockcroft, 1993).

Οι Sikorski και συνεργάτες κατόρθωσαν να απομονώσουν στελέχη της *P. stutzeri* από υδάτινους οικοτόπους και χερσαία οικοσυστήματα ακολουθώντας μια διαδικασία δύο σταδίων. Σε πρώτη φάση, η ανίχνευση κυττάρων της *P. stutzeri* έγινε με τη χρήση μιας ήδη χρησιμοποιούμενης μεθόδου PCR που είχε υποστεί μερικές

τροποποιήσεις (Bennasar et al., 1998, Sikorski et al., 2002). Σε δεύτερη φάση, τα θετικά δείγματα εξετάστηκαν βάσει της μορφολογίας των σχηματισθέντων αποικιών υπό αερόβιες συνθήκες, επί τεχνητού θαλασσίου στερεού θρεπτικού μέσου που περιείχε ως πηγή άνθρακα είτε αιθυλενογλυκόλη, είτε άμυλο είτε μαλτόζη (Sikorski et al. 2002). Η χαρακτηριστική μορφολογία των αποικιών της *P. stutzeri* οδήγησε σε μια ιδιαίτερα αποτελεσματική διαδικασία απομόνωσης: μία αποικία *P. stutzeri* εντοπίστηκε ανάμεσα σε 9.100 αποικίες άλλων βακτηρίων.

Εντούτοις, πολλά στελέχη της *P. stutzeri* που έχουν μελετηθεί λεπτομερώς είχαν απομονωθεί βάσει των μεταβολικών τους ιδιοτεροτήτων. Δεν απομονώθηκαν βάσει της ικανότητας απονιτροποίησης επειδή η *P. stutzeri* ήταν ο στόχος της μελέτης.

### **1.3.1.3. Φαινοτυπικές Ιδιότητες**

Εκτός από τη μελέτη των van Niel και Allen το 1952, οι μοναδικές εργασίες που περιέχουν λεπτομερείς περιγραφές των φαινοτυπικών ιδιοτήτων της *P. stutzeri* είναι εκείνες των Stanier και συνεργατών το 1966 και των Rossello – Mora και συνεργατών το 1994 (Rosselló-Mora et al., 1994, Stanier et al., 1966).

Στελέχη της *P. stutzeri*, όπως και τα περισσότερα είδη του γένους *Pseudomonas* μπορούν να αναπτυχθούν σε καθορισμένα θρεπτικά μέσα που περιέχουν νιτρικά ιόντα και απλά οργανικά μόρια ως πηγή άνθρακα και ενέργειας χωρίς την απαίτηση πρόσθετων αυξητικών παραγόντων. Αξίζει να σημειωθεί ένα σπάνιο χαρακτηριστικό του γένους της *Pseudomonas*: μερικά στελέχη της *P. stutzeri* έχουν χαρακτηριστεί ως διαζωτροφικά. Κανένα από τα στελέχη της *P. stutzeri* δεν αντέχουν το όξινο περιβάλλον και δεν έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν σε pH 4,5. Η *P. stutzeri* εμφανίζει αερόβιο μεταβολισμό, με το οξυγόνο να είναι ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων. Ωστόσο, όλα τα στελέχη σε αναερόβιες συνθήκες μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα νιτρικά ιόντα ως εναλλακτικό αποδέκτη ηλεκτρονίων επιτελώντας απονιτροποίηση. Η απονιτροποίηση μπορεί να εμφανιστεί καθυστερημένα ή μπορεί να εμφανιστεί μόνο μετά από διαδοχικές εμβολιασμούς σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν νιτρικά ιόντα υπό ημιαερόβιες συνθήκες (Cladera et al., 2005, Stanier et al., 1966). Στην οξειδωτική αποδόμηση των αρωματικών ενώσεων εμπλέκονται μονο-και δι-οξυγονάσες. Ο σχηματισμός κατεχόλης ή πρωτοκατεχολικών παραγώγων είναι τα κεντρικά ενδιάμεσα σε αυτή την πορεία. Ένα από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της *P. stutzeri* είναι η ικανότητα του να διασπά το άμυλο. Το τελικό προϊόν της διάσπασης του αμύλου είναι η μαλτοτριόζη που σχηματίζεται με τη δράση του ενζύμου εξω-αμυλάση και η οποία έχει μελετηθεί σε μοριακό επίπεδο (Morishita et al., 1997). Οι Obradors και Aguilar έδειξαν ότι το *P.*

*stutzeri* αποικοδομεί την πολυαιθυλενογλυκόλη δίδοντας αιθυλενογλυκόλη (Obradors and Aguilar, 1991).

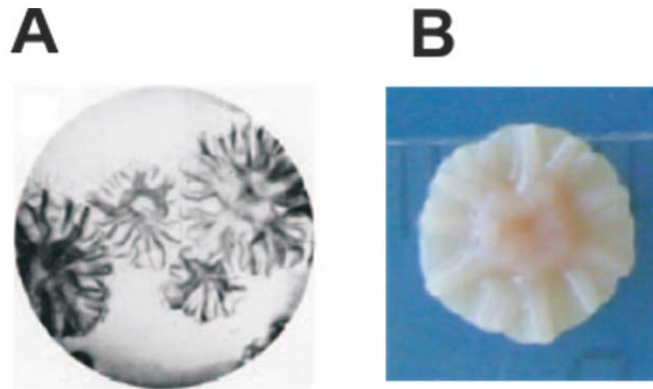
Το σύστημα της υδρολυτικής απαμίνωσης της αργινίνης σε ορνιθίνη χρησιμοποιείται συχνά ως εργαλείο ταξινόμησης και διαχωρισμού των οργανισμών. Κανένα από τα στελέχη της *P. stutzeri* δεν εμφανίζουν την ικανότητα να επιτελέσουν την συγκεκριμένη βιοχημική πορεία, καθώς επίσης δεν έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιήσουν ως πηγή ενέργειας το γλυκογόνο και την ζελατίνη.

#### 1.3.1.3.1. Τύπος και δομή αποικιών

Οι αποικίες της *P. stutzeri* μπορούν εύκολα να διακριθούν λόγω του ασυνήθιστου σχήματός τους και της συνοχής τους (Εικόνα 1.4). Αποικίες που μόλις έχουν σχηματιστεί είναι προσκολλημένες, έχουν μια χαρακτηριστική πτυχωτή εμφάνιση και έχουν χρώμα καστανό, όχι κίτρινο. Η υφή τους είναι συνήθως σκληρή, ξηρή, και με μεγάλη σχετικά συνεκτικότητα. Είναι δυνατόν να απομακρυνθεί μια στερεή επιφάνεια ολόκληρης αποικίας του *P. stutzeri*, χωρίς να καταστραφεί η δομή της. Οι αποικίες της *P. stutzeri* θα μπορούσαν να παρομοιαστούν με κρατήρες με υψηλές κορυφογραμμές που συχνά διακλαδίζονται και συγχωνεύονται. Πολλές φορές περιγράφεται ότι έχουν δομή κοραλλιών. Εμφανίζουν περισσότερες βλενώδεις προεξοχές στην περιφέρεια από ό, τι σε άλλες περιοχές. Η συχνή εμφάνιση του ακανόνιστου πολυγώνου έχει επίσης παρατηρηθεί από τους van Niel and Allen, 1952. Τα σχήματα των αποικιών δεν είναι ούτε ενιαία ούτε αναγκαστικά σταθερά, αλλά αλλάζουν εμφάνιση με την πάροδο του χρόνου. Μετά από επανειλημμένες ανακαλλιέργειες σε θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο, οι αποικίες μπορούν να εμφανίζουν πιο ομαλά χαρακτηριστικά (λείες αποικίες), πιο μαλακίες στην υφή και πιο ανοιχτόχρωμες. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται ως αποικιακή αποσύνδεση. Το στέλεχος CMT.9.A εμφανίζει την ικανότητα υδρόλυσης του άγαρ. Πρόκειται για μια σπάνια ικανότητα και την εμφανίζουν συνήθως θαλάσσια βακτήρια. Ωστόσο, η εμφάνιση της υδρόλυσης του άγαρ από τα βακτήρια μπορεί να περιοριστεί στο φαινόμενο που είναι γνωστό ως "σκάσιμο" του άγαρ (Alexander and Lewis, 1976). Ο Sorokin και οι συνεργάτες του έχουν παρουσιάσει μια πολύ λεπτομερή περιγραφή της μορφολογίας των αποικιών και τη διαφοροποίηση μεταξύ τύπου R και τύπου S (Sorokin et al., 1999). Οι R-τύπου αποικίες είναι εμφανίζουν σταθερότητα, αλλά ο τύπος S παράγει και τα δύο είδη αποικιών υπό κατάλληλες συνθήκες. Λείες αποικίες που καλλιεργούνται σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα στους 30°C και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 4°C για 24 ώρες συχνά αναπτύσσουν μια χαρακτηριστική πτυχωτή εμφάνιση (Lalucat et al., 2006)

## Εισαγωγή

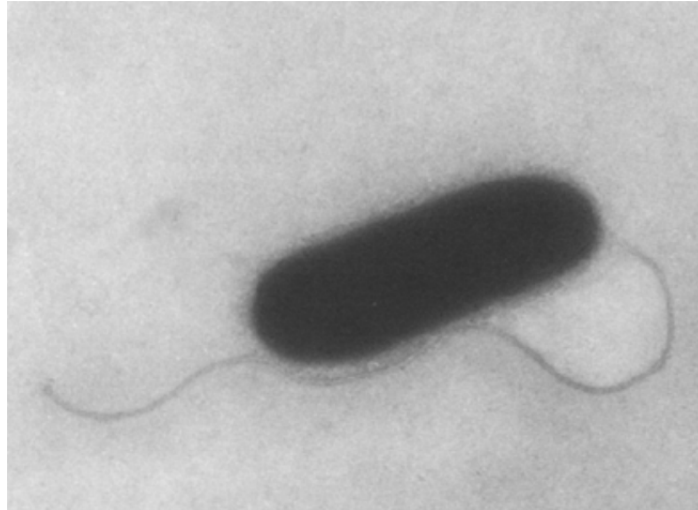
Η *P. stutzeri* ανήκει στα άχρωμα είδη του γένους, αν και πολλά στελέχη εμφανίζουν αποικίες χρώματος σκούρου καφέ. Αυτό οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση του *κυτοχρώματος c* στα κύτταρα. Οι παραγόμενες ενδοκυττάρειες χρωστικές ουσίες δεν εξέρχονται των κυττάρων και κατά συνέπεια δεν διαχέονται στα στερεά υποστρώματα.



**Εικόνα 1.4:** Απεικόνιση των αποικιών της *P. stutzeri* όπου φαίνεται η πτυχωτή της επιφάνεια (Lalucat et al. 2006).

### 1.3.1.3.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Τα κύτταρα της *P. stutzeri* εμφανίζουν κινητικότητα και είναι κυρίως μονότριχα (αποτελούνται από ένα μαστίγιο) (Εικόνα.1.5). Σε μερικές περιπτώσεις, εμφανίζουν και πλευρικά μαστίγια. Αυτό συμβαίνει ιδιαίτερα σε νέους πληθυσμούς που αναπτύσσονται επί πολύπλοκων στερεών υλικών. Αυτά τα πλευρικά μαστίγια μπορούν να εντοπιστούν με την χρήση χρώσης κατάλληλης για μαστίγια (Palleroni et al., 1970). Έχει προταθεί ότι τα πλευρικά μαστίγια μάλλον εμπλέκονται στην εξάπλωση και την δημιουργία σύσπασης για την κινητικότητα του πληθυσμού επί στερεών επιφάνειες (Shinoda and Okamoto, 1977). Ωστόσο, η ύπαρξη νηματίων τύπου IV μπορεί επίσης να ευθύνονται για την ικανότητα κίνησης. Στατιστικά, ο μεγαλύτερος αριθμός των μαστιγοφόρων κυττάρων εμφανίζεται στην αρχή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (Lautrop and Jessen, 1964). Το 70% των κυττάρων του στελέχους AN11 μετρήθηκε ότι ήταν μαστιγοφόρα: το 38% είχε μόνο ένα μαστίγιο, και το 31% είχε ένα ή περισσότερα πρόσθετα μαστίγια τοποθετηθεί πλευρικά (Cozar, 1987).



**Εικόνα 1.5:** Φωτογραφία της *P. stutzeri* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όπου διακρίνεται το μαστίγιο (Krotzky & Werner, 1987).

Σε κάποιες περιπτώσεις η ύπαρξη μαστιγίων χρησιμοποιείται ως το μοναδικό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό για την ταξινόμηση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η περίπτωση του στελέχους ZoBell. Το στέλεχος (ATCC 14405) έχει απομονωθεί ως θαλάσσιο βακτήριο και περιγράφεται από τους ZoBell και Urdam ως *Pseudomonas perfectomarinus* το 1944. Στη συνέχεια, ο οργανισμός αυτός αποτέλεσε το μοναδικό μέλος του είδους *P. perfectomarina*. Η έλλειψη μαστιγίων τονίστηκε από την ταξινόμηση του σε ένα νέο είδος, αν και οι συγγραφείς που πρώτοι περιέγραψαν αυτό το στέλεχος δήλωσαν ότι εμφάνιζε κινητικότητα (Baumann et al., 1983; Zobel and Urdam, 1944). Μετά από τρεις διαδοχικές ανακαλλιέργειες επί ημιστερεού θρεπτικού μέσου, βρέθηκε ότι σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% των κυττάρων εμφανίζονταν η ύπαρξη μαστιγίων. Αυτό το στέλεχος που όπως φάνηκε εμφανίζει αντιστροφή των μορφολογικών του χαρακτηριστικών φέρει ένα ενιαίο πολικό μαστίγιο (Rosselló-Mora et al., 1993).

Οι Parales και συνεργάτες έχουν αναφέρει ότι όλα τα είδη της *Pseudomonas* εμφανίζουν την ικανότητα κίνησης με τη χρήση ενός ή περισσοτέρων πολικών μαστιγίων και είναι ιδιαίτερα χημειοτακτικά (Parales et al., 2004). Το *P. stutzeri* δεν αποτελεί εξαίρεση. Η χημειοτακτική ικανότητα όλων των ειδών της *Pseudomonas* δεν έχει μελετηθεί ακόμα λεπτομερώς. Επιπλέον, το εύρος των ουσιών που προκαλούν είτε προσέλκυση είτε απώθηση των κυττάρων καθώς και οι περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες τα είδη της *Pseudomonas* ανταποκρίνονται παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητα. Έχει παρατηρηθεί ότι προσελκύονται από όλες σχεδόν τις οργανικές ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως υποστρώματα ανάπτυξης. Ωστόσο, φαίνεται ότι έλκονται και από ενώσεις που δεν μπορούν να

μεταβολίσουν. Οι Ortega-Calvo και συνεργάτες μελέτησαν την χημειοτακτική απάντηση αρκετών ειδών *Pseudomonas* έναντι των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (Ortega-Calvo et al., 2003). Το στέλεχος *P. stutzeri* CMT.9A συμπεριλήφθηκε στη μελέτη η οποία έδειξε ότι το στέλεχος αυτό έχει την ικανότητα να υποβαθμίζει τη ναφθαλίνη, το φαινανθρένιο, και το ανθρακένιο. Επιπροσθέτως, αποδείχθηκε ότι το εν λόγω στέλεχος εμφανίζει θετική χημειοταξία έναντι της ναφθαλίνης. Σε εργαστηριακή κλίμακα φάνηκε ότι η χημειοταξία μπορεί να ενισχύσει τη βιοαποικοδόμηση των ρύπων στην ριζόσφαιρα.

Τα είδη του *Pseudomonas* διαθέτουν μια σειρά από διαφορετικές πρωτεΐνες προσκόλλησης που διευκολύνουν την αρχική προσκόλληση των κυττάρων σε ένα υπόστρωμα. Αυτό οδηγεί σε σχηματισμό βιοφίλμ. Και τα μαστίγια αλλά και τα ινίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυρίως στον αρχικό σχηματισμό των αποικιών σε επιφάνειες που είτε ευνοείται είτε όχι η ανάπτυξη των κυττάρων. Η αρχική ανάπτυξη βιοφίλμ του *P. aeruginosa* φαίνεται να εξαρτάται από τα τύπου IV ινίδια. Το *P. stutzeri* διαθέτει τόσο μαστίγια όσο και ινίδια, αλλά δεν έχει περιγραφεί να έχει την ικανότητα να δημιουργεί βιοφίλμ. Τα ινίδια τύπου IV παρέχουν στα στελέχη του *P. stutzeri* την ικανότητα κίνησης μέσω της σύσπασής τους (βακτηριακή κίνηση που βασίζεται στη έκταση / συρρίκνωση του ινιδίου).

### 1.3.1.3.3. Χημικός χαρακτηρισμός και χημειοταξινόμηση

#### 1.3.1.3.3.1. Σύσταση βάσεων DNA

Το G+C περιεχόμενο του γενομικού DNA είναι ένα χρήσιμο χαρακτηριστικό της ταξινόμησης για την οριοθέτηση των ειδών. Έχει προταθεί ότι αν το G+C περιεχόμενο δυο στελεχών διαφέρει πάνω από 5%, τότε τα στελέχη αυτά δεν πρέπει να ταξινομηθούν στο ίδιο είδος (Rosselló-Mora and Amann, 2001). Το όριο του G+C περιεχομένου για την διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών είναι το 10%. Το G+C περιεχόμενο των στελεχών του *P. stutzeri* έχει προσδιοριστεί μέσω του προσδιορισμού της θερμικής αποδιάταξης του DNA και μέσω της ενζυμικής υδρόλυσής του και την περαιτέρω ανάλυσή του με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής επίδοσης (HPLC). Οι αναφερόμενες τιμές εμφανίζουν μεγάλο σχετικά εύρος το οποίο όμως βρίσκεται εντός των κοινώς αποδεκτών ορίων για τον καθορισμό ενός είδους (Palleroni et al., 1970; Rosselló et al., 1991).

#### 1.3.1.3.3.2. Πρωτεϊνικό πρότυπο

Το πρωτεϊνικό πρότυπο του συνόλου των κυτταρικών πρωτεϊνών που λαμβάνεται από την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) εμφανίζει μεγάλη εξατομίκευση σε επίπεδο

στελέχους. Τα πρότυπα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατηγοριοποίηση διαφόρων στελεχών (Pot et al., 1994). Τα στελέχη της *P. stutzeri* έχειδειχθεί ότι εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια (Rainey et al., 1994; Rosselló-Mora et al., 1994). Η ανάλυση των πρωτεϊνικών ιχνών επί του πηκτώματος είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία δένδρογράμματος το οποίο βρίσκεται σε μεγάλη συμφωνία με αυτά που έχουν δημιουργηθεί με την κατάταξη με την χρήση των *genomovar* (Vancanneyt et al., 1996). Τα αποτελέσματα δεν θα πρέπει να αποτελέσει έκπληξη δεδομένου του γεγονότος ότι η ανάλυση των ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των κυττάρων αντικατοπτρίζει τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες στο γενομικό DNA. Τα *genomovars* έχουν προσδιοριστεί μέσω των τιμών ομοιότητας που έχουν προκύψει από πειράματα υβριδισμού ολικού DNA/DNA.

### I.3.1.3.3.3. LPS και ανοσολογικά χαρακτηριστικά

Οι λιποπολυσακχαρίτες είναι τα κύρια μόρια στην επιφάνεια του κυττάρου που δρουν ως αντιγόνα. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο θερμικά σταθερό O-αντιγόνο του γένους. Η εξειδίκευση των αντισωμάτων σχετίζεται με τη σύσταση των πολυσακχαρικών αλυσίδων οι οποίες εκκίνονται στο εξωτερικό του κυττάρου. Πειράματα με αντιπροσωπευτικά στελέχη από τα επτά γνωστά *genomovar* έχουν δείξει σημαντικές διαφορές αντιγονικότητας που οφείλονται στην ανομοιογένεια των λιποπολυσακχαριτών ως προς το O-αντιγόνο μεταξύ των στελεχών. Στην εργασία των Rossello και συνεργατών δείχθηκε ότι αντιγονική ομοιότητα εμφανίζεται μόνο μεταξύ στελεχών τα οποία ανήκουν στο ίδιο *genomovar* (Rosselló et al., 1992). Η μελέτη των πρωτεϊνών των εξωτερικών μεμβρανών με τη χρήση της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες έδειξε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές σε πρωτεϊνικό επίπεδο μεταξύ των στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικά *genomovars*.

### I.3.1.3.3.4. Σύσταση λιπαρών οξέων

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα είναι ένας πολύ καλός δείκτης ταξινομικής για το διαχωρισμό του γένους από άλλα γένη που περιλαμβάνονταν παλαιότερα στο γένος της *Pseudomonas* (π.χ., Burkholderia). Αυτά τα χημειοταξονομικά χαρακτηριστικά είναι πολύ χρήσιμα για την αναγνώριση. Μελέτες της σύνθεσης των λιπαρών οξέων των ειδών του *Pseudomonas* (Ikemoto et al. 1978; Oyaizu and Komagata 1983; Stead 1992; Vancanneyt et al., 1996) αποκάλυψε ότι τα ευθείας αλυσίδας κορεσμένα λιπαρά οξέα C<sub>16:0</sub> καθώς και τα ευθείας αλυσίδας ακόρεστα λιπαρά οξέα C<sub>16:1</sub> και C<sub>18:1</sub>, ήταν τα πλέον άφθονα. Το σύνολο αυτών των λιπαρών οξέων αντιπροσωπεύουν το 82,3% του συνόλου των λιπαρών οξέων στο *P.*

*stutzeri*. Μικρές ποσότητες από τα υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα 3-OH C<sub>10:00</sub> και 3-OH C<sub>12:00</sub> επίσης ανιχνεύθηκαν (Rosselló-Mora et al., 1994). Δεν εμφανίστηκαν σημαντικές διαφορές στη σύσταση λιπαρών οξέων μεταξύ διαφορετικών *genomovars*. Μέλη του 6<sup>ου</sup> *genomovar* εμφάνισαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε *cis*-9,10-μεθυλενεξαδεκανοϊκό (17:0) και *cis*-9,10-μεθυλενοκταδεκανοϊκό (19: 0). Αυτή η χημειοταξονομική ιδιαιτερότητα, μαζί με άλλα χαρακτηριστικά, συνέβαλλε στην διάκριση του 6<sup>ου</sup> *genomovar* ως νέο είδος, το *Pseudomonas balearica* (Bennasar et al., 1996).

Η σύσταση των λιπαρών οξέων, πρέπει να προσδιορίζεται υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης, καθώς είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το υπόστρωμα ανάπτυξης (Mrozik et al., 2005a; Mrozik et al., 2005b)

#### I.3.1.3.3.5. Ενδοκυττάριο περιεχόμενο κινόνης και πολυαμινών

Ο προσδιορισμός του περιεχομένου κινόνης και πολυαμινών είναι ένα άμεσο χημειοταξονομικό εργαλείο αναγνώρισης. Η πουτρεσκίνη αποτελεί το κύριο συστατικό όλων των μελών του γένους του *Pseudomonas* (Busse and Auling 1988). Δύο είναι οι κύριες πολυαμίνες που ανιχνεύθηκαν στο *P. stutzeri*: η πουτρεσκίνη (35,0 έως 92,7 μmol/g (ξηρής μάζας) και η σπερμιδίνη (8,9 έως 29,2 μmol/g (ξηρής μάζας). Άλλες πολυαμίνες ανιχνεύθηκαν σε πολύ μικρές ποσότητες (Rosselló-Mora, 1992). Η ουβικινόνη Q-9 είναι η μοναδική κινόνη που ανιχνεύθηκε σε όλα τα στελέχη της *P. stutzeri* που μελετήθηκαν.

#### I.3.1.3.3.6. Περιεχόμενο πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων (PHA)

Γενικά, στα κύτταρα του *P. stutzeri* δεν έχει παρατηρηθεί να έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκούς εστέρες (PHA). Εξάιρεση αποτελεί ένα στέλεχος του είδους αυτού, το 1317 (He et al., 1998). Το στέλεχος αυτό απομονώθηκε από έδαφος το οποίο ήταν μολυσμένο με πετρέλαιο σε μια περιοχή εξόρυξης πετρελαίου στη βόρεια Κίνα. Ένα άλλο στέλεχος της *P. stutzeri*, YM1006, έχει απομονωθεί από το θαλασσινό νερό και εμφανίζει την ικανότητα αποδόμησης του πολυ-(3-υδροξυβουτυρικού) εστέρα παρόλο που δεν φαίνεται να εμφανίζει την ικανότητα να συσσωρεύει το υλικό αυτό. Το γονίδιο της εξωκυττάριας αποπολυμεράσης του πολύ-β-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα (*phaZPst*) έχει χαρακτηριστεί (Ohura et al., 1999).



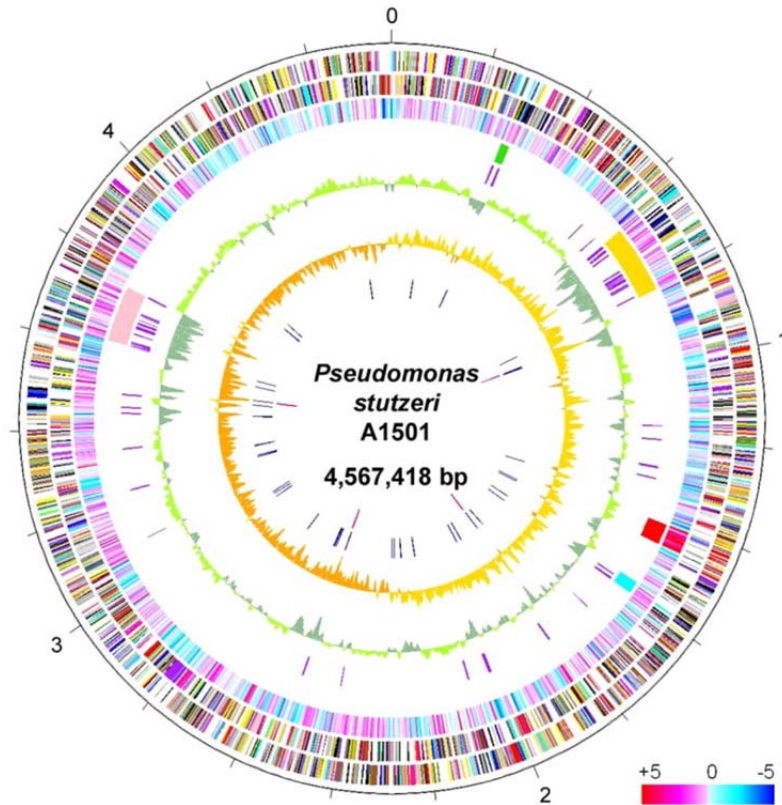
### 1.3.1.4. Χαρακτηρισμός γονιδιώματος και φυλογένεση

#### 1.3.1.4.1. DNA-DNA Υβριδισμοί

Η έννοια *genomovar* είχε αρχικά οριστεί για την *P. stutzeri* ως προσωρινή ταξονομική κατάσταση για τα ίδια ως προς το γονότυπο στελέχη, ανάμεσα στα είδη των βακτηρίων. Δύο στελέχη της *P. stutzeri* ταξινομούνται ως μέλη του ίδιου *genomovar*, όταν εμφανίζουν ομοιότητα στην αλληλουχία του DNA και είναι μέλη του ίδιου είδους (ομοιότητα άνω του 70% ή λιγότερο από 5°C διαφορά στη θερμοκρασία αποδιάταξης). Δύο στελέχη της *P. stutzeri* ανήκουν σε διαφορετικά *genomovars* είτε όταν εμφανίζουν ομοιότητα στην αλληλουχία DNA 15-50% είτε όταν η θερμοκρασία αποδιάταξης είναι μεγαλύτερη των 5°C.

#### 1.3.1.4.2. Μέγεθος γονιδιώματος

Η διαθεσιμότητα πληροφοριών σχετικά με τη δομή του γονιδιώματος είναι απαραίτητες για την ολοκληρωμένη βακτηριακή περιγραφή. Η συγκριτική ανάλυση των βακτηριακών χρωμοσωμάτων παρέχει πληροφορίες σχετικά με την γονιδιωματική ποικιλομορφία, τις φυλογενετικές σχέσεις και τη χρωμοσωμική δυναμική. Για το γένος *Pseudomonas*, η δομή του γονιδιώματος έχει μελετηθεί μόνο για τους οργανισμούς *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, και *P. stutzeri*. Οι Ginard και συνεργάτες μελέτησαν 20 στελέχη του *P. stutzeri* το 1997, που αντιπροσώπευαν τα επτά γνωστά εκείνη την εποχή *genomovars* (Ginard et al., 1997). Μελέτησαν επίσης, τον πλησιέστερο συγγενή του *P. stutzeri*, το *P. balearica*. Το γονιδίωμα των στελεχών της *P. stutzeri* αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα. Το μέγεθός του κυμαίνεται από 3,75 - 4,64 Mb, εμφανίζοντας 20% διακύμανση στο μέγεθος. Αρχικά το μέγεθος του γονιδιώματος της *P. aeruginosa*, υπολογίστηκε με την ανάλυση με την χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών και βρέθηκε ότι είναι 6,345 - 6,606 kb (διακύμανση μόνο 4%). Ωστόσο, μια πιο πρόσφατη έκθεση σχετικά με τα μεγέθη του γονιδιώματος της *P. aeruginosa* δείχνει μια διακύμανση 20% (5,2 - 7,1 Mb) (Schmidt et al., 1996) (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6: Γονιδίωμα του *P. stutzeri* (Yan et al 2008).

### 1.3.1.5. Ταυτοποίηση

#### 1.3.1.5.1. Φαινοτυπική ταυτοποίηση

Η φαινοτυπική ταυτοποίηση στηρίζεται στα χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό των ειδών (Bergan 1981; Gavini et al., 1989). Σήμερα, η χρήση διαφόρων διαθέσιμων εμπορικών σκευασμάτων στηριζόμενων στις ιδιότητες του μεταβολισμού των βακτηρίων και διενεργούνται συχνά με σκοπό τη μείωση του κόστους και του χρόνου που απαιτούν οι παραδοσιακές μέθοδοι. Τα σκευάσματα αυτά στηρίζονται σε χαρακτηριστικά που είναι μοναδικά για η *P. stutzeri* όπως η ικανότητα απονιτροποίησης ή χρήση της μαλτόζης ως θρεπτικό υλικό.

Ένα μικροβιακό κύτταρο εκφράζει περίπου 200 διαφορετικές πρωτεΐνες που μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Αυτή η μέθοδος παράγει πολύπλοκα πρότυπα πρωτεϊνικών ζωνών, τα οποία είναι εξαιρετικά ειδικά και μοναδικά για κάθε στέλεχος (Pot et al., 1994). Στελέχη με ομοιότητα του DNA τουλάχιστον το 70% τείνουν να έχουν ομοιότητες στα πρωτεϊνικά ηλεκτροφορογραφήματα. Ως εκ τούτου, πιστεύεται ότι η παραπάνω μέθοδος είναι μια ευαίσθητη τεχνική για την απόκτηση πληροφοριών σχετικά με τις ομοιότητες μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους ή υποειδών. Στελέχη μπορούν συχνά να αναγνωριστούν από πρωτεϊνικά πρότυπα. Τα πρωτεϊνικά σχέδια μπορούν να αναλυθούν με τη

βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή και εν συνεχεία τα πρότυπα αυτά να αποθηκεύονται έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά για την ανίχνευση της *P. stutzeri* (Vancanneyt et al., 1996).

#### 1.3.1.5.2. Μοριακή ταυτοποίηση

Η χρήση μιας αντίδρασης PCR και ενός ολιγονουκλεοτιδικού ιχνηθέτη αναπτύχθηκε ειδικά για την ανίχνευση και τον εντοπισμό της *P. stutzeri*. Οι εκκινητές και ο ιχνηθέτης σχεδιάστηκαν από την ανάλυση των διαθέσιμων ακολουθιών του 16S rRNA. Θέσεις που αφορούσαν ειδικά για την *P. stutzeri* και διέφεραν από τα υπόλοιπα είδη της *Pseudomonas* επιλέχθηκαν εντός της μεταβλητής περιοχής των 16S rRNA της *Pseudomonas*. Οι θέσεις 743 (G) και 746 (A) πληρούν τις απαιτούμενες προϋποθέσεις με αποτέλεσμα το σχεδιασμό ενός 21-νουκλεοτιδίων εκκινητή (*rps743*). Ένα δεύτερο ολιγονουκλεοτιδίο 17-νουκλεοτιδίων (*fps158*) σχεδιάστηκε, το οποίο δεσμεύεται στις θέσεις 142 με 158 και επιλέχθηκε ως ο δεύτερος εκκινητής της PCR. Η εξειδίκευση του παραγόμενου 625 ζευγών βάσεων PCR προϊόντος ταυτοποιήθηκε με τη χρήση ανιχνευτή DNA (17-νουκλεοτιδίων), που περιελάμβανε 12 βάσεις του 5' άκρου του εκκινητή *rps743* (Bennasar et al., 1998).

Ένα δεύτερο σετ εκκινητών, *fps158* και *rps1271*, αναπτύχθηκε από τους Bennasar και συνεργάτες (Bennasar et al., 1998). Το προϊόν της PCR με αυτό το ζεύγος των εκκινητών ήταν ένα τμήμα DNA μεγέθους 1159 ζευγών βάσεων το οποίο περιέχει μια θέση αναγνώρισης και δράσης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BamHI. Το αποτέλεσμα της πέψης είναι η δημιουργία δύο τμημάτων, των 695 και 465 ζευγών βάσεων, αντίστοιχα. Ένα ελαφρώς τροποποιημένο ζεύγος βάσεων της ίδιας περιοχής χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς από τους Sikorski και συνεργάτες (Sikorski et al., 2002).

Οι παραπάνω μέθοδοι επιτρέπουν τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση της *P. stutzeri* σε περιβαλλοντικά δείγματα.

#### 1.3.1.5.3. Πολυφασική ταυτοποίηση

Παρόλο που κατά γενική ομολογία το είδος του *P. stutzeri* είναι καλά καθορισμένο τόσο φαινοτυπικά όσο και χημειοταξινομικά ορισμένα από τα ξεχωριστά χαρακτηριστικά καλά μελετημένων στελεχών (υδρόλυση του αμύλου, δράση διυδρολάσης της αργινίνης, κλπ.) απουσιάζουν. Επιπλέον, πολλές βιοχημικές ιδιότητες ποικίλουν μεταξύ των στελεχών και δεν ακολουθούν την κατά *genomovar* κατάταξη. Απαιτείται λοιπόν για την κατάταξη ενός στελέχους της *P. stutzeri* μια πολυφασική ταξονομική προσέγγιση.

Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του στελέχους πρέπει να βρίσκονται σε συμφωνία με τα βασικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του είδους, πρέπει να τοποθετείται στον ίδιο κλάδο με το στέλεχος αναφοράς του *P. stutzeri* στα φυλογενετικά δέντρα μετά από σύγκριση ενός ή περισσοτέρων γονιδίων αναφοράς και πρέπει να επιδεικνύει DNA-DNA ομοιότητα άνω του 70% με ένα στέλεχος αναφοράς του αναγνωρισμένου *genomovar*. Εάν η τελευταία προϋπόθεση δεν πληρείται, το στέλεχος μπορεί να προταθεί ως ένα νέο *genomovar* εντός του είδους. Αν φαινοτυπικά διαφέρει από την *P. stutzeri*, μπορεί να προταθεί ως ένα νέο είδος.

### 1.3.1.6. Αζωτοδέσμευση

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. 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 and Baraqqio, 1994, Weaver and Graham, 1994). Επιπλέον, η αδυναμία ανάπτυξης ορισμένων τέτοιων οργανισμών σε εργαστηριακό επίπεδο (Roszak and Colwell, 1987) καθιστούν αδύνατη την *in vitro* παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αζωτοδεσμευτικών οργανισμών. Η παραγωγή αζώτου από τους παραπάνω οργανισμούς υπολογίζεται περί τα  $2 \times 10^{13}$  g/έτος (Falkowski, 1997). Η αντίστοιχη ποσότητα αζώτου που προέρχεται από την εκκένωση ατμοσφαιρικών ηλεκτρικών φορτίων υπολογίζεται στα  $10^{12}$  g/χρόνο.

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 TN ανά

έτος στη βιόσφαιρα (Hsu and Buckley, 2009).

*1.3.1.6.1. 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 and Van Breemen 1995; Christian et al., 1996; Chapelle et al., 2000; Lin et al., 2000; Kercher and Chambers 2001; Corbeels et al., 2005; Bruce et al., 2006; McNeil et al., 2006).

Ρόλο κλειδί στη διεργασία της αζωτοδέσμευσης 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 and 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).

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).

Εκτεταμένη μελέτη των γονιδίων του συμπλόκου της νιτρογενάσης (*nif* γονίδια) έχει λάβει χώρα στα είδη των *Klebsiella pneumoniae* (*oxytoca*) και *Azotobacter vinelandii*. Αρχικά υπήρχε η αντίληψη ότι το *P. stutzeri*, δεν είχε την ικανότητα της δέσμευσης του αζώτου. Ύστερα από εκτεταμένες μελέτες αποδείχθηκε η ύπαρξη γονιδίων *nif* εντός του γονιδιώματος του *P. stutzeri* και ικανότητα του να αζωτοδεσμεύει.

### 1.3.1.7. Απονιτροποίηση

Η απονιτροποίηση έχει απασχολήσει σε μεγάλο βαθμό την επιστημονική κοινότητα ερευνώντας διαρκώς του μηχανισμούς με τους οποίους λαμβάνει χώρα, λόγω του ότι συντελεί στην απώλεια μεγάλων ποσοτήτων αζώτου από τις γεωργικές εκτάσεις και συμβάλει στην απομάκρυνση της περίσσειας του αζώτου από το νερό (Tiedje, 1988). Μέχρι σήμερα είναι γνωστά επτά ένζυμα τα οποία καταλύουν τις 4 αναγωγικές αντιδράσεις που γίνονται κατά τη μετατροπή των νιτρικών ιόντων σε μοριακό άζωτο (Zumft, 1997; Philippot, 2002). Η διαδικασία της απονιτροποίησης επιτελείται κυρίως από βακτήρια τα οποία χρησιμοποιούν τα οξειδία του αζώτου ως τελικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων που προέρχονται από διάφορες ενδοκυτταρικές διεργασίες κάτω από αναερόβιες, μικροαερόφιλες και ορισμένες φορές ακόμα και αερόβιες συνθήκες (Bothe et al., 2000; Conrad, 1996; Knowles, 1982; Philippot, 2002; Zumft, 1997). Κατά τη διάρκεια της απονιτροποίησης, η οποία αποτελείται από τέσσερις διαδοχικές αντιδράσεις, διάφορα μεταλλοένζυμα καταλύουν αρχικά την αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε νιτρώδη, εν συνεχεία σε μονοξειδίο του αζώτου (NO) και ακολούθως σε υποξειδίο του αζώτου (N<sub>2</sub>O) και τέλος σε μοριακό άζωτο (N<sub>2</sub>). Τα μεταλλοένζυμα που συμμετέχουν στη απονιτροποίηση είναι η αναγωγή των νιτρικών (EC 1.7.99.4), η αναγωγή των νιτρωδών (EC 1.7.2.1 και EC 1.9.3.2), η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (EC 1.7.99.7) και η αναγωγή του υποξειδίου του αζώτου (EC 1.7.99.6) (Hochstein and Tomlinson, 1988). Σε αντίθεση με την αφομοιωτική αναγωγή των νιτρικών ή των νιτρωδών ιόντων σε αμμωνία, η οποία συμβαίνει όταν το κύτταρο έχει ανάγκη για βιοσύνθεση, η απονιτροποίηση είναι μια μη αφομοιωτική διαδικασία η οποία είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την διατήρηση των ενεργειακών αποθεμάτων του κυττάρου (Zumft, 1997), αφού η ενζυμική μεταφορά των ηλεκτρονίων είναι συνδεδεμένη με την σύνθεση του ATP μέσω της διαμεμβρανικής μετατόπισης πρωτονίων και της δημιουργίας κατά συνέπεια μιας διαμεμβρανικής διαφοράς δυναμικού (Stouthamer, 1991). Η απονιτροποίηση για τα βακτήρια είναι συνήθως μια προαιρετική διαδικασία, η οποία παρέχει στα βακτηριακά κύτταρα ένα μονοπάτι κυτταρικής αναπνοής υπό αναερόβιες συνθήκες (Knowles, 1982; Zumft, 1997). Η διασπορά της ικανότητας της απονιτροποίησης μεταξύ των βακτηρίων δεν ακολουθεί κάποιο συγκεκριμένο

πρότυπο (Philipot, 2002). Το γένος *Pseudomonas* είναι μια από τις μεγαλύτερες ταξονομικές συστάδες των μέχρι σήμερα γνωστών απονιτροποιητικών βακτηρίων. Το γεγονός αυτό έχει καταστήσει τα μέλη του γένους *Pseudomonas* ως πρότυπους οργανισμούς για τη μελέτη της απονιτροποίησης. Ανάμεσα στα διάφορα είδη του γένους *Pseudomonas* αλλά και πιθανόν μεταξύ των βακτηρίων, το μεγαλύτερο τμήμα του βιοχημικού και γενετικού χαρακτηρισμού της απονιτροποίησης έχει επιτευχθεί χρησιμοποιώντας ως πρότυπο το βακτήριο *P. stutzeri* λόγω της δράσης του ως ετεροτροφικό απονιτροποιητικό βακτήριο (Zumft, 1997).

#### 1.3.1.7.1. Η φύση της απονιτροποίησης και η ομάδα των γονιδίων που απαιτούνται

Προκειμένου ένα απονιτροποιητικό βακτήριο να δημιουργήσει και να θέσει σε λειτουργία την ενδοκυττάρια απονιτροποιητική “συσκευή”, απαιτείται η έκφραση 50 διαφορετικών γονιδίων (Vollack, 1998). Τα γονίδια αυτά είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των απαραίτητων ενζύμων και συνενζύμων και για την ωρίμανση των πρωτεϊνών προκειμένου να είναι λειτουργικές. Αυτά τα απονιτροποιητικά γονίδια βρίσκονται επί του χρωμοσώματος του *P. stutzeri*. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η πλήρης πορεία της απονιτροποίησης η οποία καταλήγει στο σχηματισμό του μοριακού αζώτου, ξεκινάει με την αναγωγή των νιτρικών ιόντων. Τα περισσότερα βακτήρια έχουν παραπάνω από έναν από τους τρεις τύπους αναγωγασών των νιτρικών ιόντων. Διαθέτουν μια διαλύτη αφομοιωτική αναγωγή και δυο μη αφομοιωτικές αναγωγάσες μια αναπνευστική και μια περιπλασματική (Moreno-Vivián et al., 1999). Στο βακτήριο *P. stutzeri*, οι μη αφομοιωτικές αναγωγάσες των νιτρικών ιόντων κωδικοποιούνται από τα γονίδια *nir* των οποίων η έκφραση δεν ελέγχεται στενά από την παρουσία ή όχι του υποστρώματος. Για αυτό το λόγο λοιπόν αποτελούν μια ξεχωριστή χρωμοσωμική περιοχή (Braun and Zumft, 1992; Zumft, 1997). Σε αντίθεση με τις αναγωγάσες των νιτρικών ιόντων, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αναγωγάσες των νιτρικών ιόντων (*nir*) και του μονοξειδίου του αζώτου (*nor*) είναι καλά οργανωμένα σε μια συστάδα γονιδίων (Arai et al., 1995; Braun and Zumft, 1992; de Boer et al., 1994; Jüngst et al., 1991a; Jüngst et al., 1991b; Vollack et al., 1998; Zumft et al., 1990). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αναγωγάσες του υποξειδίου του αζώτου (*nos*) βρίσκονται πολύ κοντά στη συστάδα γονιδίων *nir-nor* απέχοντας μόλις 14kb από τα *nir* δημιουργώντας στο *P. stutzeri* μια υπερσυστάδα με μέγεθος περί τα 30kb που περιέχει τριάντα τρία γονίδια. Στην εικόνα Σχ.1.7 φαίνεται ότι η διάταξη των υποσυστάδων των παραπάνω γονιδίων στο χρωμόσωμα του *P. stutzeri*, είναι *nos-nir-nor*. Τα είκοσι τρία από τα τριάντα τρία γονίδια μεταγράφονται προς την ίδια κατεύθυνση, ενώ δυο ομάδες των επτά γονιδίων (*nirO*, *nirP*, *nirQ*, *nirJEN*, και *nirY*) και τρία επιπλέον γονίδια μεταγράφονται





*Escherichia coli*. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα DnrE ο οποίος ανήκει στην οικογένεια FNR μεταγραφικών παραγόντων (Hartig et al., 1999), βρίσκεται καθοδικά ενός ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης το οποίο με τη σειρά του ακολουθεί το γονίδιο *narL*. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι τα δομικά και τα ρυθμιστικά γονίδια έχουν αντίθετο προσανατολισμό στο *P. stutzeri* (Hartig et al., 1999).

#### 1.3.1.7.1.2. Γονίδια *nir*

Η αλληλουχία του γονιδίου της αναγωγής των νιτρωδών ιόντων, *nirS*, έχει προσδιοριστεί σε δυο στελέχη *P. stutzeri*, τα ZoBell και JM300 (Jüngst et al., 1991; Smith and Tiedje, 1992). Επιπροσθέτως του *nirS* γονιδίου, στην υποσυστάδα των *nir* γονιδίων υπάρχουν τα γονίδια *nirTBM*. Το γονίδιο *nirT* κωδικοποιεί ένα μόριο κυτοχρώματος το οποίο απαρτίζεται από τέσσερα μόρια αίμης και πιθανόν δρα ως δότης ηλεκτρονίων (Jüngst et al., 1991). Το γονίδιο *nirB* κωδικοποιεί ένα μόριο κυτοχρώματος το οποίο απαρτίζεται από δυο μόρια αίμης (κυτόχρωμα C552). Επίσης, φαίνεται ότι το γονίδιο *nirM* κωδικοποιεί ένα δότη ηλεκτρονίων (κυτόχρωμα C551) για το γονίδιο *nirS*. Το γονίδιο *nirD* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία σχετίζεται με την βιοσύνθεση του κυτοχρώματος *cd1* ή της αίμης D1 (Jüngst et al., 1991; Zumft et al., 1988). Το γονίδιο *nirS* γειτνιάζει με τα γονίδια βιοσύνθεσης της αίμης D1. Όπως και σε άλλα στελέχη του γένους *Pseudomonas* διάφορα γονίδια όπως τα *nirDLGH* φαίνεται ότι βρίσκονται σε δυο αντίγραφα σε διαφορετικές περιοχές του γενομικού DNA (Palmedo et al., 1995). Το γονίδιο *nirE* βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου *nirS* στην *P. stutzeri* και μεταγράφεται με κατεύθυνση αντίθετη από αυτή του *nirS*. Είναι μέρος της συστάδας γονιδίων *nirQJENY* (Vollack et al., 1998) και κωδικοποιεί μια μεθυλοτρανσφεράση. Το προϊόν του γονιδίου *nirN* επηρεάζει την αναερόβιο ανάπτυξη και την *in vivo* αναγωγή των νιτρωδών ιόντων (Glockner and Zumft, 1996). Η ύπαρξη του γονιδίου *nirF* έχει προβλεφθεί μέσα στη συστάδα των γονιδίων *nir* μέσω του γονιδίου *nirC*, το οποίο πιθανόν να κωδικοποιεί ένα μόριο κυτοχρώματος *c* το οποίο απαρτίζεται από ένα μόριο αίμης και εντοπίζεται στο περίπλασμα. Όσον αφορά αυτό το κυτόχρωμα, έχει υποθεθεί ότι ενέχεται στην διαδικασία ωρίμανσης της πρωτεΐνης NirS (Jüngst et al., 1991). Τα οπερόνια του *nirE* και του *nirMCFDLGH* έχει βρεθεί ότι έχουν στον προαγωγέα τους θέσεις δέσμευσης του ρυθμιστή FNR που εκφράζεται υπό αναερόβιες συνθήκες.

Ένας πιθανός ρυθμιστής τύπου LysR έχει εντοπιστεί σε ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (*nirY*), που βρίσκεται μεταξύ των οπερονίων *nos* και *nir* του *P. stutzeri* (Glockner and Zumft, 1996). Αυτός ο ρυθμιστής ανήκει στην κατηγορία των ρυθμιστών που εμπλέκονται στον έλεγχο ενός μεγάλου αριθμού ενδοκυττάρων

διαδικασιών (Schell, 1993). Τέλος η *P. stutzeri* διαθέτει ένα γονίδιο (*nirR*) το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με μέγεθος 25,6 kDa, η οποία επηρεάζει την αναγωγή των νιτρωδών, δηλ. της πρωτεΐνης NirS (Jüngst et al., 1991). Το γονίδιο *nirR* δεν εντοπίζεται σε κανένα, από τα οπερόνια που περιγράφηκαν παραπάνω και δεν εμφανίζει καμία ομοιότητα με γνωστές έως σήμερα πρωτεΐνες.

#### 1.3.1.7.1.3. Γονίδια *nor*

Από τη σύγκριση των πρωτοταγών δομών των NO αναγωγασών, παρατηρείται ότι χωρίζονται σε δυο ομάδες: α) οι λεγόμενες μικρής αλυσίδας NORs (scNORs) που αποτελούνται από περίπου 450 αμινοξέα, και οι μακράς αλυσίδας NORs (lcNORs) που αποτελούνται από περίπου 760 αμινοξέα. Επιπλέον, ο διαχωρισμός αυτός συμπεριλαμβάνει και την προέλευση των ηλεκτρονίων. Οι scNORs είναι μόρια που συμμετέχουν σε ένα σύμπλοκο του κυτοχρώματος c και προσλαμβάνουν ηλεκτρόνια από αυτό, ενώ οι lcNORs προσλαμβάνουν ηλεκτρόνια από μια κινολική ομάδα. Έτσι λοιπόν, οι δύο αυτές ενζυμικές μορφές χαρακτηρίζονται ως “cNOR” και “qNOR” αντίστοιχα, σε ορισμένες μελέτες (Hendriks et al., 2000). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις NO αναγωγάσες (σύμπλοκο με το κυτόχρωμα τύπου-bc), *norCB*, ήταν τα πρώτα γονίδια scNOR που ταυτοποιήθηκαν στην *P. stutzeri* (Braun and Zumft, 1991; Braun and Zumft, 1992). Σε μια βιβλιοθήκη κοσμιδίων της *P. stutzeri* χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχούσε στο N-τελικό άκρο της NorC υπομονάδας (Braun and Zumft, 1991).

Στην *P. stutzeri* τα γονίδια *nor* είναι διατεταγμένα σε τρεις μεταγραφικές περιοχές που αποτελούνται από ένα *norCB* οπερόνιο, ένα οπερόνιο *nirQOP*, και μονοσιστρονικό γονίδιο *norD*. Το οπερόνιο *dnrN* βρίσκεται καθοδικά του *norD*. Αυτό αποτελείται από ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια ρυθμιστική *nor* πρωτεΐνη, την DnrD (Vollack and Zumft, 2001). Το προϊόν του γονιδίου *norC* λειτουργεί ως μια υπομονάδα κυτοχρώματος c της scNORs. Καθοδικά του *norC* βρίσκεται ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (*norB*) που κωδικοποιεί μια ισχυρά υδρόφοβη πρωτεΐνη. Στην πραγματικότητα, το γονίδιο *norB* κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της scNOR η οποία οξειδώνει το κυτόχρωμα c. Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι αυτό το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης αντιπροσωπεύει τη δομική υπομονάδα του κυτοχρώματος b και δημιουργήθηκε μέσω μιας μετάλλαξης τύπου διαγραφής-αντικατάστασης αυτής της περιοχής. Το γονίδιο *NorD* βρίσκεται καθοδικά του *norCB*. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μια κυτταροπλασματική πιθανώς πρωτεΐνη που επηρεάζει την έκφραση και τη λειτουργία των δύο *nirS* και *norCB* γονιδίων.

Τα βοηθητικά γονίδια *nirQOP* του *P. stutzeri* βρίσκονται ανοδικά του *norCB* γονιδίου και χωρίζονται από τα γονίδια *nir* με μια περιοχή DNA περίπου 7 kb κωδικοποιώντας

την αναγωγή των νιτρωδών του κυτοχρώματος cd1 καθώς και τις απαιτούμενες πρωτεΐνες για τη βιοσύνθεση της αίμης D1. Το γονίδιο *nirQ* (*norQ*) είναι τοποθετημένο αμέσως ανοδικά του *nirS*. Το γονίδιο *nirQ* εμφανίζει μια σχετική ομοιότητα στην αλληλουχία με τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνονται στην οικογένεια NtrC πρωτεϊνών και μεταγράφεται με προσανατολισμό αντίθετο από αυτόν του *nirS* γονιδίου (Braun and Zumft, 1992). Η διαδικασία αναπνευστικής αναγωγής τόσο των νιτρωδών όσο και του NO επηρεάζονται από την μεταλλαγμένη των *nirQ* γονιδίων. Αυτό δείχνει ότι υπάρχει εξάρτηση μεταξύ αυτών των διαδικασιών (Jünger and Zumft, 1992).

Το γονίδιο *nirO* κωδικοποιεί μια μεμβρανική πρωτεΐνη που διαπερνά πέντε φορές την κυτταρική μεμβράνη, που επηρεάζει την απόδοση και τον ρυθμό της αναερόβιας ανάπτυξης. Εμφανίζει ομοιότητα με την υπομονάδα οξειδάσης-III του κυτοχρώματος c. Τέλος, το γονίδιο *nirP* (*norF*) κωδικοποιεί μια μεμβρανική πρωτεΐνη που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη δύο ή τρεις φορές εμπλέκεται στην αναγωγή των νιτρωδών και του NO.

#### 1.3.1.7.1.4. Γονίδια *nap*

Οι *Nap* αναγωγάσες εμπλέκονται στην εξισορρόπηση του οξειδοαναγωγικού φορτίου του κυττάρου κατά την διαδικασία της απονιτροποίησης.

Οι *Nap* αναγωγάσες είναι ετεροδιμερή ένζυμα που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Οι *Nas* αναγωγάσες επιτελούν την αφομοίωση των νιτρικών ιόντων ως πηγή αζώτου, και είναι κυτταροπλασματικά μολυβδο-ένζυμα. Κατατάσσονται σε δύο ομάδες: Στην ομάδα η οποία χρησιμοποιεί την φερρεδοξίνη ή την φλαβοδοξίνη ως δότη ηλεκτρονίων, και στην ομάδα η οποία χρησιμοποιεί ως δότη ηλεκτρονίων το NAD(P)H. Οι *Nas* αναγωγάσες έχουν επίσης μία N-τελική περιοχή η οποία εμπεριέχει ένα σύμπλοκο [4Fe-4S]. Ο συμπάραγοντας μολυβδοπτερίνη (molybdopterin) σε βακτήρια αποτελείται από μια μοναδική πτερίνη (pterin) συμπλοκοποιημένη με μολυβδαίνιο (Mo), σχηματίζοντας την μολυβδοπτερίνη (Mo-MPT). Αυτή στη συνέχεια τροποποιείται μέσω της προσθήκης ενός μορίου γουανοσίνης σχηματίζοντας τελικά την Mo-MGD.

Τα κυανοβακτήρια και τα φυτά συνθέτουν αναγωγάση των νιτρωδών ιόντων η οποία εμπεριέχει ως συμπάραγοντα φερρεδοξίνη, ενώ άλλα βακτήρια και μύκητες συνθέτουν ένζυμα που έχουν ως συμπάραγοντα NADH ή/και NADPH. Και οι δύο τύποι της αφομοιωτικής αναγωγής των νιτρωδών ιόντων περιέχουν ένα σύμπλοκο σιδήρου-θείου. Οι *Nir* αναγωγάσες που φέρουν ως συμπάραγοντα ένα μόριο NAD(P)H, φέρουν επίσης ένα μόριο FAD το οποίο δεν είναι δεσμευμένο με το ένζυμο (Lin and Stewart, 1998; Richardson et al., 2001).

1.3.1.7.1.5. Γονίδια nos

Το στάδιο της αναγωγής του υποξειδίου του αζώτου σε μοριακό άζωτο καταλύεται από τις αναγωγάσες του N<sub>2</sub>O (N<sub>2</sub>OR). Οι N<sub>2</sub>OR έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί για μεγάλο αριθμό βακτηρίων μεταξύ των οποίων το *P. stutzeri* (Coyle et al., 1985), *Paracoccus denitrificans* (Snyder and Hollocher, 1987) και *Achromobacter cycloclastes* (Hulse and Averill, 1990). Σχεδόν σε όλους τους απονιτροποιητικούς οργανισμούς η N<sub>2</sub>OR είναι ένα διμερές μεταλλοένζυμο χαλκού που εντοπίζεται στο περίπλασμα (SooHoo and Hollocher, 1991). Εντοπίζονται στο μόριο της δυο κέντρα χαλκού ανά υπομονάδα τα CuA και CuZ. Το CuA κέντρο αποτελείται από δυο ιόντα χαλκού όμοιο με αυτό που εντοπίζεται στην κυτοχρωμική οξειδάση ενώ το CuZ εντοπίζεται εντός του ενεργού κέντρου του ενζύμου (Brown et al., 2000). Η οργάνωση καθώς και η ρύθμιση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις N<sub>2</sub>OR (nos γονίδια) έχουν μελετηθεί εκτενώς στην *P. stutzeri*. Τα γονίδια *nosRZDFYL* εμφανίζονται ομαδοποιημένα μαζί με τα γονίδια *nir* και *nor* τα οποία κωδικοποιούν τις αναγωγάσες των νιτροδών και του μονοξειδίου του αζώτου αντίστοιχα (Braun and Zumft, 1992; Jüngst et al., 1991). Το δομικό γονίδιο της N<sub>2</sub>OR είναι το *nosZ* (Viebrock and Zumft, 1988). Τα προϊόντα των γονιδίων *nosDFY* θεωρείται ότι διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην ενσωμάτωση των ιόντων χαλκού (Zumft et al., 1990). Για το γονίδιο *nosL* έχει προταθεί ότι είναι μια ισομεράση της εξωτερικής μεμβράνης (Dreusch et al., 1996), ενώ το γονίδιο *nosR* κωδικοποιεί μια μεμβρανική πρωτεΐνη (Cuypers et al., 1992). Το γονίδιο *nosR* θεωρείται ότι έχει ρόλο αισθητήρα του N<sub>2</sub>O ρυθμίζοντας την έκφραση των υπόλοιπων N<sub>2</sub>OR γονιδίων (Vollack and Zumft, 2001). Τα ομαδοποιημένα γονίδια της N<sub>2</sub>OR στην *P. stutzeri* μεταγράφονται ως τουλάχιστον 3 διαφορετικά σπερόνια υπό τον έλεγχο των προαγωγέων που βρίσκονται ανοδικά των γονιδίων *nosR*, *nosZ* και *nosD* (Cuypers et al., 1995).

## **ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν ο διερεύνηση της παρουσίας και η φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της απονιτροποίησης και αφομοίωσης των νιτρικών *nirS*, *narJ*, *nosZ*, *napA*, *nasA* και *nasB* σε αζωτοδεσμευτικά βακτήρια τα οποία ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* και απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα σιτηρών καθώς και στελεχών της *P stutzeri* A1501 και DMS4166, τα οποία απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα ρυζιού και σόργου, αντίστοιχα.

## II. Υλικά και Μέθοδοι

## II.1. Βακτηριακά στελέχη

Τα υπό μελέτη αζωτοδεσμευτικά βακτηριακά στελέχη απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα καλλιεργούμενου σιταριού, βρώμης και σίκαλης (Πίνακας 2.1). Η συλλογή αυτή των βακτηρίων διατηρείται στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών από την κ. Η. Κεφαλογιάννη

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη, ως στελέχη αναφοράς, προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση με τα προαναφερθέντα βακτήρια. Συγκεκριμένα, παρελήφθησαν από την εταιρεία Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms BCCM™/LMG, σε λυοφιλιωμένη μορφή, το *Pseudomonas stutzeri* LMG 10652 = You A15 και το *Pseudomonas stutzeri* CMT.9.A (DSMZ 4166) από τη German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ).

Οι καλλιέργειες των βακτηρίων διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο (NA), παρουσία 20% γλυκερόλης στους -80°C. Οι στερεές καλλιέργειες διατηρούνται στους 4°C για διάστημα μερικών εβδομάδων σε στερεό θρεπτικό μέσο NA.

Με βάση το 16S rRNA τα στελέχη έχουν ταξινομηθεί και ανήκουν είτε στο είδος *P. stutzeri* (Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45, Gr46 και Gr50) είτε σε ένα νέο είδος *Pseudomonas* sp. (Πίνακας 2.1).

**Πίνακας 2.1.** Στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

A/A	Στέλεχος	Τοποθεσία	Είδος φυτού	Ποικιλία	Παρατηρήσεις
1	<b>Gr16</b>	Σκούρτα, Βοιωτίας	<i>Triticum durum</i>	capeiti	<i>P. stutzeri</i>
2	<b>Gr 17</b>	Σκούρτα, Βοιωτίας	<i>Triticum durum</i>	capeiti	<i>P. stutzeri</i>
3	<b>Gr 18</b>	Σκούρτα, Βοιωτίας	<i>Triticum durum</i>	capeiti	<i>P. stutzeri</i>
4	<b>Gr 19</b>	Σκούρτα, Βοιωτίας	<i>Triticum durum</i>	capeiti	<i>P. stutzeri</i>
5	<b>Gr 20</b>	Σκούρτα, Βοιωτίας	<i>Triticum durum</i>	capeiti	<i>P. stutzeri</i>
6	<b>Gr 21</b>	Σκούρτα, Βοιωτίας	<i>Triticum durum</i>	capeiti	<i>P. stutzeri</i>
7	<b>Gr 45</b>	Θεσσαλονίκη	<i>Triticum aestivum</i>	Generoso	<i>P. stutzeri</i>
8	<b>Gr 46</b>	Θεσσαλονίκη	<i>Triticum aestivum</i>	Generoso	<i>P. stutzeri</i>
9	<b>Gr 50</b>	Θεσσαλονίκη	<i>Hordeum vulgare</i>	Carina	<i>P. stutzeri</i>
10	<b>Gr 57</b>	Κιλελέρ, Θεσσαλία	<i>Hordeum vulgare</i>	local	<i>Pseudomonas</i> sp.
11	<b>Gr 65</b>	Κιλελέρ, Θεσσαλία	<i>Hordeum vulgare</i>	local	<i>Pseudomonas</i> sp.

## II.2. Μοριακές τεχνικές ταξινόμησης βακτηριακών στελεχών

### II.2.1. Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από Gram - 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 έκπλυσης (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 μέχρι να απομακρυνθεί πλήρως το διάλυμα έκπλυσης, καθώς εμπεριέχει αιθανόλη, η οποία εάν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.



- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf, όπου πραγματοποιείται η έκλουση του DNA με προσθήκη 50 µl διαλύματος έκλουσης 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.

## II.2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

### II.2.2.1. 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). Η τεχνική αυτή (Mullis *et al.*, 1986) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης αλληλουχιών 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, μονόκλωνα 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 δεν 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<sup>+2</sup>.

Αρχικά για την PCR χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση της *E. coli*. Εξαιτίας της θερμοευαισθησίας 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 στο 94 °C, χρησιμεύουν εκ νέου ως μήτρες αντιγραφής όπου θα υβριδιστούν οι εκκινητές. Εάν αυτός ο κύκλος επαναληφθεί (ν) φορές, το τελικό αποτέλεσμα θα είναι η σύνθεση 2<sup>ν</sup> δίκλωνων μορίων DNA που αποτελούν αντίγραφα της αλληλουχίας μεταξύ των δύο εκκινητών, συμπεριλαμβάνοντας 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.

#### **II.2.2.2. 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 ( κεφάλαιο 3).

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 (κεφάλαιο 3).

Μια τυπική αντίδραση PCR λαμβάνει χώρα ως εξής:

Σε ειδικό σωλήνα erpendorf (100μl) προστίθενται:

I. Γονιδιωματικό DNA		50ng
II. Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10μM)	1 μl	
III. Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10μM)	1 μl	
IV. Μίγμα dNTPs (10mM)	1 μl	
V. 10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα <sup>11</sup>	5 μl	
VI. DMSO		2 μl
VII. Taq DNA πολυμεράση (1unit/μl) <sup>1</sup>		0.5 μl

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 / 1,3-15 kb αναμενόμενου προϊόντος	
Τελική επιμήκυνση	72 °C για 5-10 min.	

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

**Πίνακας 2.2.** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση γονιδίων στην παρούσα εργασία είναι οι εξής:

εκκινητές	ακολουθία 5'-3'	συνθήκες
<i>NirS</i> -KA-03-F <i>NirS</i> -KA-03-R	CACGGYGTBCTGCGCAAGGGCGC CGCCACGCGCGGYTCSGGGTGGTA	4'94°C, 34x(1'94°C, 1'52°C, 4'72°C), 10'72°C
<i>NosZ</i> -F <i>NosZ</i> -R	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG CATGTGCAGNGCRTGGCAGAA	4'94°C, 34x(1'94°C, 1'52°C, 4'72°C), 10'72°C
<i>NapA</i> PST_1268 F <i>NapA</i> PST_1268 R	CCTTCTCCACCCACATGGCGCTGGGC CCAGCCSTCSGCCTGCGGCACSGC	4'94°C, 34x(1'94°C, 1'63°C, 4'72°C), 10'72°C
<i>NarJ</i> -533-F <i>NarJ</i> -533-R	CCGAAGGCGACCTGATGGAC CACCGGGCTTTCTCGCGAAG	4'94°C, 34x(1'94°C, 1'52°C, 4'72°C), 10'72°C
<i>NasA</i> PST_2411 F <i>NasA</i> PST_2411 R	CTGTGCATGTGYTCGGCGGT GCCAGGTGCAGGTTGATCAG	4'94°C, 34x(1'94°C, 1'56°C, 4'72°C), 10'72°C
<i>NasB</i> PST_2409 F <i>NasB</i> PST_2409 R	CCTGCTCGGSCTVGAGGCGGC CTCTTCGGCTTGACGTCGGCCG	4'94°C, 34x(1'94°C, 1'60°C, 4'72°C), 10'72°C

### II.2.2.3. 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. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA, ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους τους. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης και κυμαίνεται από 0,1-100 kb.

Τα τμήματα 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 αγαρόζης αναμιγνύεται, σε κωνική φιάλη Erlenmeyer, με ορισμένο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1x TAE<sup>5</sup>. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης 1% και 3% (w/v), με εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA από 0,3-10kb.
- Ακολουθεί σταδιακή θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αγαρόζη να 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 1x TAE<sup>5</sup> 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>.

#### **II.2.2.4. Ανάκτηση κλάσματος δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων από πηκτή αγαρόζης**

Η ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή 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 τύπου erpendorf, ζυγίζεται και προστίθενται 3 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος QG (3 μl QG/mg πηκτής).
- Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 50 °C για 10 min (ανά 2-3min ανακινείται) μέχρι να 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 τύπου *erpendorf* 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.

#### **II.2.2.5. 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 φασματοφωτομέτρου μικροποσοτήτων (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 παρουσίας προσμίξεων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η παρουσία πρωτεϊνών, φαινόλης ή άλλων ουσιών οι οποίες απορροφούν στα 280nm

- Ένα δεύτερο μέτρο καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων αποτελεί ο λόγος  $OD_{260}/OD_{230}$ . Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας ο συγκεκριμένος λόγος κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,2, έχει δηλαδή τιμές υψηλότερες του  $OD_{260}/OD_{280}$ . Μικρότερες τιμές αποτελούν ένδειξη παρουσίας προσμίξεων.

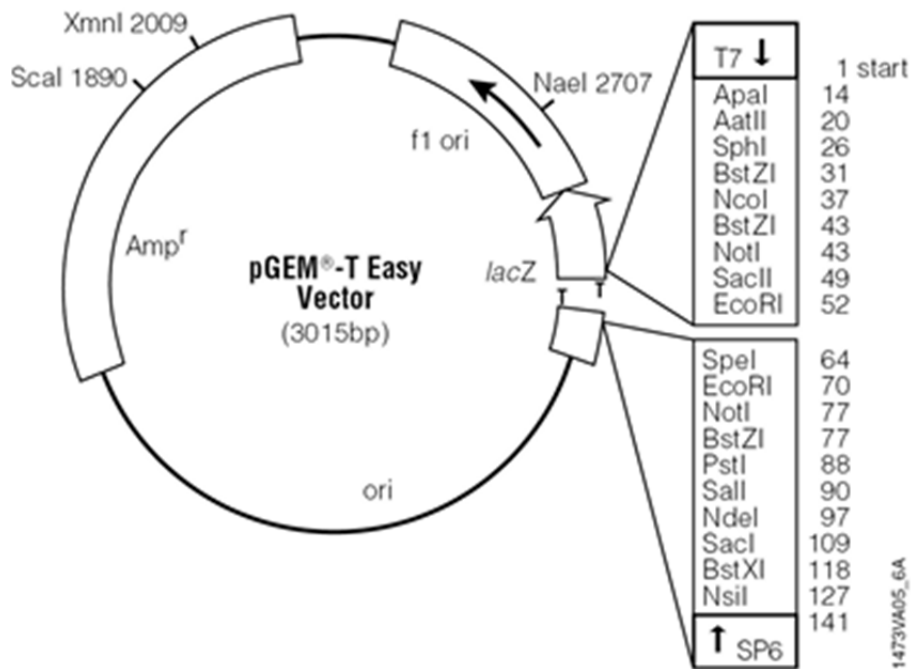
## II.2.3. Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα

### II.2.3.1. Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα

Ο πλασμιδιακός φορέας ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι ο pGEM-T Easy (Promega) (Εικόνα. 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-πεπτιδίο του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση. Επιπλέον, φέρουν μια πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (πολυσυνδέτης) 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-γαλακτοζιδάσης βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο των παραπάνω προαγωγέων, ενώ η μεταγραφή μπορεί να επάγεται παρουσία του χημικού αναλόγου της λακτόζης IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοζίδιο). Η β-γαλακτοζιδάση μεταβολίζει την οργανική ένωση X-gal, παράγοντας μια αδρανή ουσία μπλε χρώματος. Η ένθεση ξένου DNA στην περιοχή του πολυσυνδέτη ωστόσο, διακόπτει τη μεταγραφή του γονιδίου *lacZ*, με αποτέλεσμα την αδυναμία μεταβολισμού της X-gal.

Τέλος, οι συγκεκριμένοι φορείς φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, γεγονός το οποίο επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων.



Εικόνα 2.1: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα pGEM-T easy (promega)

### II.2.3.2. 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) (σχ. 2.1). 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.

Σε αντίδραση ενσωμάτωσης τελικού όγκου 10 μl αναμιγνύονται:



I. DNA πλασμιδιακός φορέας	1 μl
II. DNA ένθεσης	1 μl
III. 10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης <sup>8</sup>	1 μl
IV. Ένζυμο λιγάση T4 (1 unit/μl)	1 μl
V. ddH <sub>2</sub> O	6 μl

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

## II.2.4. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*

### II.2.4.1. 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>1</sup>, παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (παραρτήματα Β'). Η ανάπτυξή του πραγματοποιήθηκε κατόπιν επώασης στους 37°C για 16h. Στην περίπτωση υγρής καλλιέργειας, η επώαση τελούνταν υπό ανάδευση.

### II.2.4.2. Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων *E. coli* δεκτικών για μετασχηματισμό (*Competent cells*)

- 10 ml LB<sup>1</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>1</sup>. Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37°C για 2 h, εωσότου 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 στους 4°C.
- Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 10 min.
- Το ίζημα των κυττάρων αφού επαναδιαλύεται με ήπια ανάδευση σε 50 ml διαλύματος 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 10 min.

- Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 25 ml διαλύματος 0,1 M CaCl<sub>2</sub> και διατηρείται σε πάγο για 20 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 10 min.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 ml διαλύματος 0,1 M CaCl<sub>2</sub> και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v).
- Τα κύτταρα αφού διαμοιραστούν σε σωλήνες τύπου errendorf φυλάσσονται στους -80 °C.

#### **II.2.4.3. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδιο**

- Σε σωλήνα τύπου errendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 100 μl, δεκτικά για μετασχηματισμό 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 μετασχηματισμό 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>1</sup> και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 1 h.
- Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB<sup>1</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 διαλύματος IPTG 100mM<sup>9</sup> και 50μl διαλύματος 2%<sup>10</sup> (w/v) X-Gal. Οι αποικίες που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, λόγω της διακοπής του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοζιδάση 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.

## II.2.5. 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>™</sup> σύμφωνα με την εξής διαδικασία:

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB<sup>1</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 τύπου erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 6000 rpm για 5min 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 (περιέχει 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 (περιέχει οξικό οξύ και υδροχλωρική γουανιδίνη), 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 περιέχει αιθανόλη, η οποία εάν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf 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.

#### II.2.6. Πέψη 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 µl-100 µl.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Σε σωλήνα τύπου 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 µl αναμιγνύονται:

I.	Διάλυμα DNA 1 µg (σε H <sub>2</sub> O ή TE2)	έως 10µl
II.	Ένζυμο περιορισμού (1 unit/µl)	1 µl
III.	10x ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	3 µl
IV.	RNAse A4 (1 mg/ml)	0,5 µl
V.	ddH <sub>2</sub> O	έως τελικό όγκο 30 µl

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

### II.2.7. Αλληλούχηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequencing)

Πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε με τη μέθοδο του *QIAprep Spin Miniprep Kit* της *QIAGEN*<sup>™</sup>, εστάλη για αυτόματη αλληλούχηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Για κάθε κλώνο παρελήφθησαν 750-900bp και επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα DNASTar ως προς την εύρεση τμημάτων που έχουν υποκλωνοποιηθεί στον φορέα pGEM-Teasy, δηλαδή εντοπισμός των εκκινητών που οριοθετούν το τμήμα του DNA που έχει υποκλωνοποιηθεί.

### II.2.8. Σύγκριση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση

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

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 αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2011).

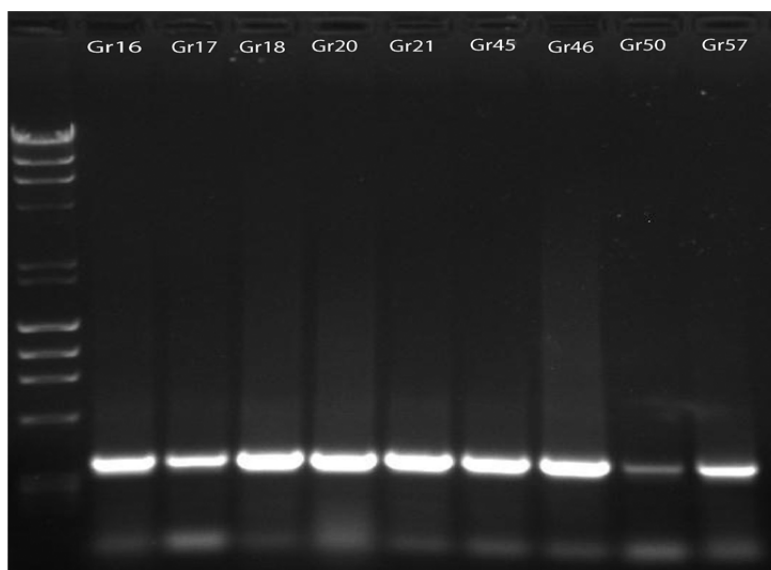
Τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987), μέσω του προγράμματος MEGA 5.0 (Molecular Evolutionary

Genetics Analysis) (Tamura et al., 2011). Η αξιοπιστία και η σταθερότητα των σχέσεων του δενδρογράμματος εκτιμήθηκε μέσω 1000 bootstrap δειγμάτων.

### III. Αποτελέσματα

### III.1. Μοριακή ανάλυση των γονιδίων *nirS narJ nosZ narA nasA* και *nasB*

Θέλοντας να πραγματοποιήσουμε μοριακή ανάλυση των γονιδίων *nirS narJ nosZ narA nasA nasB*, αρχικά απομονώθηκε γενομικό DNA από τα στελέχη Gr 16, Gr 17, Gr 18, Gr 19, Gr 20, Gr 21, Gr 45, Gr 46, Gr 50, Gr 57, Gr 65 καθώς και των τυπικών στελεχών A1501 και DMS4166. Προκειμένου να ενισχυθούν περιοχές των συγκεκριμένων γονιδίων των υπό μελέτη στελεχών σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές (πίνακας 2.2.). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η PCR-αντίδραση με μήτρα το γενωματικό DNA όλων των στελεχών. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 2%. Ενδεικτικά στην Εικόνα.3.1 παραθέτονται τα προϊόντα των στελεχών που αναφέρθηκαν παραπάνω για το γονίδιο *narA*. Εν συνεχεία έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA με τη χρήση φασματοφωτομέτρου μικροποσοτήτων. Ακολούθησε υποκλωνοποίηση των τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα. Ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδιο. Απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli*. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη του DNA με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχής ενσωμάτωση του ενισχυμένου τμήματος στον πλασμιδιακό φορέα και ακολούθησε αλληλούχηση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών.



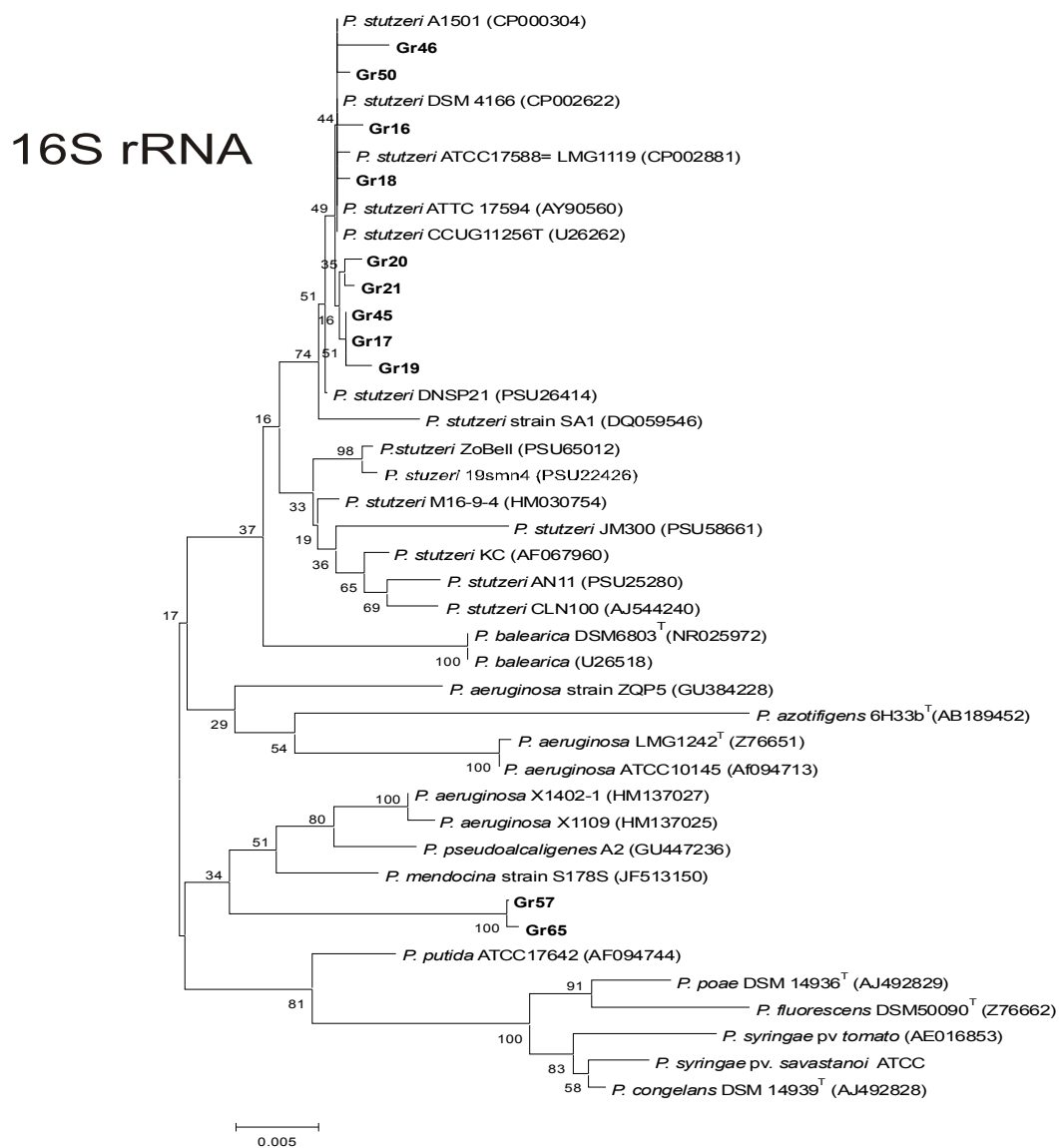
**Εικόνα 3.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *narA*. Το ενισχυμένο τμήμα έχει το αναμενόμενο μέγεθος των 367bp.



### III.2. Φυλογενετική ανάλυση

Με βάση τις αλληλουχίες του γονιδίου 16S rRNA κατασκευάστηκε φυλογενετικό δένδρο των υπό μελέτη στελεχών Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45, Gr46, Gr50, Gr57 και Gr65 (Εικόνα 3.2).

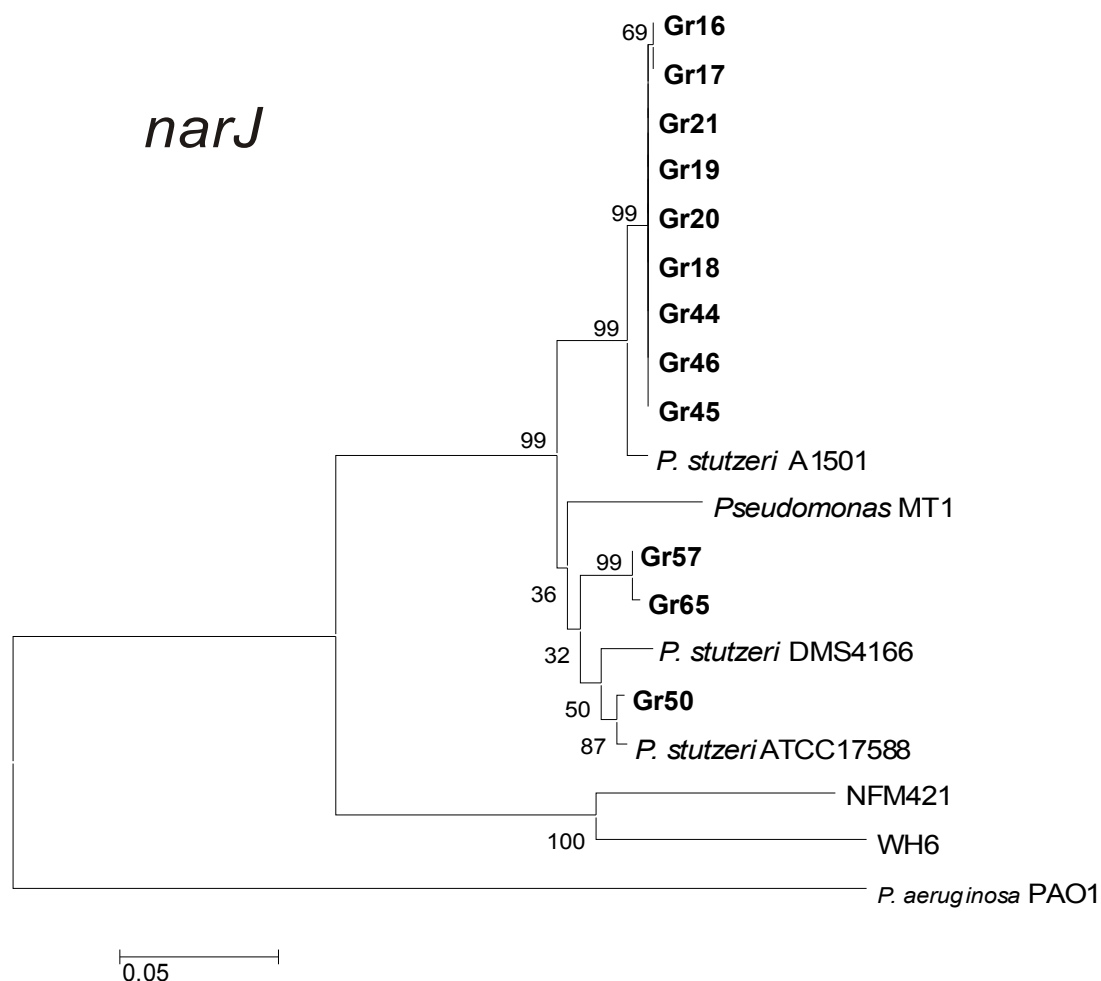
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα στελέχη Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45, Gr46, Gr50 ομαδοποιούνται κοντά στα τυπικά στελέχη της *P. stutzeri* A1501 και DMS4166, ενώ τα στελέχη Gr57, Gr65 ομαδοποιούνται σε έναν ξεχωριστό κλάδο κοντά στα στελέχη *P. mendocina ymp*, *P. putida* ATCC17642, *P. aeruginosa* X1109, *P. pseudoalcaligenes* A2, *P. fluorescens*.



**Εικόνα 3.2.** Φυλογενετικό δένδρο των στελεχών που μελετηθήκαν και των στελεχών αναφοράς, με βάση τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες τμήματος του γονιδίου 16S rRNA.

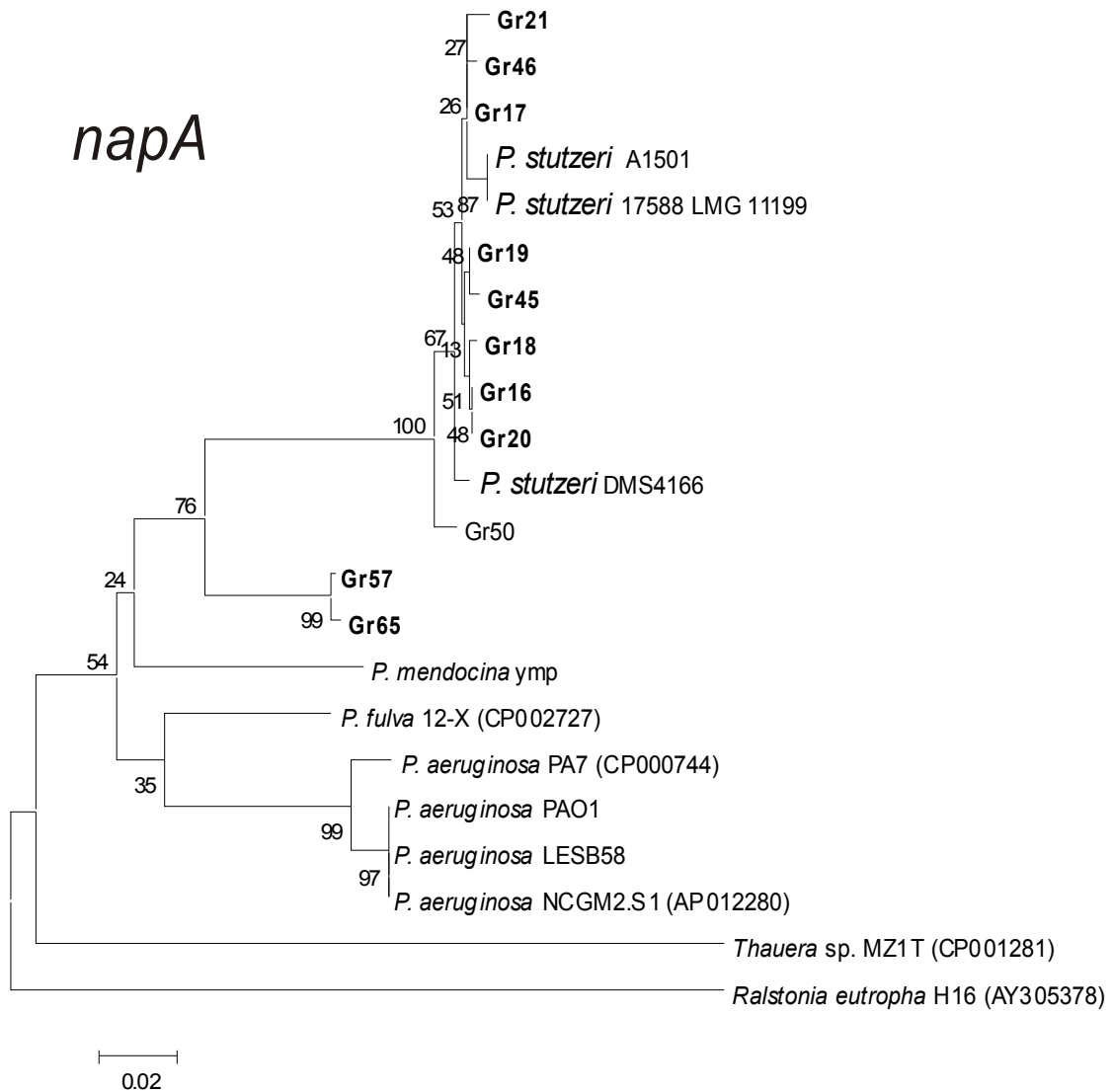
Βάσει των αλληλουχιών των γονιδίων *nirS narJ nosZ napA nasA nasB* κατασκευάστηκαν τα φυλογενετικά δένδρα για κάθε γονίδιο, με χρήση του αλγόριθμου Neighbor-Joining του προγράμματος MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

Για το γονίδιο *narJ* παρατηρείται ότι τα στελέχη Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45 Gr46 ομαδοποιούνται μαζί με το στέλεχος A1501. Ενώ τα στελέχη Gr50 Gr57 Gr65 ομαδοποιούνται σε έναν ξεχωριστό κλάδο, κοντά στα στελέχη της *P. stutzeri* DMS4166 και *P. stutzeri* ATCC17588 (Εικόνα 3.3).



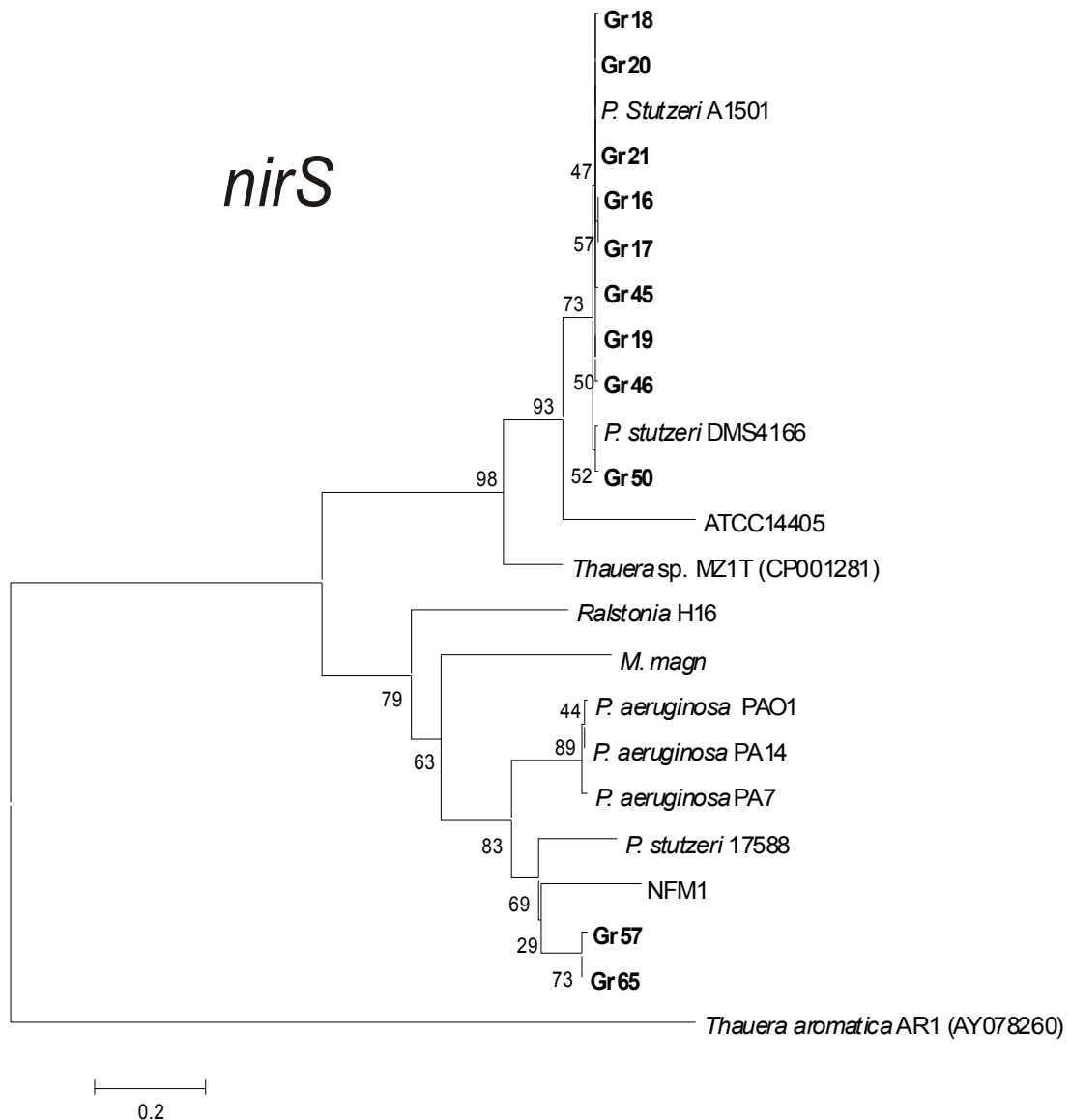
**Εικόνα 3.3.** Φυλογενετικό δένδρο των υπό μελέτη στελεχών, του γονιδίου της νιτρικής αναγωγής *narJ*.

Για το γονίδιο *napA* παρατηρείται ότι τα στελέχη Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45 Gr46 Gr50 ομαδοποιούνται μαζί με το στέλεχος A1501. Ενώ τα στελέχη Gr57 και Gr65 ομαδοποιούνται σε έναν ξεχωριστό κλάδο, κοντά στα στελέχη της *P. mendocina* ymp, *P. fulva* 12-X, *P. aeruginosa* PA7 (Εικόνα 3.4)



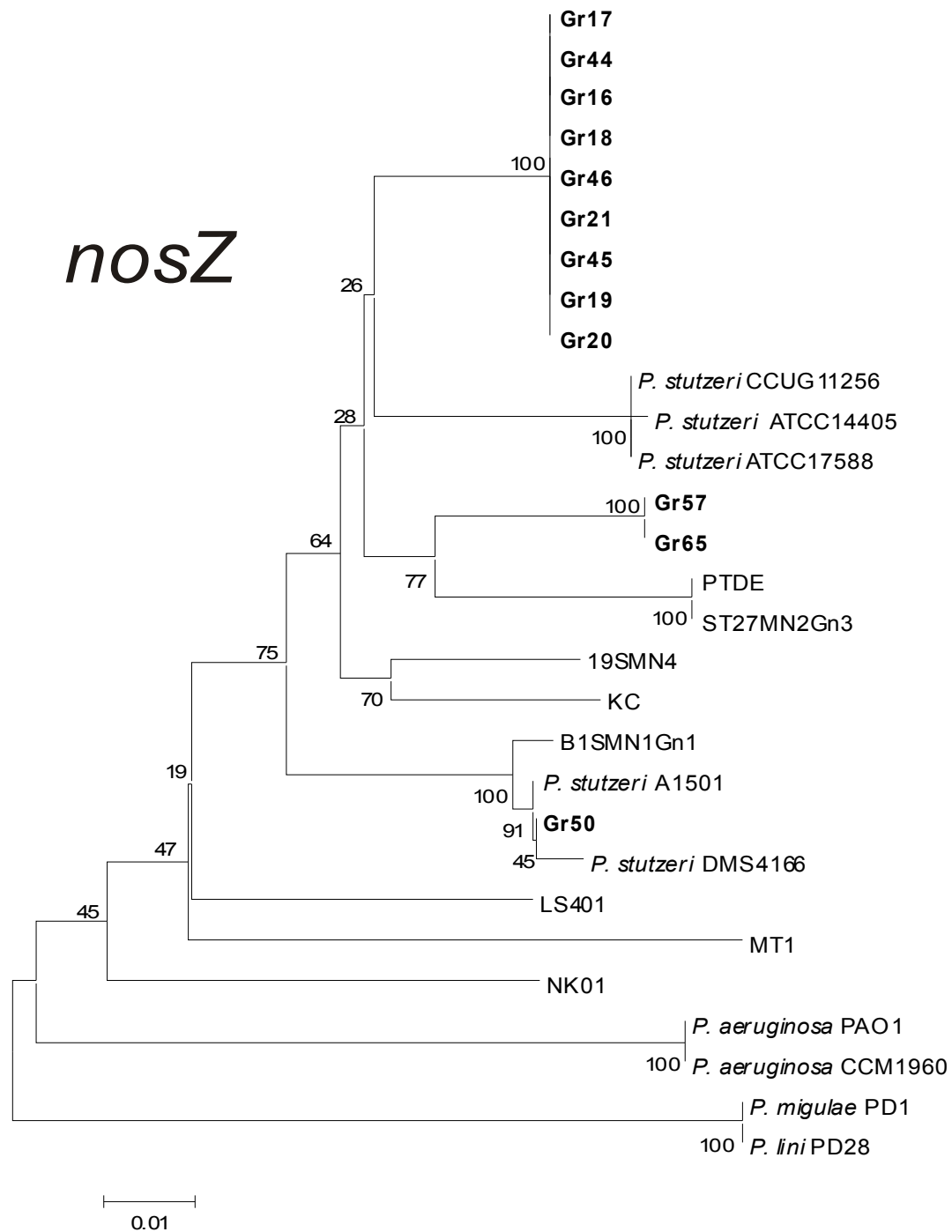
**Εικόνα 3.4.** Φυλογενετικό δένδρο των υπό μελέτη στελεχών, του γονιδίου της περιπλασμικής νιτρικής αναγωγής *napA*.

Για το γονίδιο *nirS* παρατηρείται ότι τα στελέχη Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45 Gr46 Gr50 ομαδοποιούνται μαζί με το στέλεχος A1501 και DMS4166. Ενώ τα στελέχη Gr57 Gr65 ομαδοποιούνται σε έναν ξεχωριστό κλάδο, κοντά στα στελέχη της *P. stutzeri* 17588, *P. aeruginosa* PA7, NFM 1 (Εικόνα 3.5).



**Εικόνα 3.5.** Φυλογενετικό δένδρο των υπό μελέτη στελεχών, του γονιδίου της πρόδρομης νιτρώδους αναγωγής του κυτοχρώματος *cd1*, το *nirS*.

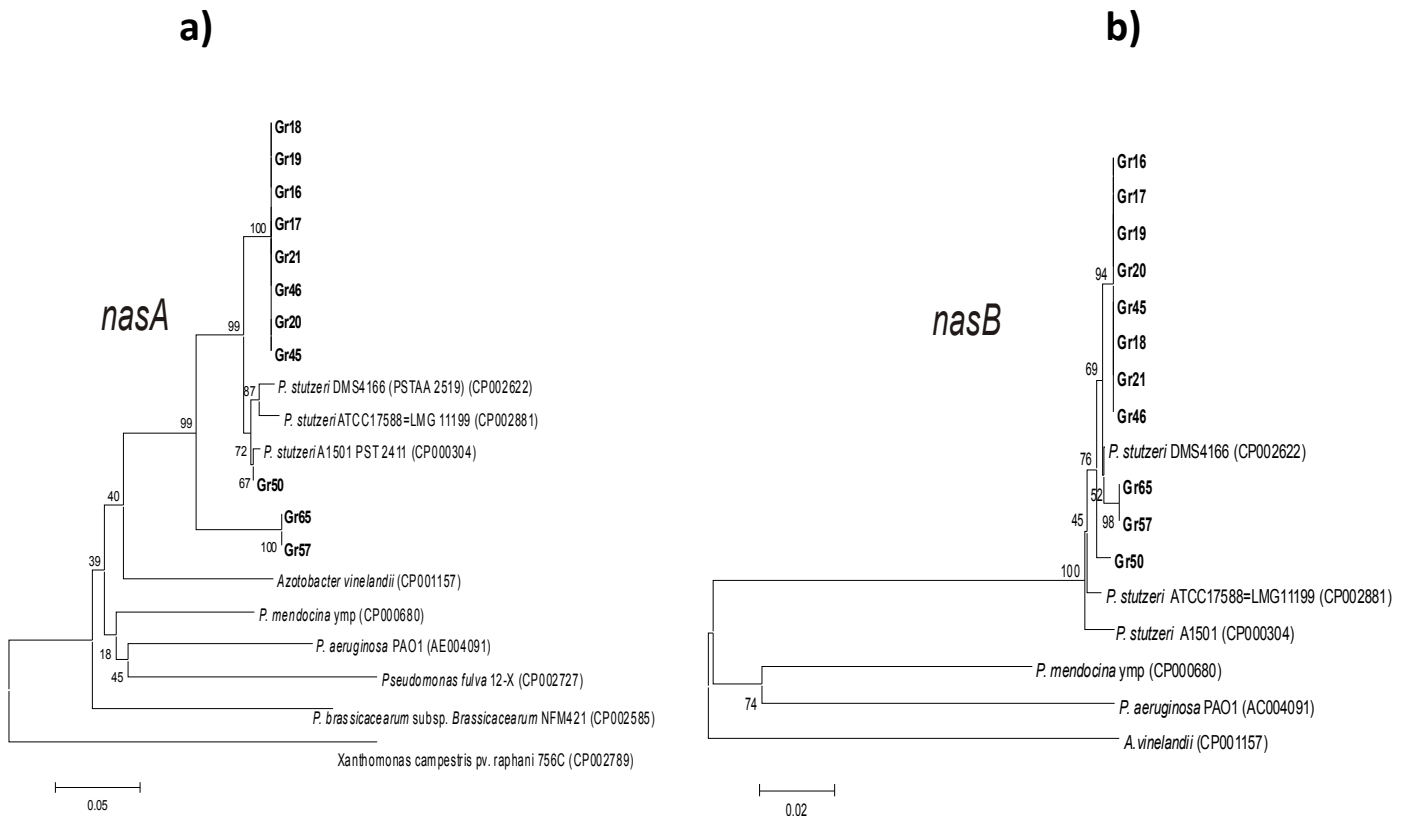
Για το γονίδιο *nosZ* παρατηρείται ότι τα στελέχη Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45 Gr46 Gr57 Gr65 ομαδοποιούνται μαζί με τα στελέχη *P. stutzeri* CCUG11256, *P. stutzeri* ATCC14405 *P. stutzeri* ATCC17588. Ενώ μόνο το στέλεχος Gr50 ομαδοποιείται στα στελέχη της *P. stutzeri* A1501 και *P. stutzeri* DMS4166 (Εικόνα 3.6)



**Εικόνα 3.6.** Φυλογενετικό δένδρο των υπό μελέτη στελεχών, του γονιδίου της αναγωγής του  $N_2O$ , *nosZ*.

α) Για το γονίδιο *nasA* Παρατηρείται ότι τα στελέχη Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45 Gr46 ομαδοποιούνται μαζί με το στέλεχος DMS4166. Το στέλεχος Gr50 ομαδοποιείται μαζί με το στέλεχος A1501. Ενώ τα στελέχη Gr57 Gr65 ομαδοποιούνται σε έναν ξεχωριστό κλάδο, κοντά στο στέλεχος της *P. mendocina* ymp (CP000680) και του *Azotobacter vinelandii* (CP001157) (Εικόνα 3.7 α).

b) Για το γονίδιο *nasB* παρατηρείται ότι τα στελέχη Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45 Gr46 Gr57 Gr65 ομαδοποιούνται μαζί με το στέλεχος *P.stutzeri* DMS4166. Ενώ μόνο το στέλεχος Gr50 ομαδοποιείται στα στελέχη της *P. stutzeri* A1501 και *P. stutzeri* ATCC17588=LMG11199 (Εικόνα 3.7 b)



**Εικόνα 3.7.** Φυλογενετικά δένδρα των υπό μελέτη στελεχών, a) Του γονιδίου της αφομοιωτικής νιτρικής αναγωγής *nasA* b) Του γονιδίου της αφομοιωτικής νιτρώδους αναγωγής *nasB* (μεγάλη υπομονάδα).

Οι αριθμοί καταχώρησης των αλληλουχιών των γονιδίων δίδονται στους παρακάτω πίνακες.

**Πίνακας 3.1.** Αριθμοί καταχώρισης στη βάση δεδομένων του NCBI, των υπό μελέτη στελεχών, για το γονίδιο της αναπνευστικής νιτρικής αναγωγής *narJ*.

Αριθμός καταχώρισης	Ονομασία γονιδίου	Λειτουργία γονιδίου	Στέλεχος <i>P. stutzeri</i>
HE813993	<i>narJ</i>	Νιτρική αναγωγή	Gr 16
HE813994	<i>narJ</i>	Νιτρική αναγωγή	Gr 17
HE813995	<i>narJ</i>	Νιτρική αναγωγή	Gr 18
HE813996	<i>narJ</i>	Νιτρική αναγωγή	Gr 19
HE813997	<i>narJ</i>	Νιτρική αναγωγή	Gr 20
HE813998	<i>narJ</i>	Νιτρική αναγωγή	Gr 21
HE813999	<i>narJ</i>	Νιτρική αναγωγή	Gr 45
HE814000	<i>narJ</i>	Νιτρική αναγωγή	Gr 46
HE814001	<i>narJ</i>	Νιτρική αναγωγή	Gr 50
HE814002	<i>narJ</i>	Νιτρική αναγωγή	Gr 57
HE814003	<i>narJ</i>	Νιτρική αναγωγή	Gr 65

**Πίνακας 3.2.** Αριθμός καταχώρισης στη βάση δεδομένων του NCBI, των υπό μελέτη στελεχών, για το γονίδιο της περιπλασμικής νιτρικής αναγωγής, *napA*.

Αριθμός καταχώρισης	Ονομασία γονιδίου	Λειτουργία γονιδίου	Στέλεχος <i>P. stutzeri</i>
HE814004	<i>napA</i>	Περιπλασμική νιτρική αναγωγή	Gr 16
HE814005	<i>napA</i>	Περιπλασμική νιτρική αναγωγή	Gr 17
HE814006	<i>napA</i>	Περιπλασμική νιτρική αναγωγή	Gr 18
HE814007	<i>napA</i>	Περιπλασμική νιτρική αναγωγή	Gr 19
HE814008	<i>napA</i>	Περιπλασμική νιτρική αναγωγή	Gr 20
HE814009	<i>napA</i>	Περιπλασμική νιτρική αναγωγή	Gr 21
HE814010	<i>napA</i>	Περιπλασμική νιτρική αναγωγή	Gr 45
HE814011	<i>napA</i>	Περιπλασμική νιτρική αναγωγή	Gr 46
HE814012	<i>napA</i>	Περιπλασμική νιτρική αναγωγή	Gr 50
HE814013	<i>napA</i>	Περιπλασμική νιτρική αναγωγή	Gr 57
HE814014	<i>napA</i>	Περιπλασμική νιτρική αναγωγή	Gr 65

**Πίνακας 3.3.** Αριθμός καταχώρισης στη βάση δεδομένων του NCBI, των υπό μελέτη στελεχών της *P. stutzeri*, για το πρόδρομο γονίδιο της νιτρώδους αναγωγής του κυτοχρώματος cd1, *nirS*.

<b>Αριθμός καταχώρισης</b>	<b>Ονομασία γονιδίου</b>	<b>Λειτουργία γονιδίου</b>	<b>Στέλεχος <i>P. stutzeri</i></b>
<b>HE814015</b>	<i>nirS</i>	Πρόδρομη νιτρώδης αναγωγή του κυτοχρώματος cd1	Gr 16
<b>HE814016</b>	<i>nirS</i>	Πρόδρομη νιτρώδης αναγωγή του κυτοχρώματος cd1	Gr 17
<b>HE814017</b>	<i>nirS</i>	Πρόδρομη νιτρώδης αναγωγή του κυτοχρώματος cd1	Gr 18
<b>HE814018</b>	<i>nirS</i>	Πρόδρομη νιτρώδης αναγωγή του κυτοχρώματος cd1	Gr 19
<b>HE814019</b>	<i>nirS</i>	Πρόδρομη νιτρώδης αναγωγή του κυτοχρώματος cd1	Gr 20
<b>HE814020</b>	<i>nirS</i>	Πρόδρομη νιτρώδης αναγωγή του κυτοχρώματος cd1	Gr 21
<b>HE814021</b>	<i>nirS</i>	Πρόδρομη νιτρώδης αναγωγή του κυτοχρώματος cd1	Gr 45
<b>HE814022</b>	<i>nirS</i>	Πρόδρομη νιτρώδης αναγωγή του κυτοχρώματος cd1	Gr 46
<b>HE814023</b>	<i>nirS</i>	Πρόδρομη νιτρώδης αναγωγή του κυτοχρώματος cd1	Gr 50
<b>HE814024</b>	<i>nirS</i>	Πρόδρομη νιτρώδης αναγωγή του κυτοχρώματος cd1	Gr 57
<b>HE814025</b>	<i>nirS</i>	Πρόδρομη νιτρώδης αναγωγή του κυτοχρώματος cd1	Gr 65



**Πίνακας 3.4.** Αριθμός καταχώρισης στη βάση δεδομένων του NCBI, των υπό μελέτη στελεχών της *P. stutzeri*, για το γονίδιο της αναγωγής του υποξειδίου του αζώτου (N<sub>2</sub>O), *nosZ*.

Αριθμός καταχώρισης	Ονομασία γονιδίου	Λειτουργία γονιδίου	Στέλεχος <i>P. stutzeri</i>
HE814026	<i>nosZ</i>	Αναγωγή του N <sub>2</sub> O	Gr 16
HE814027	<i>nosZ</i>	Αναγωγή του N <sub>2</sub> O	Gr 17
HE814028	<i>nosZ</i>	Αναγωγή του N <sub>2</sub> O	Gr 18
HE814029	<i>nosZ</i>	Αναγωγή του N <sub>2</sub> O	Gr 19
HE814030	<i>nosZ</i>	Αναγωγή του N <sub>2</sub> O	Gr 20
HE814031	<i>nosZ</i>	Αναγωγή του N <sub>2</sub> O	Gr 21
HE814032	<i>nosZ</i>	Αναγωγή του N <sub>2</sub> O	Gr 45
HE814033	<i>nosZ</i>	Αναγωγή του N <sub>2</sub> O	Gr 46
HE814034	<i>nosZ</i>	Αναγωγή του N <sub>2</sub> O	Gr 50
HE814035	<i>nosZ</i>	Αναγωγή του N <sub>2</sub> O	Gr 57
HE814036	<i>nosZ</i>	Αναγωγή του N <sub>2</sub> O	Gr 65

**Πίνακας 3.5.** Αριθμός καταχώρισης στη βάση δεδομένων του NCBI, των υπό μελέτη στελεχών της *P. stutzeri*, για το γονίδιο της αφομοιωτικής νιτρικής αναγωγής, *nasA*.

Αριθμός καταχώρισης	Ονομασία γονιδίου	Λειτουργία γονιδίου	Στέλεχος <i>P. stutzeri</i>
HE814048	<i>nasA</i>	Αφομοιωτική νιτρική αναγωγή	Gr 16
HE814049	<i>nasA</i>	Αφομοιωτική νιτρική αναγωγή	Gr 17
HE814050	<i>nasA</i>	Αφομοιωτική νιτρική αναγωγή	Gr 18
HE814051	<i>nasA</i>	Αφομοιωτική νιτρική αναγωγή	Gr 19
HE814052	<i>nasA</i>	Αφομοιωτική νιτρική αναγωγή	Gr 20
HE814053	<i>nasA</i>	Αφομοιωτική νιτρική αναγωγή	Gr 21
HE814054	<i>nasA</i>	Αφομοιωτική νιτρική αναγωγή	Gr 45
HE814055	<i>nasA</i>	Αφομοιωτική νιτρική αναγωγή	Gr 46
HE814056	<i>nasA</i>	Αφομοιωτική νιτρική αναγωγή	Gr 50
HE814057	<i>nasA</i>	Αφομοιωτική νιτρική αναγωγή	Gr 57
HE814058	<i>nasA</i>	Αφομοιωτική νιτρική αναγωγή	Gr 65

**Πίνακας 3.6.** Αριθμός καταχώρισης στη βάση δεδομένων του NCBI, των υπό μελέτη στελεχών της *P. stutzeri*, για το γονίδιο της αφομοιωτικής νιτρώδους αναγωγής (μεγάλη υπομονάδα), *nasB*.

<b>Αριθμός καταχώρισης</b>	<b>Ονομασία γονιδίου</b>	<b>Λειτουργία γονιδίου</b>	<b>Στέλεχος <i>P. stutzeri</i></b>
<b>HE814037</b>	<i>nasB</i>	Αφομοιωτική νιτρώδης αναγωγή (μεγάλη υπομονάδα)	Gr 16
<b>HE814038</b>	<i>nasB</i>	Αφομοιωτική νιτρώδης αναγωγή (μεγάλη υπομονάδα)	Gr 17
<b>HE814039</b>	<i>nasB</i>	Αφομοιωτική νιτρώδης αναγωγή (μεγάλη υπομονάδα)	Gr 18
<b>HE814040</b>	<i>nasB</i>	Αφομοιωτική νιτρώδης αναγωγή (μεγάλη υπομονάδα)	Gr 19
<b>HE814041</b>	<i>nasB</i>	Αφομοιωτική νιτρώδης αναγωγή (μεγάλη υπομονάδα)	Gr 20
<b>HE814042</b>	<i>nasB</i>	Αφομοιωτική νιτρώδης αναγωγή (μεγάλη υπομονάδα)	Gr 21
<b>HE814043</b>	<i>nasB</i>	Αφομοιωτική νιτρώδης αναγωγή (μεγάλη υπομονάδα)	Gr 45
<b>HE814044</b>	<i>nasB</i>	Αφομοιωτική νιτρώδης αναγωγή (μεγάλη υπομονάδα)	Gr 46
<b>HE814045</b>	<i>nasB</i>	Αφομοιωτική νιτρώδης αναγωγή (μεγάλη υπομονάδα)	Gr 50
<b>HE814046</b>	<i>nasB</i>	Αφομοιωτική νιτρώδης αναγωγή (μεγάλη υπομονάδα)	Gr 57
<b>HE814047</b>	<i>nasB</i>	Αφομοιωτική νιτρώδης αναγωγή (μεγάλη υπομονάδα)	Gr 65

## IV. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Την τελευταία δεκαετία ήταν γενικά αποδεκτό ότι τα στελέχη του γένους *Pseudomonas sensu stricto* δεν εμφάνιζαν την ικανότητα αζωτοδέσμευσης (Young et al., 1992). Προσφάτως, αυτή η άποψη κατερρίφθη, αφού σημαντικός αριθμός αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν από την ριζόσφαιρα αγρωστωδών φυτών όπως σόργου (Krotzky and Werner 1987, Yu et al., 2011), ρυζιού (Yu et al., 1991) σίτου (Venieraki et al., 2011a) και κριθαριού (Venieraki et al., 2011b), βρέθηκε ότι ανήκουν στο είδος της *Pseudomonas stutzeri*. Επιπροσθέτως, μια αζωτοσεσμευτική ψευδομονάδα, η *P. azotifigens*, απομονώθηκε από κομποστοποιημένο λίπασμα (Hatayama et al., 2005).

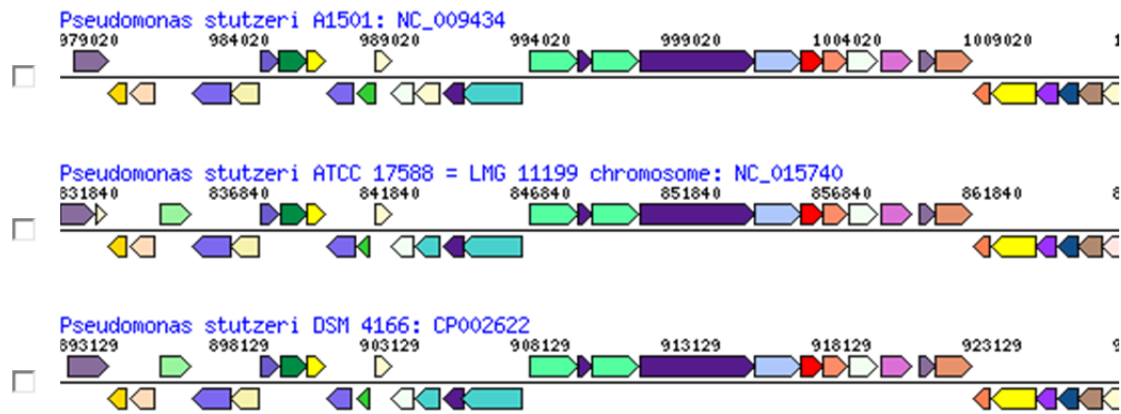
Η συλλογή αζωτοδεσμευτικών στελεχών *Pseudomonas* (έντεκα στελεχών) που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, αποτελείται από εννέα στελέχη (Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45, Gr46 and Gr50) φυλογενετικά σχετιζόμενα με την *P. stutzeri* και δύο στελέχη (Gr57 and Gr65) σχετιζόμενα με το είδος της *Pseudomonas* αλλά δεν φαίνεται να ανήκουν στο είδος *P. stutzeri*. Όλα τα παραπάνω στελέχη εμφανίζουν την ικανότητα δέσμευσης του αζώτου όπως αυτό αποδείχθηκε από τα πειραματικά αποτελέσματα της δοκιμασίας αναγωγής του ακετυλενίου (acetylene reduction assay), καθώς και από την παρουσία στο γονιδίωμα των στελεχών γονιδίων που σχετίζονται με την αζωτοδέσμευση (Venieraki et al., 2011a; Venieraki et al., 2011b).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι όλα τα αζωτοδεσμευτικά στελέχη της *Pseudomonas* που μελετήθηκαν φέρουν, εκτός από τα γονίδια που εμπλέκονται στη δέσμευση του αζώτου, γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην διαδικασία της απονιτροποίησης καθώς και στην διαδικασία της αφομοίωσης του αζώτου. Η απονιτροποίηση, η οποία είναι μια μικροβιακή διαδικασία που συμμετέχει στον κύκλο του αζώτου, αποτελεί ένα από τα προαιρετικά μονοπάτια αναπνοής στους μικροοργανισμούς, ανάγοντας τα νιτρικά και νιτρώδη ιόντα καθώς και το μονοξειδίο και υποξειδίο του αζώτου σε μοριακό άζωτο. Τα μελετηθέντα γονίδια *narJ*,

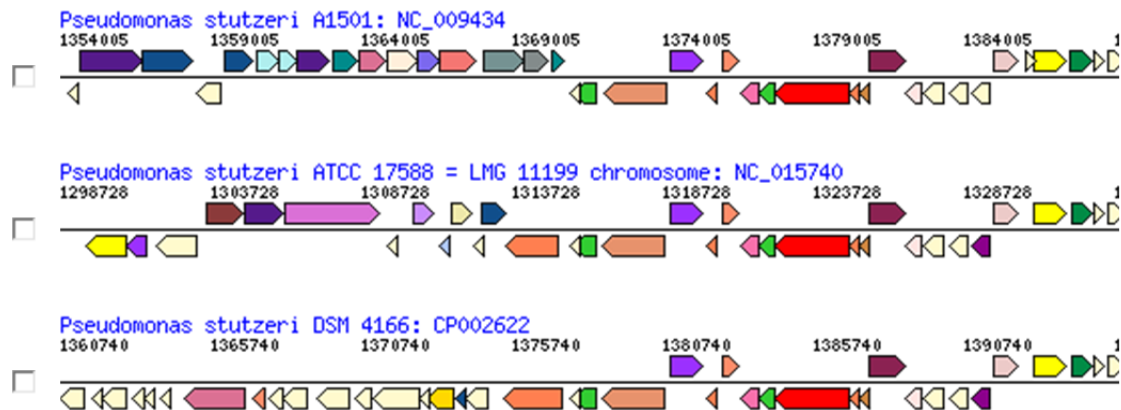
*narA*, *nirS* και *nosZ* είναι κύριοι αντιπρόσωποι της ομάδας γονιδίων που εμπλέκονται στην απονιτροποίηση και είναι γνωστό ότι ανήκουν σε τέσσερις διαφορετικές συστάδες γονιδίων των αζωτοδεσμευτικών και μη αζωτοδεσμευτικών στελεχών της *P. stutzeri*. Η γονιδιακή ανάλυση για εύρεση ορθόλογων γονιδίων (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi?page=home>) ανέδειξε ότι οι τέσσερις συστάδες γονιδίων εμφανίζονται να είναι συνταινιακές σε όλα σχεδόν τα στελέχη της *P. stutzeri* (Εικόνα. 4.1) και εμφανίζουν μεγάλη νουκλεοτιδική ομολογία. Η παρουσία των γονιδίων που εμπλέκονται στην διαδικασία της απονιτροποίησης ήταν αναμενόμενη σε όλα τα στελέχη, αν επειδή τα γονίδια αυτά εντοπίζονται στο βασικό γονιδίωμα (core genome) της *P. stutzeri* (Cladera et al., 2004). Διάφορα άλλα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια εμφανίζουν επίσης απονιτροποιητική δράση, όπως το *Azotobacter vinelandii* (Guitierrez et al., 1997) και το *Azospirillum brasilense* (Steenhoudt et al., 2001). Τα γονίδια των οργανισμών αυτών που εμπλέκονται στην απονιτροποίηση έχει αποδειχτεί ότι εκφράζονται κατά την διάρκεια της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Μετά από συνολική ανάλυση της έκφρασης γονιδίων σε επίπεδο RNA, έχει δειχθεί ότι στα αζωτοδεσμευτικά στελέχη του *P. stutzeri*, οι ομάδες των γονιδίων που βρίσκονται εντός της νησίδας αζωτοδέσμευσης στο DNA εκφράζονται συντονισμένα υπό συνθήκες επαγόμενης αζωτοδέσμευσης (0.5% O<sub>2</sub> και 0.1mM N<sub>2</sub>) μαζί με γονίδια τα οποία εμπλέκονται στις διαδικασίες της αζωτοδέσμευσης, επάγεται η έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην αφομοίωση του αζώτου, στην απονιτροποίηση καθώς και στην αναγωγή των νιτρωδών ιόντων σε ιόντα αμμωνίου (Yan et al., 2010), υποδεικνύοντας ότι όλες αυτές οι διαδικασίες επιτελούνται ταυτόχρονα.

## Συζήτηση - Συμπεράσματα

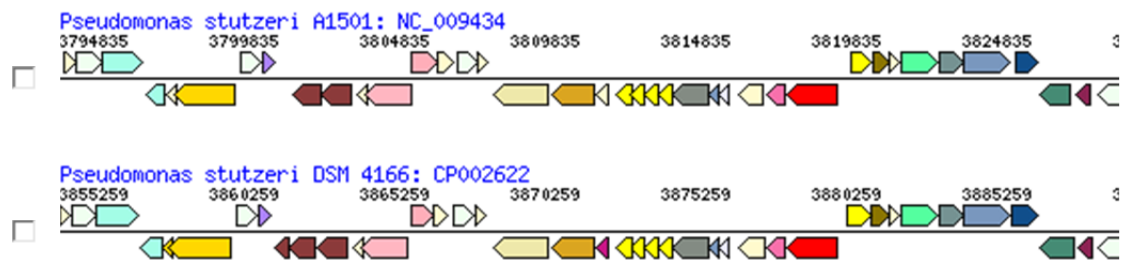
### *narG*



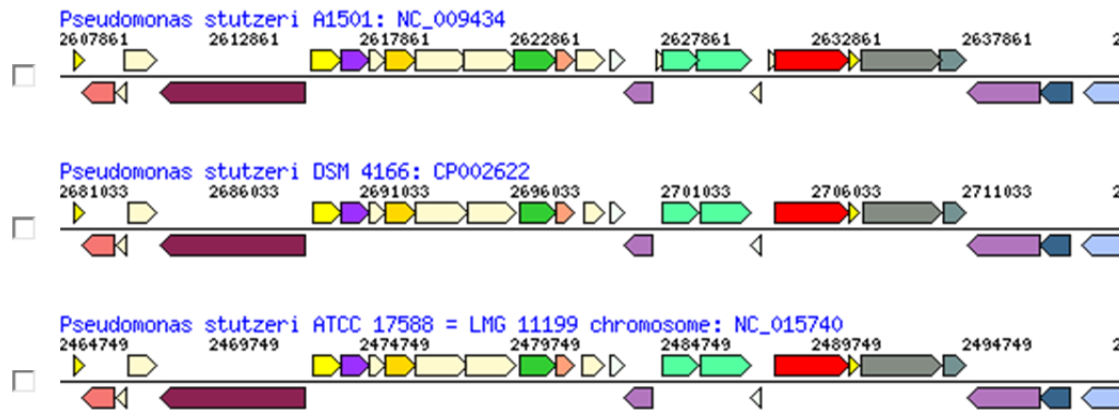
### *napA*



### *nirS-nosZ*



*nasA-nasB*



Εικόνα 4.1: Οργάνωση των γονιδίων των στελεχών A1501, DMS4166 και ATCC17588 της *P. stutzeri* που συμμετέχουν στην αφομοίωση των νιτρικών ιόντων και στην πορεία απονιτροποίησης

Για να εκτιμηθεί η γενετική ποικιλομορφία των γονιδίων απονιτροποίησης, ένα τμήμα DNA που αντιστοιχεί σε σημαντικό τμήμα των γονιδίων *narJ*, *napA*, *nirS* και *nosZ* ενισχύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Τα ενισχυμένα προϊόντα υποκλωνοποιήθηκαν και στη συνέχεια αναγνώσθηκε η αλληλουχία τους. Με βάση την ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου *nirS*, τα έντεκα απομονωθέντα στελέχη ταξινομήθηκαν σε δύο διαφορετικές ομάδες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5. Τα στελέχη GR16-Gr50 ομαδοποιήθηκαν μαζί με το στέλεχος *P. stutzeri* ATCC14405 χρησιμοποιώντας ως στελέχη αναφοράς τα *P. stutzeri* A1501 και DMS4166. Τα στελέχη Gr57 και GR65 ομαδοποιούνται γειτονικά του *P. brassicacearum* FNM421. Η φυλογένεση που διαμορφώθηκε με τη χρήση των ενισχυμένων αλληλουχιών του γονιδίου *napA* έδειξε ότι τα στελέχη Gr57 και Gr65 σχηματίζουν ένα ξεχωριστό κλάδο που γεινιάζει με τα είδη της *P. aeruginosa*, ενώ η φυλογενετική θέση για τα υπόλοιπα εννέα είδη αποκαλύπτει τις *P. stutzeri* DMS4166, ATCC17588 και A1501 ως τα πιο κοντινά τους στελέχη. Οι φυλογενέσεις με βάση τις ενισχυμένες αλληλουχίες των *nosZ* και *narJ* γονιδίων έδειξε ότι όλοι τα απομονωθέντα στελέχη ομαδοποιούνται μαζί με τον *P. stutzeri*.

Είναι γνωστό ότι ορισμένα ετεροτροφικά βακτήρια εμφανίζουν την ικανότητα ανάπτυξης σε θρεπτικά μέσα στα οποία η μοναδική πηγή αζώτου είναι τα νιτρικά ιόντα ( $\text{NO}_3^-$ ). Η αφομοίωση των νιτρικών ιόντων επιτελείται σε τρία βήματα: την πρόσληψη, την αναγωγή τους σε νιτρώδη ιόντα και την περαιτέρω αναγωγή αυτών σε ιόντα αμμωνίου. Η αφομοίωση των νιτρικών ιόντων απαιτεί την αναγωγική δράση

των αναπνευστικών (*Nar*), των περιπλασμικών (*Nap*) και των αφομοιωτικών (*Nas*) αναγωγασών των νιτρικών και των νιτρωδών ιόντων (Moreno-Vivian et al., 1999). Ο έλεγχος των μέχρι σήμερα διαθέσιμων γονιδιακών αλληλουχιών από προκαρυωτικούς οργανισμούς ανέδειξε ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στην αφομοίωση των νιτρικών εντοπίζονται σε ευρεία ποικιλία οργανισμών. Για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλομορφίας των γονιδίων που εμπλέκονται αφομοίωση των νιτρικών ιόντων, δυο ενδογονιδιακά τμήματα DNA που αντιστοιχούν στα γονίδια *nasA* και *nasB* ενισχύθηκαν. Τα ενισχυμένα προϊόντα εμφάνισαν το αναμενόμενο μέγεθος υποδεικνύοντας ότι όλοι οι απομονωθέντες οργανισμοί διαθέτουν όλα τα απαιτούμενα γονίδια για την μετατροπή των νιτρικών σε ιόντα αμμωνίου. Το φυλογενετικό δένδρο που κατασκευάστηκε με την χρήση των *nasA* αλληλουχιών DNA (Εικόνα 4.1) βρίσκεται σε συμφωνία με εκείνο που κατασκευάστηκε από την σύγκριση των αλληλουχιών για 16S rRNA γονίδιο. Τα στελέχη Gr57 και Gr65 σχηματίζουν έναν ξεχωριστό κλάδο ενώ τα υπόλοιπα εννέα στελέχη ομαδοποιούνται με την *P. stutzeri*. Αντιθέτως, τα φυλογενετικά δένδρα που κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας τις *nasB* ενισχυμένες αλληλουχίες DNA αποκάλυψε όλα τα εξεταζόμενα στελέχη ομαδοποιούνται με την *P. stutzeri* (Εικόνα 3.7).

Η φυλογενετική ανάλυση που διεξήχθη με βάση τις 16S rDNA αλληλουχίες, τα απομονωθέντα στελέχη που ελήφθησαν από τα εδάφη της ριζόσφαιρας σίτου κριθαριού που καλλιεργούνται στην Ελλάδα, ομαδοποιούνται με στελέχη του είδους *P. stutzeri* όπως το *P. stutzeri* ATCC17588, ενώ τα στελέχη Gr57 και GR65 που συλλέχθηκαν από την ριζόσφαιρα του κριθαριού ομαδοποιούνται γειτονικά του *P. mendonica* υποδεικνύοντας ότι τα στελέχη αυτά ίσως ανήκουν σε ένα νέο είδος *Pseudomonas* sp. Αυτό το γεγονός ενισχύεται και από το φυλογενετικό δέντρο των *napA*, *nirS* και *nasB* γονιδίων.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής παρέχουν αδιαμφισβήτητα δεδομένα ότι όλα τα διαζωτροφικά στελέχη που ελέχθησαν εμπεριέχουν στο γονιδίωμά τους τα γονίδια που απαιτούνται για την απονιτροποίηση και αφομοίωση των νιτρικών ιόντων. Επιπροσθέτως, επιπλέον δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι τα στελέχη Gr57 και Gr65 ανήκουν σε ένα νέο είδος *Pseudomonas*.



## V. Βιβλιογραφία

- Ahn YH (2006) Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochem* 41:1709-1721.
- Alexander JJ and Lewis JF (1976) Pitting of agar surface by *Pseudomonas stutzeri*. *J Clin Microbiol* 3:381-381.
- Amann R, Ludwig W, Schulz R, Spring S, Moore E and Schleifer KH (1996) rRNA-targeted oligonucleotide probes for the identification of genuine and former *Pseudomonads*. *Syst Appl Microbiol* 19:501-509.
- Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H and Oyaizu H (2000) Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonads* based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1563-1589.
- Arai H, Igarashi Y and Kodama T (1995) Expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel *crp/fnr*-related transcriptional regulator, *dnr*, in addition to *anr*. *Febs Lett* 371:73-76.
- Baikalov I, Schröder I, Kaczor-Grzeskowiak M, Cascio D, Gunsalus RP and Dickerson RE (1998) *narL* dimerization? Suggestive evidence from a new crystal form. *Biochemistry* 37:3665-3676.
- Bashan Y, Holguin G, and de-Bashan LE (2004) *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol* 50:521-577.
- Baumann P, Bowditch RD, Baumann L, and Beaman B (1983) Taxonomy of marine *Pseudomonas* species – *Pseudomonas stanieri* sp-nov, *Pseudomonas perfectomarina* sp-nov, nom-rev, *Pseudomonas nautica*, and *Pseudomonas doudoroffii*. *Int J Syst Bacteriol* 33:857-865.
- Bennasar A, Guasp C, and Lalucat J (1998) Molecular methods for the detection and identification of *Pseudomonas stutzeri* in pure culture and environmental samples. *Microbial Ecol* 35:22-33.
- Bennasar A, Guasp C, Tesar M, and Lalucat J (1998) Genetic relationships among *Pseudomonas stutzeri* strains based on molecular typing methods. *J Appl Microbiol* 85:643-656.

- Bennasar A, Rossello Mora R, Lalucat J, and Moore ERB (1996) 16S rRNA gene sequence analysis relative to genomovars of *Pseudomonas stutzeri* and proposal of *Pseudomonas balearica* sp nov. *Int J Syst Bacteriol* 46:200-205.
- Bergan, T (1981) Human and animal pathogenic members of the genus *Pseudomonas*, p 666–700. In A Balows, H G Trüper, H Dworkin, W Harder, and K H. Schleifer (ed), *The prokaryotes*, vol I Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Bothe H, Jost G, Schlöter M, Ward BB, and Witzel KP (2000) Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *Fems Microbiol Rev* 24:673-690.
- Braker G, Zhou JZ, Wu LY, Devol AH, and Tiedje JM (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Appl Environ Microb* 66:2096-2104.
- Braun C and Zumft WG (1991) Marker exchange of the structural genes for nitric-oxide reductase blocks the denitrification pathway of *Pseudomonas stutzeri* at nitric-oxide. *J Biol Chem* 266:22785-22788.
- Braun C and Zumft WG (1992) The structural genes of the nitric-oxide reductase complex from *Pseudomonas stutzeri* are part of a 30-kilobase gene-cluster for denitrification. *J Bacteriol* 174:2394-2397.
- Brown K, Tegoni M, Prudêncio M, Pereira AS, Besson S, Moura JJ, Moura I and Cambillau C (2000) A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. *Nat Struct Biol* 7:191-195.
- Bruce LC, 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, Israel. *Ecol Model* 193:412-436.
- Busse J and Auling G (1988) Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the Proteobacteria. *Syst Appl Microbiol* 11:1-8.
- Chapelle A, Ménesguen A, Deslous-Paoli JM, Souchu P, Mazouni N, Vaquer A and Millet B (2000) Modelling nitrogen, primary production and oxygen in a Mediterranean lagoon: Impact of oysters farming and inputs from the watershed. *Ecol Model* 127:161-181.

- Christian RR, 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. *Ecol Model* 87:111-129.
- Cladera AM, Bennasar A, Barcelo M, Lalucat J, and Garcia-Valdes E (2004) Comparative genetic diversity of *Pseudomonas stutzeri* genomovars, clonal structure, and phylogeny of the species. *J Bacteriol* 186:5239-5248.
- Cladera AM, Sepúlveda-Torres LC, Valens-Vadell M, Meyer JM, Lalucat J and García-Valdés E (2006) A detailed phenotypic and genotypic description of *Pseudomonas* strain OX1. *Syst Appl Microbiol* 29:422-430.
- Conrad R (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O, and NO). *Microbiol Rev* 60:609.
- Corbeels M, McMurtrie RE, Pepper DA, and O'Connell AM (2005) A process-based model of nitrogen cycling in forest plantations, Part II, simulating growth and nitrogen mineralisation of *Eucalyptus globulus* plantations in south-western Australia. *Ecol Model* 187:449-474.
- Coyle CL, Zumft WG, Kroneck PMH, Korner H, and Jakob W (1985) Nitrous-oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina* - purification and properties of a novel multicopper enzyme. *Eur J Biochem* 153:459-467.
- Cozar, E (1987) Caracterización taxonómica, fisiológica y bioquímica de nuevas *Pseudomonas marina* degradadoras de hidrocarburos cíclicos. Ph.D. thesis. Universitat de les Illes Balears (UIB), Palma de Mallorca, Spain.
- Cuypers H, Berghofer J, and Zumft WG (1995) Multiple *nosZ* promoters and anaerobic expression of *nos* genes necessary for *Pseudomonas stutzeri* nitrous-oxide reductase and assembly of its copper centers. *BBA-Gene Struct Expr* 1264:183-190.
- Cuypers H, Viebrocksambale A, and Zumft WG (1992) NosR, a membrane-bound regulatory component necessary for expression of nitrous-oxide reductase in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol* 174:5332-5339.
- Deboer APN, Reijnders WNM, Kuenen JG, Stouthamer AH, and Vanspanning RJM (1994) Isolation, sequencing and mutational analysis of a gene-cluster involved in nitrite reduction in *Paracoccus denitrificans*. *Anton Leeuw Int J G* 66:111-127.

## Βιβλιογραφία

Diallo MD, Willems A, Vloemans N, Cousin S, Vandekerckhove TT, de Lajudie P, Neyra M, Vyverman W, Gillis M and Van der Gucht K (2004) Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environ Microbiol* 6:400-415.

Dreusch A, Riester J, Kroneck PMH, and Zumft WG (1996) Mutation of the conserved cys165 outside of the Cu-A domain destabilizes nitrous oxide reductase but maintains its catalytic activity - evidence for disulfide bridges and a putative protein disulfide isomerase gene. *Eur J Biochem* 237:447-453.

Eady, RR (1991) The dinitrogen-fixing bacteria In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W and Schleifer KH (Ed), *The Prokaryotes* (pp. 534-553). New York: Springer-Verlag.

Ekelund F, Ronn R, and Griffiths BS (2001) Quantitative estimation of flagellate community structure and diversity in soil samples. *Protist* 152:301-314.

Elmerich, C (2007) Historical perspective: from bacterization to endophytes In: Elmerich C and Newton WE (Ed), *Assosiative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and Cyanobacterial Associations*, 1-20.

Euzéby, JP (1997) List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *Int J Syst Bacteriol* 47: 590-592.

Falkowski PG (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.

Franche C, Lindstrom K, and Elmerich C (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321:35-59.

Gavini F, Holmes B, Izard D, Beji A, Bernigaud A and Jakubczak E (1989) Numerical taxonomy of *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas stutzeri*, and related bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 39:135-144.

Ginard M, Lalucat J, Tummeler B, and Romling U (1997) Genome organization of *Pseudomonas stutzeri* and resulting taxonomic and evolutionary considerations. *Int J Syst Bacteriol* 47:132-143.

## Βιβλιογραφία

- Glockner AB and Zumft WG (1996) Sequence analysis of an internal 9.72-kb segment from the 30-kb denitrification gene cluster of *Pseudomonas stutzeri*. *BBA-Bioenergetics* 1277:6-12.
- Gruntzig V, Nold SC, Zhou JZ, and Tiedje JM (2001) *Pseudomonas stutzeri* nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 67:760-768.
- Gutierrez JC, Santero E, and Tortolero M (1997) Ammonium repression of the nitrite-nitrate (*nasAB*) assimilatory operon of *Azotobacter vinelandii* is enhanced in mutants expressing the *nifO* gene at high levels. *Mol Gen Genet* 255:172-179.
- Handelsman J and Stabb EV (1996) Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8:1855-1869.
- Hartig E, Schiek U, Vollack KU, and Zumft WG (1999) Nitrate and nitrite control of respiratory nitrate reduction in denitrifying *Pseudomonas stutzeri* by a two-component regulatory system homologous to *narXL* of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:3658-3665.
- Hatayama K, Kawai S, Shoun H, Ueda Y, and Nakamura A (2005) *Pseudomonas azotifigens* sp nov., a novel nitrogen-fixing bacterium isolated from a compost pile. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1539-1544.
- He WN, Tian WD, Zhang G, Chen GQ, and Zhang ZM (1998) Production of novel polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soybean oil. *Fems Microbiol Lett* 169:45-49.
- Hendriks J, Oubrie A, Castresana J, Urbani A, Gemeinhardt S and Saraste M (2000) Nitric oxide reductases in bacteria. *BBA-Bioenergetics* 1459:266-273.
- Hochstein LI and Tomlinson GA (1988) The enzymes associated with denitrification. *Annu Rev Microbiol* 42:231-261.
- Holmes B, Izard D, Beji A, Bernigaud A and Jakubczak E
- Hsu SF, and Buckley DH (2009) Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. *Isme J* 3:124-136.
- Hulse CL and Averill BA (1990) Isolation of a high specific activity pink, monomeric nitrous-oxide reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Bioch Bioph Res Com* 166:729-735.

## Βιβλιογραφία

- Hurek T, Reinhold B, and Niemann EG (1987) Effect of oxygen on  $\text{NH}_4^+$ -grown continuous cultures of *Azospirillum* spp and diazotrophic rods closely associated with Kallar grass. *Can J Microbiol* 33:919-922.
- Ikemoto S, Kuraishi H, Komagata K, Ajuma R, Suto T, and Murooka H (1978) Cellular fatty-acid composition in *Pseudomonas* species. *J Gen Appl Microbiol* 24:199-213.
- Jones DL and Hinsinger P (2008) The rhizosphere: complex by design. *Plant Soil* 312:1-6.
- Jungst A and Zumft WG (1992) Interdependence of respiratory no reduction and nitrite reduction revealed by mutagenesis of *nirQ*, a novel gene in the denitrification gene-cluster of *Pseudomonas stutzeri*. *Febs Lett* 314:308-314.
- Jungst A, Braun C, and Zumft WG (1991) Close linkage in *Pseudomonas stutzeri* of the structural genes for respiratory nitrite reductase and nitrous-oxide reductase, and other essential genes for denitrification. *Mol Gen Genet* 225:241-248.
- Jungst A, Wakabayashi S, Matsubara H, and Zumft WG (1991) The *nirStbm* region coding for cytochrome-cd1-dependent nitrite respiration of *Pseudomonas stutzeri* consists of a cluster of monoheme, diheme, and tetraheme proteins. *Febs Lett* 279:205-209.
- Kercher JR and Chambers JQ (2001) Parameter estimation for a global model of terrestrial biogeochemical cycling by an iterative method. *Ecol Model* 139:137-175.
- Klucas, RV (1991) Associative nitrogen fixation in plants In: Dilworth MJ and Glenn AR (Ed), *Biology and biochemistry of nitrogen fixation*. Amsterdam: Elsevier.
- Knowles R (1982) Denitrification. *Microbiol Rev* 46:43-70.
- Knowles, R and Baraqqio, WL (1994) Fre-living dinitrogen-fixing bacteria In: Weaver RW, Angle S, Bottomley P, Bezdicek D, Smith S, Tabatabai A and Wollum A (Ed), *Methods of soil analysis Part 2 Microbiological and biochemical properties* (pp. 179-197). Soil Science Society of America, Madison: Wisconsin Inc.
- Krotzky A and Werner D (1987) Nitrogen-fixation in *Pseudomonas stutzeri*. *Arch Microbiol* 147:48-57.
- Lalucat J, Bennasar A, Bosch R, Garcia-Valdes E and Palleroni NJ (2006) Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol Mol Biol R* 70:510-+.

## Βιβλιογραφία

- Lautrop H and Jessen O (1964) On the distinction between polar monotrichous and lophotrichous flagellation in green fluorescent *Pseudomonads*. *Acta Path Microbiol Scand* 60:588-598.
- Lin BL, Sakoda A, Shibasaki R, Goto N and Suzuki M (2000) Modelling a global biogeochemical nitrogen cycle in terrestrial ecosystems. *Ecol Model* 135:89-110.
- Lin JT and Stewart V (1998) Nitrate assimilation by bacteria. *Adv Microb Physiol* 39:1-30.
- Madigan MT, Martinko JM and Parker J Brock biology of microorganisms, pearson education, Inc. Για την Ελληνική έκδοση: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. (2005) Κρήτη.
- Mantelin S and Touraine B (2004) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J Exp Bot* 55:27-34.
- McNeil BE, Martell RE and Read JM (2006) GIS and biogeochemical models for examining the legacy of forest disturbance in the Adirondack Park, NY, USA. *Ecol Model* 195(3-4):281-295.
- Metting F and B Jr (1993) Structure and physiological ecology of soil microbial communities. In: Metting FB (Ed), *Soil Microbial Ecology Applications in Agricultural and Environmental Management* (pp. 17-21). New York: Marcel Dekker Inc.
- Moreno-Vivian C, Cabello P, Martinez-Luque M, Blasco R and Castillo F (1999) Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol* 181:6573-6584.
- Morishita Y, Hasegawa K, Matsuura Y, Katsube Y, Kubota M and Sakai S (1997) Crystal structure of a maltotetraose-forming exo-amylase from *Pseudomonas stutzeri*. *J Mol Biol* 267:661-672.
- Mrozik A, Labuzek S and Piotrowska-Seget Z (2005) Changes in fatty acid composition in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri* during naphthalene degradation. *Microbiol Res* 160:149-157.
- Mrozik A, Labuzek S and Piotrowska-Seget Z (2005) Whole cell-derived fatty acid profiles of *Pseudomonas* sp. JS150 during naphthalene degradation. *Pol J Microbiol* 54:137-144.



Obradors N and Aguilar J (1991) Efficient biodegradation of high-molecular-weight polyethylene glycols by pure cultures of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl Environ Microbiol* 57:2383-2388.

Ohura T, Kasuya KI and Doi Y (1999) Cloning and characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase gene of *Pseudomonas stutzeri* and analysis of the function of substrate-binding domains. *Appl Environ Microbiol* 65:189-197.

Okon Y, Albrecht SL and Burris RH (1976) Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. *J Bacteriol* 127:1248-1254.

Ortega-Calvo JJ, Marchenko AI, Vorobyov AV and Borovick RV (2003) Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from coal-tar- and oil-polluted rhizospheres. *Fems Microbiol Ecol* 44:373-381.

Oyaizu H and Komagata K (1983) Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty-acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty-acids. *J Gen Appl Microbiol* 29:17-&.

Palleroni NJ (2010) The *Pseudomonas* Story. *Environ Microbiol* 12:1377-1383.

Palleroni NJ, Doudoroff M, Stanier RY, Solanes RE and Mandel M (1970) Taxonomy of the aerobic *Pseudomonads*: the properties of the *Pseudomonas stutzeri* group. *J Gen Microbiol* 60:215-231.

Palmedo G, Seither P, Körner H, Matthews JC, Burkhalter RS, Timkovich R and Zumft WG (1995) Resolution of the *nirD* locus for heme d1 synthesis of cytochrome cd1 (respiratory nitrite reductase) from *Pseudomonas stutzeri*. *Eur J Biochem* 232:737-746.

Parales, RE, Ferrandez A and Harwood CS (2004) Chemotaxis in *Pseudomonas*, p 793–816 In J L Ramos (ed), *Pseudomonas*, vol 1 Kluwer academic/plenum publishers. New York, NY

Philippot L (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Bioch Bioph Acta* 1577:355-376.

Porter JR (1976) Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriol Rev* 40:260-269.

## Βιβλιογραφία

- Pot B, van Damme P and Kersters K (1994) Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints In M Goodfellow and AG O'Donell (Ed), Chemical methods in prokaryotic systematics. John Wiley and Sons, Ltd, New York, NY
- Potter M, Oppermann-Sanio FB and Steinbuchel A (2001) Cultivation of bacteria producing polyamino acids with liquid manure as carbon and nitrogen source. *Appl Environ Microb* 67(2):617-622.
- Prescott LM, Harley JP and Klein DA (1999) *Microbiology* (4<sup>th</sup> edn). Boston: McGraw-Hill.
- Rainey PB, Thompson IP and Palleroni NJ (1994) Genome and fatty acid analysis of *Pseudomonas stutzeri*. *Int J Syst Bacteriol* 44(1):54-61.
- Richardson DJ, Berks BC, Russell DA, Spiro S and Taylor CJ (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 58:165-178.
- Rossello R, Garciavaldes E, Lalucat J and Ursing J (1991) Genotypic and phenotypic diversity of *Pseudomonas stutzeri*. *Syst Appl Microbiol* 14:150-157.
- Rossello R, Garciavaldes E, Macario AJL, Lalucat J and Demacario EC (1992) Antigenic diversity of *Pseudomonas stutzeri*. *Syst Appl Microbiol* 15(4):617-623.
- Rossello-Mora R and Amann R (2001) The species concept for prokaryotes. *Fems Microbiol Rev* 25:39-67.
- Rossellomora RA, Garciavaldes E and Lalucat J (1993) Taxonomic relationship between *Pseudomonas perfectomarina* zobell and *Pseudomonas stutzeri*. *Int J Syst Bacteriol* 43:852-854.
- Rossellomora RA, Lalucat J, Dott W and Kampfer P (1994) Biochemical and chemotaxonomic characterization of *Pseudomonas stutzeri* genomovars. *J Appl Bacteriol* 76:226-233.
- Rosselló-Mora RA (1992) Caracterización taxonómica de cepas de *Pseudomonas stutzeri* degradadoras y no degradadoras de naftaleno. PhD thesis. Universitat de les Illes Balears (UIB), Palma de Mallorca, Spain.
- Rozsak DB and Colwell RR (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* 51:365-379.

Schell MA (1993) Molecular biology of the *lysR* family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 47:597-626.

Schmidt KD, Tummeler B and Romling U (1996) Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *J Bacteriol* 178:85-93.

Shinoda S and Okamoto K (1977) Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella. *J Bacteriol* 129:1266-1271.

Sikorski J, Mohle M and Wackernagel W (2002) Identification of complex composition, strong strain diversity and directional selection in local *Pseudomonas stutzeri* populations from marine sediment and soils. *Environ Microbiol* 4(8):465-476.

Smith GB and Tiedje JM (1992) Isolation and characterization of a nitrite reductase gene and its use as a probe for denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58(1):376-384.

Snyder SW and Hollocher TC (1987) Purification and some characteristics of nitrous-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem* 262:6515-6525.

Somers E, Vanderleyden J and Srinivasan M (2004) Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol* 30(4):205-240.

SooHoo CK and Hollocher TC (1991) Purification and characterization of nitrous oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa* strain P2. *J Biol Chem* 266:2203-2209.

Sorokin DY, Teske A, Robertson LA and Kuenen JG (1999) Anaerobic oxidation of thiosulfate to tetrathionate by obligately heterotrophic bacteria, belonging to the *Pseudomonas stutzeri* group. *Fems Microbiol Ecol* 30:113-123.

Stanier RY, Palleroni NJ and Doudoroff M (1966) The aerobic *Pseudomonads*: a taxonomic study. *J Gen Microbiol* 43:159-271.

Stead DE (1992) Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp by using cellular fatty-acid profiles. *Int J Syst Bacteriol* 42(2):281-295.

Steenhoudt O and Vanderleyden J (2000) Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *Fems Microbiol Rev* 24:487-506.

## Βιβλιογραφία

Steenhoudt O, Keijers V, Okon Y and Vanderleyden J (2001) Identification and characterization of a periplasmic nitrate reductase in *Azospirillum brasilense* Sp245. *Arch Microbiol* 175:344-352.

Stouthamer AH (1991) Metabolic-regulation including anaerobic metabolism in *Paracoccus denitrificans*. *J Bioenerg Biomem* 23(2):163-185.

Taiz, L and Zeiger E (1998) *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates Inc.

Tiedje JM (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium In: Zehnder AJB, editor Ecology of anaerobic microorganisms. New York: Wiley p 179–243.

Tsagou V, Kefalogianni I, Sini K and Aggelis G (2003) Metabolic activities in *Azospirillum lipoferum* grown in the presence of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. *Appl Microbiol Biot* 62(5-6):574-578.

Vancanneyt M, Torck U, Dewettinck D, Vaerewijck M and Kersters K (1996) Grouping of *Pseudomonads* by SDS-PAGE of whole-cell proteins. *Syst Appl Microbiol* 19(4):556-568.

Vancanneyt M, Witt S, Abraham WR, Kersters K and Fredrickson HL (1996) Fatty acid content in whole-cell hydrolysates and phospholipid fractions of *Pseudomonads*: A taxonomic evaluation. *Syst Appl Microbiol* 19:528-540.

Vandam D and Vanbreemen N (1995) NICCE: a model for cycling of nitrogen and carbon isotopes in coniferous forest ecosystems. *Ecol Model* 79:255-275.

Venieraki A, Dimou M, Pergalis P, Kefalogianni I, Chatzipavlidis I and Katinakis P (2011) The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. *Microbial Ecol* 61:277-285.

Venieraki A, Dimou M, Vezyri E, Kefalogianni I, Argyris N, Liara G, Pergalis P, Chatzipavlidis I and Katinakis P (2011) Characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from field-grown barley, oat, and wheat. *J Microbiol* 49:525-534.

Viebrock A and Zumft WG (1988) Molecular-cloning, heterologous expression, and primary structure of the structural gene for the copper enzyme nitrous-oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol* 170:4658-4668.

Vollack K and Zumft WG (2001) Nitric oxide signaling and transcriptional control of denitrification genes in *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol* 183:2516-2526.

Vollack KU and Zumft WG (2001) Nitric oxide signaling and transcriptional control of denitrification genes in *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol* 183:2516-2526.

Vollack KU, Xie J, Hartig E, Romling U and Zumft WG (1998) Localization of denitrification genes on the chromosomal map of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 144:441-448.

Ward BB and Cockcroft AR (1993) Immunofluorescence detection of the denitrifying strain *Pseudomonas stutzeri* (ATCC14405) in seawater and intertidal sediment environments. *Microbial Ecol* 25:233-246.

Weaver RW and Graham PH (1994) Legume nodule symbionts In: Weaver RW, Angle S, Bottomley P, Bezdicsek D, Smith S, Tabatabai A and Wollum A (Ed), *Methods of soil analysis Part 2 Microbiological and biochemical properties* (pp. 199-222). Soil science society of America, Madison: Wisconsin Inc.

Yan Y, Ping S, Peng J, Han Y, Li L, Yang J, Dou Y, Li Y, Fan H, Fan Y, Li D, Zhan Y, Chen M, Lu W, Zhang W, Cheng Q, Jin Q and Lin M (2010) Global transcriptional analysis of nitrogen fixation and ammonium repression in root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Bmc Genom* 11:11.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7564-7569.

You CB, Song W, Wang HX, Li JP, Lin M and Hai WL (1991) Association of *Alcaligenes faecalis* with wetland rice. *Plant Soil* 137:81-85.

Young JPW (1992) Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: Stacey G, Burris RH and Evans HJ (Ed), *Biological nitrogen fixation* (pp. 43-86). New York: Chapman and Hall.

Yu HY, Yuan M, Lu W, Yang J, Dai S, Li Q, Yang Z, Dong J, Sun L, Deng Z, Zhang W, Chen M, Ping S, Han Y, Zhan Y, Yan Y, Jin Q and Lin M (2011) Complete genome sequence of the nitrogen-fixing and rhizosphere-associated bacterium *Pseudomonas stutzeri* strain DSM4166. *J Bacteriol* 193:3422-3423.

Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:533-+.

## Βιβλιογραφία

Zumft WG, Döhler K, Körner H, Löchelt S, Viebrock A and Frunzke K (1988) Defects in cytochrome cd1-dependent nitrite respiration of transposon tn5-induced mutants from *Pseudomonas stutzeri*. *Arch Microbiol* 149:492-498.

Zumft WG, Viebrocksambale A and Braun C (1990) Nitrous-oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri* - genes for copper-processing and properties of the deduced products, including a new member of the family of atp/gtp-binding proteins. *Eur J Biochem* 192:591-599.

Διαμαντίδης Γ (1994) *Εισαγωγή στη Βιοχημεία* (2<sup>η</sup> Έκδοση). Θεσσαλονίκη: University Studio Press.