ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ 16S rRNA

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ Γ. ΠΕΡΓΑΛΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2009

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχακής εργασίας με θέμα «Μελέτη αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων με βάση το γονίδιο 16S rRNA» έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας στις 19.6.08 (εξ αναβολής), οπότε ορίστηκε και η πενταμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή.

Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή
Επιβλέπων:
Κατινάκης Παναγιώτης-Καθηγητής

Μέλη:
Γεωργακόπουλος Δημήτριος-Επίκ. Καθηγητής
Μηλιώνη Δήμητρα-Επίκ. Καθηγήτρια
Ταμπακάκη Αναστασία-Λέκτορας
Φλεμετάκης Εμμανουήλ-Λέκτορας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ **10**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ **12**

ABSTRACT **14**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ **16**

Α.1 ΓΕΝΙΚΑ 16
Α.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΑΖΩΤΟΥ 17
Α.2.1 Ιστορική αναδρομή *17*
Α.2.2 Σημασία βιολογικής δέσμευσης αζώτου *18*
Α.2.3 Μηχανισμός βιολογικής δέσμευσης αζώτου *20*
Α.2.4 ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΟ ΚΟΣΤΟΣ 25
Α.2.5 ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΑΖΩΤΟΥ 27
Α.2.5.1 Συμβιωτικοί οργανισμοί *27*
Α.3 ΜΗ-ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΑ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ 32
Α.3.1 ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΔΙΑΒΙΩΣΗΣ *32*
Α.3.1.1 *Azospirillum* 33
Α.3.1.2 *Pseudomonas* 38
Α.3.1.3 *Azotobacter* 41
Α.3.1.4 *Xanthobacter* 45
Α.3.1.5 *Beijerinckia* 46
Α.3.1.6 *Derxia* 47
Α.3.1.7 *Paenibacillus* και *Bacillus* 48
Α.3.1.8 *Clostridium* 49
Α.3.1.9 Φωτοσυνθετικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια 51
i) Πορφυρά μη θειικά βακτήρια 52
ii) Πορφυρά θειοβακτήρια (Chromatiaceae και Ectothiorhodospiraceae) 54
iii) Πράσινα θειοβακτήρια (οικ. Chlorobiaceae, φύλο Chlorobi) 55
iv) Πράσινα μη θειικά βακτήρια 56
v) Heliobacteriaceae (ηλιοβακτήρια) 56
Α.3.1.10 Archaea (αρχαιοβακτήρια) 57
Α.3.1.11 Θειοαναγωγικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια 59
Α.3.1.12 Μεθανοτροφικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια 59
Α.3.1.13 *Vibrio* 60
Α.3.1.14 *Magnetospirillum* και *Geobacter* 60
Α.3.1.15 *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*) 61
Α.3.1.16 Άλλοι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί 62
Α.3.2 ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΑ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ *63*
Α.3.2.1 *Gluconacetobacter* 64
Α.3.2.2 Άλλα αζωτοδεσμευτικά μέλη της οικογένειας Acetobacteraceae 67
Α.3.2.3 *Azoarcus* 68
Α.3.2.4 *Herbaspirillum* 72
Α.3.2.5 *Klebsiella* 74
Α.3.2.6 Άλλα αζωτοδεσμευτικά μέλη της οικογένειας Enterobacteriaceae 76
Α.3.2.7 *Burkholderia* 78
Α.3.2.8 *Aquaspirillum* 79
Α.3.2.9 *Alcaligenes* 80

Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ **81**

Β.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ 81
Β.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ 82
Β.2.1 Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από Gram (-) βακτήρια *82*
Β.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα E. coli *83*
i) Μέθοδος του βρασμού (Holmes & Quigley, 1981) 83
ii) με QIAprep Miniprep (QIAGEN) 84
Β.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ 84
Β.3.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων *84*
Β.3.2 Πέψη DNA με χρήση ένζυμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού *85*

Β.3.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης *86*
Β.3.4 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης *87*
Β.4 ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ 88
Β.4.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα *88*
Β.4.2 Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation) *89*
Β.5 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ E. COLI 90
Β.5.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων E. coli *90*
Β.5.2 Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων E. coli ικανών για μετασχηματισμό (Competent cells) *90*
Β.5.3 Μετασχηματισμός ικανών κυττάρων E. coli με πλασμίδια *90*
Β.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR) 91
Β.6.1 Αρχή της μεθόδου *91*
Β.6.2 Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR) *92*
Β.7 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ-SDS 93
Β.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ SDS (SDS-PAGE) 94
Β.8.1 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης *94*
Β.8.2 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση *95*
Β.8.3 Ηλεκτροφόρηση και ανίχνευση ζωνών μέσω βαφής με Coomassie Brilliant Blue R-250 ..... *95*
Β.9 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ, ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ 95
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄ 96
Σύνθεση Διαλυμάτων *96*
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄ 99
Σύνθεση Θρεπτικών Μέσων *99*
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ΄ 100
Μητρικά Διαλύματα Αντιβιοτικών *100*

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 101

Γ.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S RRNA 101
Γ.1.1 Ενίσχυση τμήματος γονιδίου 16S rRNA *103*
Γ.1.2 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων *105*
Γ.1.3 Φυλογενετικά δέντρα *106*
Γ.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ NIFH 110
Γ.2.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου nifH *112*
Γ.2.2 Ανάλυση 11 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών nifH των στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως Azospirillum βάσει της μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA *113*
Γ.2.2.1 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων (*Azospirillum*) 113
Γ.2.2.2 Φυλογενετικά δέντρα (*Azospirillum*) 114
Γ.2.3 Ανάλυση 6 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών nifH των στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως Pseudomonas βάσει της μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA *115*
Γ.2.3.1 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων (*Pseudomonas*) 115
Γ.2.3.2 Φυλογενετικό δέντρο (*Pseudomonas*) 115
Γ.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ IPDC 117
Γ.3.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου ipdC *119*
Γ.3.2 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων στελεχών *119*
Γ.3.3 Φυλογενετικά δέντρα *121*
Γ.4 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ DNAK 122
Γ.4.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου dnaK *124*
Γ.4.2 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων *124*
Γ.4.3 Φυλογενετικά δέντρα *126*
Γ.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ SDS-ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ 127

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 129

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ GENBANK ACCESSION NUMBERS 134

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΑΠΟΣΤΑΣΕΩΝ 136

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΥΘΥΓΡΑΜΜΙΣΕΩΝ 140

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 165

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην ταυτοποίηση και την ταξινόμηση αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων σχετιζόμενων με φυτά σκληρού σιταριού της ελληνικής χλωρίδας. Στο παρελθόν δεν έχει πραγματοποιηθεί ξανά μοριακή ανάλυση αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ελεύθερης διαβίωσης στον ελληνικό χώρο. Κατά την αξιολόγηση στελεχών ως προς την ικανότητά τους για προώθηση ανάπτυξης φυτών, το πρώτο βήμα πρέπει να είναι η ταυτοποίηση και η ταξινόμηση αυτών.

Θα ήθελα σε αυτό το σημείο να ευχαριστήσω όλους όσοι με βοήθησαν προκειμένου να ολοκληρωθεί αυτή η μελέτη:

Τον επιβλέποντα καθηγητή του Γ.Π.Α. Παναγιώτη Κατινάκη για την επιλογή του θέματος, τις εύστοχες παρατηρήσεις και τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις ως προς την κατεύθυνση της μελέτης.

Τον Επίκ. Καθηγητή Γεωργακόπουλο Δημήτριο, την Επίκ. Καθηγήτρια Μηλιώνη Δήμητρα, την Λέκτορα Ταμπακάκη Αναστασία και τον Λέκτορα Φλεμετάκη Εμμανουήλ, που δέχτηκαν να αποτελέσουν μέλη της Συμβουλευτική και Εξεταστικής Επιτροπής.

Την Διδάκτορα Αναστασία Βενιεράκη για το συνεχές και ειλικρινές ενδιαφέρον και για το γεγονός ότι χωρίς την βοήθειά της το αποτέλεσμα δεν θα ήταν το ίδιο.

Τον Λέκτορα του Γ.Π.Α. Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη και την Διδάκτορα Ηώ Κεφαλογιάννη του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας Γ.Π.Α. για την παροχή των βακτηριακών στελεχών και επιπρόθετων χρήσιμων πληροφοριών.

Όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας για την άψογη συνεργασία και την συναδελφικότητα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους αυτούς που με βοήθησαν, που στάθηκαν δίπλα μου και που πίστεψαν στις επιλογές μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καλλιέργεια σκληρού σιταριού είναι ευρέως διαδεδομένη στην ελληνική γεωργία. Όπως πολλά αγρωστώδη έτσι και το σκληρό σιτάρι έχει αυξημένες ανάγκες σε άζωτο, στοιχείο το οποίο δεν είναι διαθέσιμο σε μεγάλες ποσότητες στη φύση. Η τροφοδότηση της ριζόσφαιρας των σιτηρών με άζωτο στη φύση επιτελείται από αζωτοδεσμευτικά βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ταυτοποίηση με μοριακές μεθόδους 17 στελεχών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, τα οποία συλλέχθησαν από τη ριζόσφαιρα και ιστούς φυτικών δειγμάτων σκληρού σιταριού προερχόμενα από τα διαμερίσματα που αποτελούν τους κύριους σιτοβολώνες της Ελλάδας. Αρχικά, αναλύθηκε μοριακά η αναγωγάση της νιτρογενάσης *nifH* που εκφράζει τη σημαντικότερη ιδιότητα των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και, ακολούθως, δύο συντηρημένα γονίδια, το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 16S rRNA και το γονίδιο που κωδικοποιεί για την σαπερόνη DnaK. Επίσης, για ορισμένα στελέχη αναλύθηκε το γονίδιο το οποίο εκφράζει την αποκαρβοξυλάση του ινδολοπυροβικού οξέος (IpdC). Η αποκαρβοξυλάση του ινδολοπυρουβικού οξέος λαμβάνει μέρος στο μονοπάτι παραγωγής της αυξίνης ινδολοξικό οξύ, η οποία έχει θετική επίδραση στα φυτά αυξάνοντας την επιφάνεια του ριζικού τους συστήματος. Η φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε έδειξε ότι από τα 17 αζωτοδεσμευτικά στελέχη τα έντεκα ανήκουν στο γένος *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. oryzae* και *Azospirillum* sp.) και τα έξι στο είδος *Pseudomonas stutzeri*.

ABSTRACT

The cultivation of durum wheat is widespread in greek agriculture. Like many grasses, durum wheat has an increased demand for nitrogen, an element which is not available in large quantities in nature. The provision of nitrogen to the rhizosphere of grain in nature is accomplished by free-living diazotrophic bacteria. The purpose of this study is the identification by molecular methods of 17 strains of diazotrophic bacteria, collected from the rhizosphere and tissues of durum wheat plant samples deriving from regions that constitute the main grain growing regions of Greece. Initially, a molecular analysis of the Nitrogenase reductase *nifH* was conducted, expressing the most important property of diazotrophic bacteria and subsequently two housekeeping genes, the gene that encodes for the 16S rRNA and the gene that encodes for the chaperone DnaK. In addition, for certain strains, the gene which expresses the indole-pyruvate decarboxylase (IpdC) was analysed. The indole-pyruvate decarboxylase (IpdC) takes part in the production path of the auxin Indolic Acid, which has a positive effect on plants by increasing the surface of the root system. The phylogenetic analysis carried out showed that of the 17 strains of diazotrophic bacteria, 11 strains belong to the genus *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. oryzae* and *Azospirillum* sp.) and 6 strains belong to *Pseudomonas stutzeri* species.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α.1 Γενικά

Είναι πλέον ολοένα και περισσότερο αποδεκτό και παραδεκτό ότι η ποικιλότητα της ζωής στον πλανήτη, συμπεριλαμβανομένων των οικοσυστημάτων, των ειδών και των γονιδίων, είναι μια κληρονομιά αναντικατάστατη και ιδιαιτέρως σημαντική για την ευημερία του ανθρώπου. Κεντρικό ρόλο σε αυτήν την άποψη έχει το έδαφος και όλα τα στοιχεία που το απαρτίζουν (Jones & Hinsinger, 2008). Το έδαφος αποτελεί ένα δυναμικό και ζωντανό σύμπλεγμα το οποίο είναι το σημαντικότερο κομμάτι των χερσαίων οικοσυστημάτων. Είναι η κεντρική πηγή όχι μόνο της αγροτικής παραγωγής αλλά και της διατήρησης των περισσότερων μορφών ζωής όπως οι μικροοργανισμοί. Οι λειτουργίες της εδαφικής μικροχλωρίδας είναι πολύ σημαντικές για την αποδόμηση συστατικών και την ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων. Το έδαφος θεωρείται αποθήκη του μικροβιακού πληθυσμού αν και ο χώρος που καταλαμβάνουν οι μικροοργανισμοί είναι μόλις το 5% του συνολικού εδαφικού όγκου. Σημαντικό ρόλο στη σχέση μικροβίων-φυτών διαδραματίζει η ζώνη που περικλείει τις ρίζες των φυτών η οποία αποτελεί ένα από τα πιο ποικίλα περιβάλλοντα στον πλανήτη με κεντρική σημασία στις λειτουργίες του οικοσυστήματος και ονομάζεται ριζόσφαιρα (Tilak *et al*., 2005).

Η ριζόσφαιρα των φυτών αποτελεί ένα σύνθετο και ενδιαφέρον μικροπεριβάλλον λόγω της ταυτόχρονης συνύπαρξης του εδαφικού υποστρώματος, πλήθους μικροοργανισμών -παθογόνων και μη- και των διαθέσιμων θρεπτικών στοιχείων. Αποτελεί ένα δυναμικό σύστημα του οποίου η σύσταση είναι σε άμεση αλληλεξάρτηση με τη δραστηριότητα του ριζικού συστήματος οπότε διαμορφώνεται ανάλογα. Ένας από τους παράγοντες που διαμορφώνουν τη ριζόσφαιρα είναι το σύνολο των μικροοργανισμών οι οποίοι αναπτύσσονται μέσω παροχής θρεπτικών συστατικών από το ριζικό σύστημα των φυτών. Απ’ την άλλη πλευρά, οι αποικούντες μικροοργανισμοί επηρεάζουν την ανάπτυξη, τη θρέψη και την υγεία του φυτού και της ρίζας (Mantelin & Touraine, 2004). Η ποικιλότητα και η δομή της μικροκοινωνίας της ριζόσφαιρας επηρεάζεται τόσο από το είδος του φυτού όσο και από τον τύπο του εδάφους (Tilak *et al*., 2005). 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). Το πιο σημαντικό φαινόμενο που επηρεάζει θετικά τη σχέση φυτών-μικροχλωρίδας είναι η βιολογική δέσμευση αζώτου.

Α.2 Βιολογική δέσμευση αζώτου

Το άζωτο είναι ένα από τα πιο απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία που χρειάζεται το φυτό προκειμένου να αναπτυχθεί. Αποτελεί βασική μονάδα πολλών χημικών συστατικών όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα, μόρια τα οποία βρίσκονται στη βάση όλων των μορφών ζωής (Hubbell & Kidder, 2003). Η τροφοπενία αζώτου είναι η πιο συχνή τροφοπενία φυτών και ευθύνεται για μειωμένες γεωργικές αποδόσεις ανά τον κόσμο. Το μοριακό άζωτο (N_2) αποτελεί τα τέσσερα πέμπτα της ατμόσφαιρας αλλά δεν είναι δυνατή η αφομοίωσή του απευθείας από τα φυτά και τα ζώα σε αυτήν τη μορφή (Saikia & Jain, 2007). Πριν την ενσωμάτωσή του σε ένα ζωντανό σύστημα πρέπει πρώτα να υποστεί αναγωγή. Η διαδικασία αναγωγής του μοριακού αζώτου όταν πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς αναφέρεται ως βιολογική δέσμευση αζώτου ενώ όταν πραγματοποιείται μη βιολογικά λέγεται χημική δέσμευση αζώτου.

Α.2.1 Ιστορική αναδρομή

Η πρώτη αναφορά για απορρόφηση αέριου αζώτου από φυτά έγινε μόλις τον 18^{ο} αιώνα (1771). Για παραπάνω από έναν αιώνα, η άποψη αυτή συχνά αμφισβητήθηκε ενώ υπήρξαν και ορισμένες αναφορές που την υιοθέτησαν. Το 1886 οι Γερμανοί Hellriegel και Wilfarth αναφέρουν ότι ψυχανθή τα οποία φέρουν φυμάτια μπορούν να χρησιμοποιήσουν το άζωτο της ατμόσφαιρας (μοριακό άζωτο) και ως εκ τούτου θεωρούνται ως αυτοί που ανακάλυψαν τη βιολογική δέσμευση αζώτου. Μόλις δύο χρόνια μετά (1888), ο Ολλανδός Beijerinck κατόρθωσε να απομονώσει ένα στέλεχος από φυμάτιο ψυχανθούς το οποίο ονόμασε *Bacillus radicicola* που μετονομάστηκε σε *Bacterium radicicola* και εν τέλει το 1890 πήρε την ονομασία *Rhizobium leguminosarum*, ονομασία που διατηρεί ώς σήμερα, από τον Frank. Λίγα χρόνια πιο μετά (1893), ο Winogradsky απομόνωσε το πρώτο αναερόβιο βακτήριο που δέσμευε άζωτο, το *Clostridium pastorianum* (πλέον γνωστό ως *C. pasteurianum*). Ακολούθησε το 1901 (Beijerinck) και το 1903 (Lipman) η απομόνωση του *Azotobacter* spp. ενώ τον 19^{ο} αιώνα απομονώθηκαν οι κυανοπράσινες άλγες (αργότερα μετονομάστηκαν κυανοβακτήρια) για τις οποίες όμως οι αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα επιβεβαιώθηκε λίγες δεκαετίες πιο μετά. Μέχρι τα τέλη του 19^{ου} αιώνα, η άποψη ότι η ριζόσφαιρα των φυτών ευνοεί τον πολλαπλασιασμό μικροοργανισμών είχε γίνει ευρέως αποδεκτή (Elmerich, 2007, Franche *et al*., 2008).

Λόγω περιορισμένων δυνατοτήτων στις μεθόδους απόδειξης της αζωτοδέσμευσης και των μη κατάλληλων εργαλείων ταξινόμησης, μέχρι το 1969, αναφέρονταν μόλις δώδεκα γένη αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων όπως τα *Aerobacter* (*Klebsiella*), *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Derxia*, *Spirillum* και ορισμένα φωτοσυνθετικά βακτήρια και κυανοβακτήρια. Στην πραγματικότητα, για περισσότερα από πενήντα χρόνια από την ανακάλυψή τους τα *Azotobacter* και *Clostridium* θεωρούνταν τα μοναδικά γένη βακτηρίων ελεύθερης διαβίωσης που είχαν την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν και το γένος *Nostoc* ως η

μοναδική αζωτοδεσμευτική άλγη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στο *Spirillum* μόλις τις τελευταίες δεκαετίες έχει δοθεί η δέουσα σημασία. Συγκεκριμένα, το 1963 ο Becking απομόνωσε έναν μικροοργανισμό με ομοιότητες με το *Spirillum lipoferum* ο οποίος ξεκάθαρα δέσμευε άζωτο. Τελικά, έπειτα από την ανακάλυψη της συσχέτισης τέτοιου τύπου βακτηρίων και της ρίζας, το επιστημονικό ενδιαφέρον αναζωπυρώθηκε και οδήγησε σε εκτεταμένες ταξινομικές μελέτες. Έτσι, στα μέσα της δεκαετίας του ’70, από την εκτεταμένη έρευνα της Johanna Döbereiner θεωρείται ότι έγινε η αποκαλούμενη ‘ανακάλυψη εκ νέου’ (‘rediscovery’) του *Spirillum*, το οποίο μετονομάστηκε αργότερα σε *Azospirillum*. Η μετονομασία πραγματοποιήθηκε από τη δημοσίευση των Tarrand *et al*. (1978) στην οποία συμμετείχε και η Döbereiner, μέσα από την έρευνα της οποίας σήμερα το γένος *Azospirillum* είναι το πιο μελετημένο μεταξύ των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ελεύθερης διαβίωσης (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000, Hartmann & Baldani, 2006). Μέσα από όλα τα παραπάνω ερευνητικά επιτεύγματα έγινε με τον καιρό κατανοητή η σημασία της βιολογικής δέσμευσης αζώτου για τα φυτά και έμμεσα για την αγροτική παραγωγή και τον άνθρωπο.

Α.2.2 Σημασία βιολογικής δέσμευσης αζώτου

Το άζωτο, ως ένα από τα βασικά στοιχεία διατροφής, προέρχεται κυρίως από τις ζωικές και φυτικές πρωτεΐνες. Η πηγή των ατόμων αζώτου βιολογικής προέλευσης σε αυτές τις πρωτεΐνες είναι η βιολογική δέσμευση αζώτου. Αν και μεγάλο μέρος του αζώτου που χρησιμοποιείται στη διατροφή του ανθρώπου προέρχεται από αμμωνία δεσμευμένη από τις βιομηχανίες λιπασμάτων, περίπου οι μισοί από τους 23 εκατομμύρια μετρικούς τόνους αζώτου που χρησιμοποιούνται σε ανθρώπινες τροφές (σιτηρά, ζώα) προέρχονται από βιολογική δέσμευση μέσω βακτηρίων (Halbleib & Ludden, 2000). Η καλλιεργούμενη έκταση σιτηρών ανά τον κόσμο, σε σχέση με αυτήν των ψυχανθών, έχει μεγάλη διαφορά με τα σιτηρά να καταλαμβάνουν το 50% των καλλιεργούμενων εκτάσεων στον πλανήτη ενώ τα ψυχανθή μόλις το 10%. Η δέσμευση αζώτου στα σιτηρά είναι σχεδόν αμελητέα σε σχέση με αυτή των ψυχανθών τα οποία μέσω των φυματίων δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις πολύ πιο αποδοτικές. Ωστόσο, λόγω της ραγδαίως αυξανόμενης ανάγκης για αποδοτικές καλλιέργειες σιτηρών αποκτά ενδιαφέρον η διερεύνηση αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ελεύθερης διαβίωσης τα οποία μπορούν να προσφέρουν σημαντικά ποσά αζώτου σε αυτές τις καλλιέργειες (Franche *et al*., 2008).

Η βιολογική δέσμευση αζώτου είναι η βασικότερη διαδικασία μέσω της οποίας ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2) μετατρέπεται σε αφομοιώσιμες μορφές για τα φυτά και τα ζώα και συνεισφέρει 100-290 Tg N ανά έτος στη βιόσφαιρα (Hsu & Buckley, 2009). Προσφέρει τα μεγαλύτερα ποσά αφομοιώσιμων μορφών αζώτου και εκτιμάται ότι έχει διπλάσια συνεισφορά, παγκοσμίως, από το ποσό που δεσμεύεται μη βιολογικά, όπως φαίνεται και από τον παρακάτω πίνακα (Deacon, 2000).

Τύπος δέσμευσης	**Ποσό δεσμευόμενου N_2 (10^{12} g ανά έτος, ή 10^6 μετρικοί τόνοι ανά έτος)**
Μη- βιολογική	
Βιομηχανική	περίπου 50
Καύση	περίπου 20
Ηλεκτρικές εκκενώσεις	περίπου 10
Σύνολο	**περίπου 80**
Βιολογική	
Γεωργική γη	περίπου 90
Δάση και μη γεωργική γη	περίπου 50
Θάλασσα	περίπου 35
Σύνολο	**περίπου 175**
Bezdicek & Kennedy, 1998	

Πίν. Α.1 Δεσμευόμενα ποσά N_2 ανά έτος από βιολογική και μη βιολογικά δέσμευση.

Από τα ποσά της βιολογικής δέσμευσης την μεγαλύτερη συνεισφορά παρουσιάζει η δέσμευση αζώτου μέσω της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών ριζοβίων η οποία ανέρχεται σε μερικές εκατοντάδες Kg N/εκτάριο/έτος σε εντατικές καλλιέργειες (Lindemann & Glover, 2003). Στην περίπτωση των αζωτοδεσμευτικών οργανισμών ελεύθερης διαβίωσης και μη ψυχανθών φυτών η ίδια τιμή κυμαίνεται από 0-60Kg αζώτου/εκτάριο/έτος διότι επηρεάζεται περισσότερο από διάφορους παράγοντες όπως η εδαφική υγρασία, το pH, η διαθεσιμότητα οξυγόνου και αζώτου κ.ά. (Hsu & Buckley, 2009). Παρά τη μεγάλη διαφορά στην απόδοση αζωτοδέσμευσης, οι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί που διαβιούν σε ρίζες μη ψυχανθών αποκτούν ιδιαίτερη οικολογική σημασία αν συνυπολογιστεί το γεγονός ότι τα φυτά αυτά καταλαμβάνουν πενταπλάσια καλλιεργούμενη έκταση από αυτήν των ψυχανθών σε όλο τον πλανήτη.

Μη ψυχανθή όπως το ρύζι, το καλαμπόκι και το σιτάρι, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια Poaceae (Graminae), αποτελούν βασική διατροφική ανάγκη για περίπου 6,5 δισεκατομμύρια ανθρώπους σε όλον τον πλανήτη. Η εκθετική αύξηση του πληθυσμού καταδεικνύει την ανάγκη για αύξηση της παγκόσμιας αγροτικής παραγωγής. Σύμφωνα με τον οργανισμό τροφίμων και γεωργίας (FAO) των Ηνωμένων Εθνών, η παγκόσμια παραγωγή σιτηρών εκτιμάται ότι το 2008 θα έφτανε τους 2.164 εκατομμύρια τόνους παρουσιάζοντας αύξηση 2,6%. Η αύξηση αυτή της παραγωγής είναι αποτέλεσμα της ανεξέλεγκτης χρήσης χημικών λιπασμάτων (N, P, K) σε συνδυασμό με τις προηγμένες τεχνολογίες που εφαρμόζονται στις καλλιέργειες. Η αζωτούχος λίπανση σε μη ψυχανθή

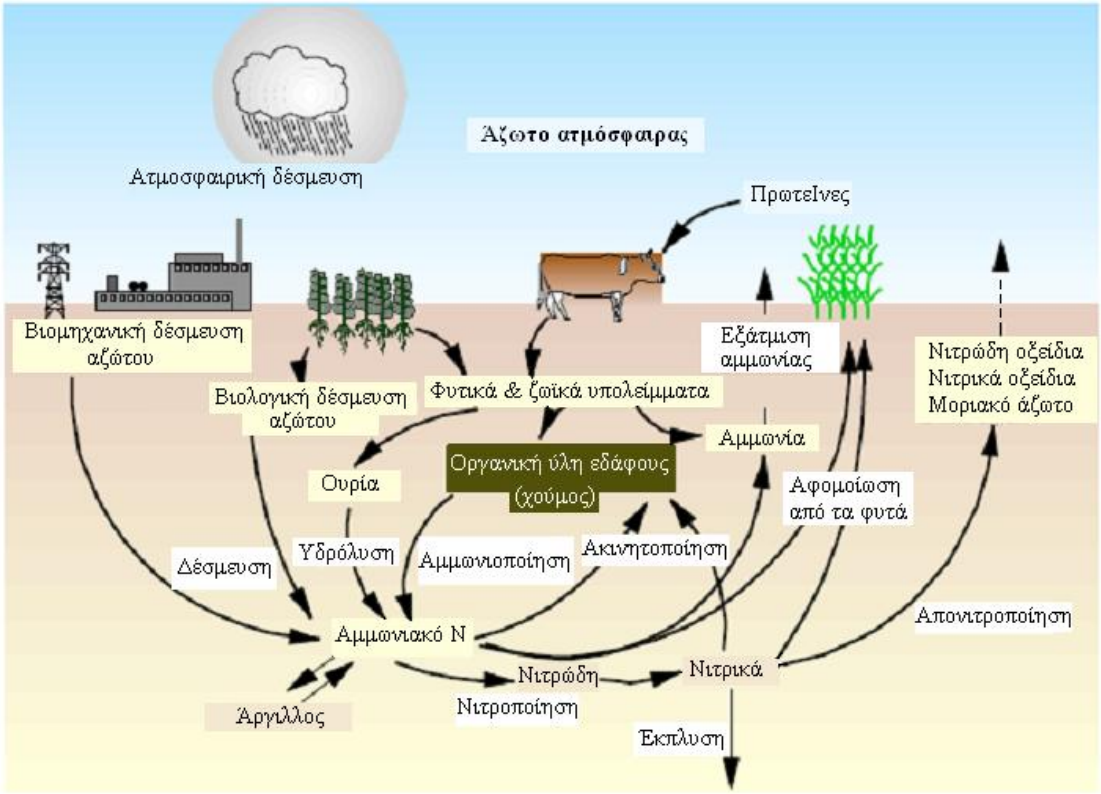
είναι από τις πλέον δαπανηρές επενδύσεις στον κλάδο της γεωργίας. Ωστόσο, το 65% του εφαρμοζόμενου αζώτου διαφεύγει από το σύστημα φυτό-έδαφος λόγω αέριων απωλειών, έκπλυσης από βροχοπτώσεις, διάβρωσης εδαφών και απόπλυσης (Bhattacharjee & Singh, 2008). Η απώλειες αυτές οδηγούν σε οικονομικές απώλειες 3 δισεκατομμυρίων δολαρίων ανά έτος. Εκτός από τις οικονομικές ζημιές υπάρχει και η οικολογική διάσταση. Συνέπειες από τη αλόγιστη χρήση αζωτούχων λιπασμάτων αφορούν: α) εμφάνιση καρκίνου λόγω δευτεροταγών αμινών, β) μεθεμογλοβιναιμία (metheamoglobinemia) βρεφών λόγω παρουσίας νιτρικών και νιτρωδών στην τροφή και το νερό, γ) μόλυνση του οικοσυστήματος με νιτρικό οξύ προερχόμενο από βροχοπτώσεις, δ) ευτροφισμό λιμνών, ε) τοξικότητα φυτών από περίσσεια νιτρωδών και αμμωνιακών κ.ά. (Saikia & Jain, 2007). Με την ανησυχία για το περιβάλλον και την παγκόσμια οικονομία να αυξάνεται, το βλέμμα πλέον στρέφεται σε εναλλακτικές και περισσότερο φιλικές για το περιβάλλον λύσεις (Bhattacharjee & Singh, 2008). Επομένως, η οικολογική σημασία των αζωτοδεσμευτικών οργανισμών ελεύθερης διαβίωσης για την γεωργική πρακτική έχει κυρίαρχο ρόλο στο πεδίο των μη ψυχανθών φυτών.

Η βιολογική δέσμευση αζώτου είναι συνώνυμη με τη βιωσιμότητα. Πρόοδοι στη γεωργική βιωσιμότητα απαιτούν αύξηση στην αξιοποίηση της αζωτοδέσμευσης ως την κύρια πηγή αζώτου για τα φυτά. Μακροπρόθεσμα σχέδια στήριξης της βιωσιμότητας των γεωργικών συστημάτων πρέπει να στηρίζονται στη χρήση και στην παραγωγική διαχείριση ενδογενών πηγών. Η βιολογική δέσμευση αζώτου προσφέρει οικονομικά και οικολογικά μέσα για τη μείωση της εισροής αζωτούχων λιπασμάτων και τη βελτίωση της ποιότητας και της ποσότητας ενδογενών πηγών. Σαφώς, δε φαίνεται ρεαλιστικό να εξετάζει κάποιος το μέλλον και τη βιωσιμότητα της γεωργίας χωρίς τις διαδικασίες της αζωτοδέσμευσης και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τη συνεισφορά της στην αγροτική παραγωγή (Saikia & Jain, 2007).

Α.2.3 Μηχανισμός βιολογικής δέσμευσης αζώτου

Το άζωτο της ατμόσφαιρας είναι ένα μόριο το οποίο αποτελείται από δύο άτομα αζώτου ενωμένα με ισχυρό τριπλό δεσμό. Απαιτούνται μεγάλα ποσά ενέργειας για να σπάσει αυτός ο δεσμός και γι’ αυτόν τον λόγο το μόριο θεωρείται αδρανές. Η γενική χημική αντίδραση αναγωγής του αζώτου ($N_2 + 3H_2 +$ Ενέργεια -> $2NH_3$) είναι η ίδια είτε πρόκειται για χημική είτε για βιολογική δέσμευση αζώτου. Οι ζωντανοί οργανισμοί χρησιμοποιούν ενέργεια η οποία προέρχεται από την οξείδωση (‘καύση’) υδατανθράκων προκειμένου να αναγάγουν το μοριακό άζωτο (N_2) σε αμμωνία (NH_3). Αντίθετα, η χημική διαδικασία περιλαμβάνει ενέργεια προερχόμενη από φυσικά καύσιμα προκειμένου να διασφαλιστούν τα απαραίτητα ηλεκτρόνια και υδρογόνα (Hubbell & Kidder, 2003).

Οι μηχανισμοί που περιλαμβάνουν τις μετατροπές του αζώτου σε αφομοιώσιμες μορφές ανήκουν σε έναν ευρύτερο κύκλο μηχανισμών, γνωστό ως κύκλο του αζώτου. Θεωρούμε ότι ο κύκλος ξεκινάει με τη δέσμευση του μοριακού αζώτου της ατμόσφαιρας από μικροοργανισμούς (συμβιωτικούς και μη) και αναγωγή του σε αμμωνιακό ιόν καθώς επίσης και από την οξείδωσή του σε νιτρικά ιόντα από ηλεκτρικές εκκενώσεις. Όπως φαίνεται και από την Εικόνα Α.1**,** οι διάφορες μορφές του αζώτου υφίστανται συνεχή ανακύκλωση σε ένα σύστημα στο οποίο λαμβάνει μέρος κυρίως η φύση αλλά και ο άνθρωπος (Διαμαντίδης, 1994).



Εικ. Α.1 Ο κύκλος του αζώτου. Μολονότι η ατμόσφαιρα είναι πλούσια σε άζωτο, οι περισσότεροι οργανισμοί προμηθεύονται το άζωτο από το περιβάλλον τους με μορφές προσιτές σε αυτούς, όπως το νιτρικό ιόν, το αμμωνιακό ιόν ή περισσότερο πολύπλοκες αζωτούχες ουσίες, όπως τα αμινοξέα. Έτσι οι διάφορες μορφές αζώτου υφίστανται μια διαρκή ανακύκλωση στη βιόσφαιρα (Διαμαντίδης, 1994, Stevenson, 1982).

Η ενζυματική μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αμμωνία καταλύεται από το ένζυμο νιτρογενάση. Η νιτρογενάση είναι ένα ενζυμικό σύμπλοκο ασταθές παρουσία οξυγόνου και τα γονίδια που την εκφράζουν είναι πολύ συντηρημένα μεταξύ συμβιωτικών και ελεύθερης διαβίωσης αζωτοδεσμευτικών οργανισμών (Franche *et al.*, 2008). 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 αλλά παράλληλα καταλύει και την αντίδραση αναγωγής των πρωτονίων, οπότε παράγεται υδρογόνο (Διαμαντίδης, 1994). Η πιο κοινή μορφή νιτρογενάσης είναι η Mo-νιτρογενάση ή τυπική νιτρογενάση, η οποία περιέχει μια ομάδα μολυβδαινίου (FeMo-co). Ορισμένα βακτήρια, όπως το *Azotobacter*, και αρκετά φωτοσυνθετικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (μεταξύ αυτών τα κυανοβακτήρια) φέρουν επιπρόσθετες μορφές νιτρογενάσης οι οποίες περιέχουν βανάδιο (Vnf) ή σίδηρο (Anf) (Franche *et al*., 2008). Αυτές οι επιπρόσθετες μορφές νιτρογενάσης ονομάζονται εναλλακτικές νιτρογενάσες και σε όλες τις περιπτώσεις που είναι παρούσες αποτελούν δευτερεύοντα συστήματα. Οι εναλλακτικές νιτρογενάσες εκφράζονται μόνο όταν οι συγκεντρώσεις μολυβδαινίου είναι περιορισμένες και εφόσον φυσικά διατίθενται από τον οργανισμό, με τη νιτρογενάση βαναδίου να παράγεται περισσότερο σε σχέση με τη νιτρογενάση σιδήρου όταν τα στοιχεία βανάδιο και σίδηρος είναι και τα δύο παρόντα. Η τυπική νιτρογενάση (FeMo νιτρογενάση) έχει βρεθεί ότι είναι πιο εξειδικευμένη και ικανή στο να δεσμεύει και να ανάγει άζωτο σε αμμωνία σε σχέση με τις εναλλακτικές (με τη σειρά Nif>Vnf>Anf). Οι εναλλακτικές νιτρογενάσες μπορεί να προέρχονται από την τυπική νιτρογενάση, όμως ενδέχεται να αποτελούν και αρχέγονες νιτρογενάσες οι οποίες έχουν συντηρηθεί σε ορισμένους προκαρυωτικούς οργανισμούς (Raymond *et al*., 2004).

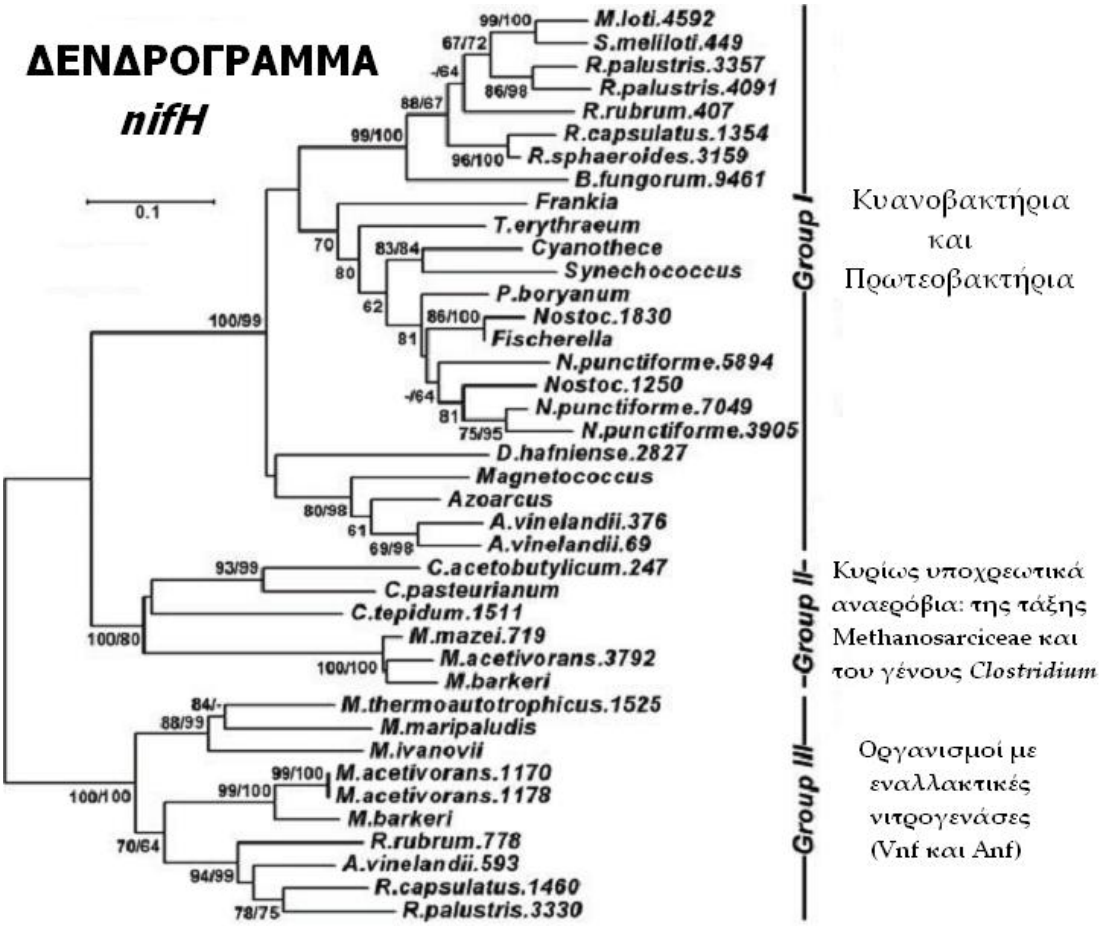
Το σύμπλοκο της νιτρογενάσης αποτελείται από δύο μεταλλοπρωτεΐνες των οποίων οι αλληλουχίες είναι πολύ συντηρημένες μεταξύ των αζωτοδεσμευτικών οργανισμών (Poly *et al*., 2001). Η πρώτη, η οποία ονομάζεται και μολυβδαινο-φερρεδοξίνη (Fe-Mo-πρωτεΐνη ή δινιτρογενάση), είναι ένα τετραμερές μεγέθους 220.000 Da η οποία συνίσταται από δύο ετεροδιμερή, $\alpha_2\beta_2$ και αποτελεί προϊόν των γονιδίων *nifD* και *nifK* (όπου α=NifD και β=NifK πρωτεΐνες) (Franche *et al*., 2008, Raymond *et al*., 2004, Διαμαντίδης, 1994). Κάθε FeMo πρωτεΐνη περιέχει δύο ζεύγη μεταλλομάδων ξεχωριστών για την κάθε μία: δύο ομάδες FeMo-co και δύο $[Fe_8S_7]$ ομάδες (P ομάδες). Η FeMo-co περιστοιχίζεται πλήρως από τις τρεις περιοχές της α υπομονάδας και θεωρείται ως υπόστρωμα της αναγωγής του N_2. Η δεύτερη μεταλλοπρωτεΐνη, η οποία ονομάζεται και αζωφερρεδοξίνη (Fe-πρωτεΐνη ή αναγωγάση της δινιτρογενάσης), είναι υποχρεωτικός δότης ηλεκτρονίων στην πρωτεΐνη FeMo. Είναι προϊόν του γονιδίου *nifH* και αποτελεί διμερές μεγέθους 68.000 Da το οποίο αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες. Μια μόνο ομάδα $[Fe_4S_4]$ είναι συμμετρικά τοποθετημένη μεταξύ των υπομονάδων στα κατάλοιπα Cys97 και Cys132 από την κάθε υπομονάδα. Αυτή η ομάδα σχετίζεται άμεσα με την μεταφορά ηλεκτρονίων στην FeMo πρωτεΐνη διότι αποτελεί το οξειδοαναγωγικό κέντρο. Η ομάδα $[Fe_4S_4]$ της αζωφερρεδοξίνης εναλλάσσεται μεταξύ της ανηγμένης και της οξειδωμένης κατάστασης κατά τη διάρκεια της μεταφοράς ηλεκτρονίων στη FeMo πρωτεΐνη (Halbleib & Ludden, 2000). Τα υπεύθυνα γονίδια σύνθεσης της νιτρογενάσης και όλων των απαραίτητων μηχανισμών

αζωτοδέσμευσης, τα οποία εντοπίζονται στο ίδιο οπερόνιο, το *nifHDK*, ονομάζονται *nif* γονίδια (**ni**trogen **f**ixation γονίδια) (Διαμαντίδης, 1994).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα *nif* γονίδια εντοπίζονται σε ένα ή περισσότερα μεγάλα σε μέγεθος και συν-μεταγραφόμενα οπερόνια ή ρεγουλόνια που εκφράζουν όχι μόνο τις υπομονάδες της νιτρογενάσης αλλά και ένα σύνολο πρωτεϊνών σχετικών με τη ρύθμιση της βιοσύνθεσης, τη μεταφορά μετάλλων κ.ά. (Raymond *et al*., 2004). Η μοριακή ανάλυση της αζωτοδέσμευσης πραγματοποιήθηκε, αρχικά, στο βακτήριο *Klebsiella oxytoca* στέλεχος M5a1 (πρωτύτερα γνωστή ως *K. pneumoniae*). Σε αυτό το στέλεχος τα γονίδια *nif* τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνθεση της νιτρογενάσης είναι ομαδοποιημένα σε μια περιοχή 24 kb και αποτελεί την πιο συμπαγή οργάνωση *nif* γονιδίων που έχει περιγραφεί ώς τώρα. Τα τρία βασικά γονίδια *nifD, nifK* και *nifH* δεν είναι τα μοναδικά που απαιτούνται για την πλήρη και λειτουργική σύνθεση της νιτρογενάσης. Τα γονίδια που απαιτούνται για τη σύνθεση της FeMo-co πρωτεΐνης είναι τα *nifB, nifQ, nifE, nifN, nifX, nifU, nifS, nifV, nifY* και *nifH*. Για τις ομάδες θείου-σιδήρου περιλαμβάνονται τα *nifS* και *nifU* ενώ για την ωρίμανση των στοιχείων της νιτρογενάσης τα γονίδια *nifW* και *nifZ*. Είναι πλέον διαπιστωμένο ότι ο πυρήνας γονιδίων (*nifH, nifD nifK, nifY, nifB,nifQ, nifE, nifN, nifX, nifU, nifS, nifV, nifW, nifZ*) που απαιτείται για τη σύνθεση και την κατάλυση της νιτρογενάσης είναι συντηρημένος σε όλους τους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς (Franche *et al*., 2008). Οι πρωτεΐνες NifE και NifN έχουν σημαντικές ομοιότητες με τις NifD και NifK αντίστοιχα και πιθανώς να προέρχονται από αρχέγονο διπλασιασμό του οπερονίου NifDK. Οι NifD και NifK θεωρείται ότι έχουν σταθεροποιητικό ρόλο κατά τον σχηματισμό των FeMo-co και FeV-co. Το γονίδιο *nifH* φαίνεται να είναι το πιο συντηρημένο σε σχέση με τα άλλα τέσσερα (με τη σειρά H>D>K>E>N) (Raymond *et al*., 2004). Η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων *nif* στο *K. oxytoca* αλλά και στα περισσότερα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια πραγματοποιείται από την πρωτεΐνη NifA (παραγόμενη από το γονίδιο *nifA*). Το *nifA* μεταγράφεται μαζί με το γονίδιο *nifL* το οποίο κωδικοποιεί για μια οξειδοαναγωγική και αζωτοεξαρτώμενη ρυθμιστική φλαβοπρωτεΐνη (NifL). Η NifL ενεργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της NifA προσθέτοντας έτσι άλλο ένα επίπεδο ρύθμισης σε σχέση με το οξυγόνο και το άζωτο. Η οξειδωμένη NifL είναι επίσης ευαίσθητη στην παρουσία νουκλεοτιδίων in vitro και παρουσιάζει αυξημένη αναστολή, ειδικά, παρουσία ADP (Halbleib & Ludden, 2000). Η ρύθμιση της έκφρασης των *nif* γονιδίων είναι αρκετά περίπλοκη και συνδέεται άμεσα με την αφομοίωση αμμωνίας και τον μεταβολισμό του αζώτου.

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

των γονιδίων *nif* εντοπίζονται σε πλήθος προκαρυωτικών οργανισμών, ακόμα και σε πλασμίδια, υποδεικνύοντας ότι έχουν ένα κοινό πρόγονο ο οποίος κάποια στιγμή απέκτησε αυτό το πλεονέκτημα. Όπως προαναφέρθηκε, το γονίδιο *nifH* είναι το πιο συντηρημένο μεταξύ βακτηρίων και αρχαίων όπως φαίνεται και από το παρακάτω δενδρόγραμμα (Εικ. Α.2) (Raymond *et al*., 2004).

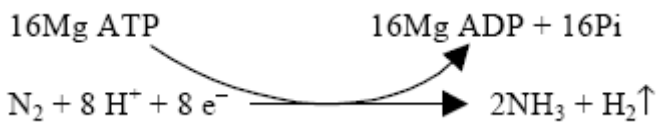


Εικ. Α.2 Φυλογενετικό δέντρο *nifH*
Στους οργανισμούς που είναι διαθέσιμο το γονιδίωμα, το νούμερο μετά το όνομα του είδους αναφέρεται στη σχετική θέση του ανοικτού αναγνωστικού πλαισίου της πρωτεΐνης εντός του γονιδιώματος. (δεν περιλαμβάνονται τα *R. capsulatus* και *R. palustris*). Τα νούμερα στους κόμβους του δενδρογράμματος δείχνουν την τιμή bootstrap support βασισμένη σε 100 αντίγραφα της μεθόδου μέγιστης πιθανοφάνειας (πρώτο νούμερο) ή βασισμένη σε 500 αντίγραφα της μεθόδου απόστασης. Η παύλα (-) σε έναν κόμβο υποδεικνύει χαμηλή τιμή bootstrap support (<60%) για το συγκεκριμένο πρότυπο διακλάδωσης είτε για το δέντρο μέγιστης πιθανοφάνειας (Μ.Π.) είτε για το δέντρο από τη μέθοδο της γενετικής απόστασης (αν και παρατηρείται ίδια τοπολογία). Μεμονωμένο νούμερο ή απουσία νούμερου δείχνει την ασυμφωνία στην τοπολογία του κόμβου μεταξύ δέντρου Μ.Π. και δέντρου από τη μέθοδο της γενετικής απόστασης. Το μεμονωμνένο νούμερο δείχνει την τιμή bootstrap support από δέντρο της μεθόδου απόστασης αν είναι ίση ή μεγαλύτερη από 60%. Η κλίμακα στην εικόνα αντιστοιχεί στον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση για τους κλάδους στο δέντρο της μεθόδου απόστασης (προσαρμοσμένο από Raymond *et al*., 2004).

Α.2.4 Ενεργειακό κόστος

Η αναγωγή του αζώτου απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας είτε πραγματοποιείται χημικά είτε βιολογικά. Για την παραγωγή λιπασμάτων καταναλώνονται τεράστια ποσά φυσικών καυσίμων ως πηγή ενέργειας. Οι ύλες αυτές είναι αναντικατάστατες και εν τέλει εξαντλήσιμες. Κατά τη βιολογική δέσμευση αζώτου η απαιτούμενη ενέργεια προμηθεύεται από την οξείδωση υδατανθράκων οι οποίοι έχουν συντεθεί μέσω φωτοσυνθετικής δραστηριότητας από τα φυτά. Ως φυσικό επακόλουθο, η ενέργεια που απαιτείται για βιολογική δέσμευση αζώτου προέρχεται άμεσα από την ηλιακή ενέργεια η οποία δεν έχει οικονομικό κόστος, είναι οικολογικής φύσης και ανεξάντλητη ενώ, ταυτόχρονα, είναι διαθέσιμη σε όλα τα μέρη όπου οι συνθήκες επιτρέπουν την ανάπτυξη φωτοσυνθετικών οργανισμών (Hubbell & Kidder, 2003).

Η διαδικασία της βιολογικής δέσμευσης αζώτου αποτελεί μία από τις πιο απαιτητικές σε ενέργεια μεταβολικές διαδικασίες στη βιολογία. Η ικανότητα των αζωτοδεσμευτικών οργανισμών να δεσμεύουν άζωτο στηρίζεται αποκλειστικά στο σύστημα της νιτρογενάσης κατά το οποίο υδρολύονται 16 μόρια ATP για κάθε μόριο αζώτου (N_2) (Raymond *et al.*, 2004).



Η αντίδραση αυτή σε σχέση με την αντίδραση αφομοίωσης αζώτου είναι περισσότερο ενεργοβόρος σε βιολογικά ισοδύναμα ενέργειας και απαιτεί μεγαλύτερη αναγωγική δύναμη και περισσότερα ATP. Η υποχρεωτική αναγωγή πρωτονίων συμβαίνει κατά την κατάλυση της νιτρογενάσης κατά την οποία παράγεται τουλάχιστον 1 mol H_2 για κάθε N_2 που ανάγεται. Η αναλογία ηλεκτρονίων που διατίθεται για αναγωγή αυξάνεται υπό συνθήκες μειωμένης ροής ηλεκτρονίων μέσω περαιτέρω αύξησης της κατανάλωσης MgATP (Halbleib & Ludden, 2000).

Όλοι οι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί, συμβιωτικοί και μη, εκμεταλλεύονται τις εκκρίσεις των ριζών των φυτών προκειμένου να εξασφαλίσουν πηγές άνθρακα και ενέργειας. Εξαίρεση αποτελούν οι φωτοσυνθετικοί αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί οι οποίοι εξασφαλίζουν την απαιτούμενη ενέργεια απευθείας από την ηλιακή ακτινοβολία (Saikia & Jain, 2007). Τα συμβιωτικά βακτήρια εντός των φυματίων λαμβάνουν εξειδικευμένες μορφές και αποκτούν το όνομα βακτηριοειδή. Μέσα στα φυμάτια η απαιτούμενη ενέργεια για την αναγωγή του αζώτου προέρχεται άμεσα από τη φωτοσύνθεση των φυτών. Στα φυμάτια μεταφέρεται σακχαρόζη η οποία διασπάται από διακαρβοξυλικά οξέα σε C και ενέργεια που χρειάζεται το βακτηριοειδές και σε αντάλλαγμα το ριζόβιο παρέχει στο φυτό αμμωνιακά ιόντα (Franche *et al.*, 2008). Όμως, για τους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς ελεύθερης διαβίωσης, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αναγωγή του αζώτου, υπάρχουν

περιοριστικοί παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα άνθρακα και ενέργειας. Αυτό συμβαίνει διότι: α) οι εκκρίσεις της ρίζας προσφέρουν μεν πηγές άνθρακα αλλά όχι σε μεγάλα ποσά, β) οι συνθήκες μπορεί να μην είναι ιδανικές όπως σε ένα φυμάτιο και γ) δημιουργείται ανταγωνισμός μεταξύ των οργανισμών της ριζόσφαιρας. Οι περιορισμοί αυτοί μπορεί να αντισταθμιστούν με τη μετακίνηση ενός οργανισμού πιο κοντά στη ριζόσφαιρα ή στο ριζοπλάνο (επιφάνεια ρίζας) ή εφόσον έχει την ικανότητα ενδοφυτικού αποικισμού (Tilak *et al*., 2005). Για παράδειγμα, το *Azotobacter chroococcum* το οποίο είναι αερόβιο βακτήριο ριζόσφαιρας ωφελείται από άφθονες ποσότητες ανηγμένων οργανικών ενώσεων. Η δραστηριότητά του σε ορυζώνες μπορεί να αυξηθεί με προσθήκη σανού ρυζιού, λόγω της διάσπασης της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Αντίστοιχα, το αναερόβιο σαπροφυτικό *Clostridium* δεν έχει τις δυνατότητες του *A. chroococcum* και είναι αποδοτικό σε ορυζώνες μόνο με προσθήκη σανού ρυζιού (Kennedy *et al*., 2004). Ο παρακάτω πίνακας (Πίν. Α.2) υποδεικνύει την ποικιλότητα ορισμένων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ως προς το περιβάλλον τους και τις πηγές ενέργειας.

Οργανισμοί	**Συνθήκες Αζωτοδέσμευσης**	**Περιβάλλον**	**Πηγή Ενέργειας**
A. chroococcus	αερόβιο	ριζόσφαιρα	οργανικές ενώσεις εδάφους
Clostridium spp.	αναερόβιο	σαπροφυτικό εδάφους	οργανικές ενώσεις εδάφους
Azospirillum spp.	μικροαερόβιο	ριζόσφαιρα, ορισμένες φορές ενδοφυτικό σε ρίζες, βλαστούς και φύλλα	οργανικές ενώσεις εδάφους, εκκρίσεις ρίζας, φυτικός ιστός
Herbaspirillum seropediacae	μικροαερόβιο	ριζόσφαιρα και ενδοφυτικό	εκκρίσεις ρίζας
Azoarcus spp.	μικροαερόβιο	ενδοφυτικό	εκκρίσεις ρίζας
Burkholderia vietnamensis	-	ριζόσφαιρα, ενδοφυτικό	οργανικές ενώσεις εδάφους και εκκρίσεις ρίζας
Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii*	-	ενδοφυτικό στη ρίζα	εκκρίσεις ρίζας
R. etli bv. *phaseoli*	-	ενδοφυτικό στη ρίζα	εκκρίσεις ρίζας
Azorhizobium caulinodans	μικροαερόβιο	ενδοφυτικό στη ρίζα	εκκρίσεις ρίζας
Gluconacetobacter diazotrophicus	μικροαερόβιο	ενδοφυτικό στη ρίζα, σε φύλλα και βλαστούς	εκκρίσεις ρίζας, φυτικός ιστός

Πίν. Α.2 Ποικιλότητα ορισμένων βακτηρίων ως προς το περιβάλλον αζωτοδέσμευσης και τις πηγές ενέργειας (Kennedy *et al*., 2004).

Α.2.5 Ποικιλότητα συστημάτων βιολογικής δέσμευσης αζώτου

Όλοι οι γνωστοί αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί είναι προκαρυωτικοί και η ικανότητα να δεσμεύουν άζωτο είναι ευρέως διαπιστωμένη τόσο μεταξύ βακτηρίων όσο και αρχαίων. Έχει προταθεί ότι οι αβιοτικές πηγές ανηγμένου αζώτου στην προϊστορική γη προμηθεύονταν μέσω ενδογενούς-αβιοτικής σύνθεσης και ότι η εξωγενής προέλευση ήταν πολύ περιορισμένη. Κάποια στιγμή, οι ποσότητες ανηγμένου αζώτου θα έγιναν ανεπαρκείς για την επέκταση της μικροβιακής βιομάζας προκαλώντας, έτσι, την εξέλιξη της βιολογικής δέσμευσης αζώτου. Τα παραπάνω στηρίζουν την άποψη ότι το φαινόμενο της βιολογικής δέσμευσης αζώτου συνέβη νωρίς κατά την εξέλιξη των προκαρυωτικών οργανισμών μιας και η ικανότητα για αζωτοδέσμευση παρουσιάζεται αποκλειστικά μεταξύ μελών των ευβακτηρίων και των αρχαίων (Raymond *et al*., 2004).

Η βιολογική δέσμευση αζώτου είναι γνωστό ότι επιτελείται σε διάφορους βαθμούς και σε πολλά και ποικίλα περιβάλλοντα όπως το έδαφος, τρεχούμενα και αλατώδη νερά και ιζήματα, εκτός ή εντός ριζών, βλαστών και φύλλων συγκεκριμένων ανώτερων φυτών καθώς και σε πεπτικές οδούς ορισμένων ζώων. Η δυνατότητα για αζωτοδέσμευση απαντά σε κάθε περιβάλλον το οποίο είναι ικανό να υποστηρίξει ανάπτυξη μικροοργανισμών. Τα βιολογικά συστήματα τα οποία είναι ικανά να δεσμεύουν άζωτο ταξινομούνται ιστορικά σε συμβιωτικά και μη συμβιωτικά (Hubbell & Kidder, 2003).

Α.2.5.1 Συμβιωτικοί οργανισμοί

Η πιο μεγάλη συνεισφορά αζώτου στο έδαφος προέρχεται από τη συμβιωτική σχέση ορισμένων οργανισμών και φυτών καθώς από μόνη της η συμβίωση ψυχανθών και αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ευθύνεται για το 20% του δεσμευόμενου αζώτου παγκοσμίως. Τα βακτήρια τα οποία δημιουργούν αμοιβαίες σχέσεις με ψυχανθή ονομάζονται ριζόβια και αποτέλεσμα αυτής της συμβίωσης είναι η δημιουργία φυματίων στις ρίζες των φυτών αυτών και είσοδος σε αυτά των βακτηρίων αλλά με τροποποιημένη μορφή (βακτηριοειδή) (Hubbell & Kidder, 2003). Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια Leguminosae (Fabaceae), της τάξης Fabales και διακρίνονται σε τρεις υποοικογένειες: Caesalpinoidae, Mimosoidae και Papilionidae. Η υποοικογένεια Caesalpinoidae έχει πολύ λίγα taxa στα οποία σχηματίζονται φυμάτια ενώ στην Papilionidae ανήκουν τα περισσότερα σημαντικά καλλιεργούμενα είδη. Στην υποοικογένεια Mimosoidae πρόσφατα δόθηκε προσοχή μιας και τα βακτήρια που απομονώθηκαν από τα φυμάτιά τους ανήκουν στα β-Πρωτεοβακτήρια ενώ οι συμβιούντες οργανισμοί της Papilionidae ανήκουν στα α-Πρωτεοβακτήρια (Franche *et al*., 2008). Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αξιοσημείωτες αλλαγές στην ταξινόμηση των ριζοβίων. Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη ανανέωση της ταξινόμησης και της ονοματολογίας προκαρυωτικών οργανισμών, τα περισσότερα ριζόβια ανήκουν στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων σε μία μόνο τάξη (Rhizobiales) στην οποία ανήκουν 9 γένη ριζοβίων. Η κλάση β-Πρωτεοβακτήρια περιλαμβάνει 2 τάξεις (Burkholderiales και Rhodocyclales) στις

οποίες ανήκουν 4 γένη ριζοβίων. Στη παρακάτω λίστα περιλαμβάνονται γένη βακτηρίων που έχουν τουλάχιστον ένα είδος το οποίο επάγει σχηματισμό φυματίων (Weir, 2008, Euzéby, 1997).

ΚΛΑΣΗ α-Proteobacteria

Τάξη Rhizobiales

- **Οικογένεια :** Rhizobiaceae
  Γένη *:* 1. *Rhizobium*
  2. *Ensifer (Sinorhizobium)*
- **Οικογένεια :** Brucellaceae
  Γένος : 1. *Ochrobactrum*
- **Οικογένεια :** Phyllobacteriaceae
  Γένη : 1. *Phyllobacterium*
  2. *Mesorhizobium*
- **Οικογένεια** : Bradyrizobiaceae
  Γένος : 1. *Bradyrhizobium*
- **Οικογένεια :** Xanthobacteraceae
  Γένος : 1. *Azorhizobium*
- **Οικογένεια :** Methylobacteriaceae
  Γένος : 1. *Methylobacterium*
- **Οικογένεια :** Hyphomicrobiaceae
  Γένος : 1. *Devosia*

ΚΛΑΣΗ β-Proteobacteria

Τάξη Burkholderiales

- **Οικογένεια :** Burkholderiaceae
  Γένη : 1. *Burkholderia*
  2. *Cupriavidus* (πρώην *Wautersia*, πρώην *Ralstonia*)
- **Οικογένεια :** Oxalobacteraceae
  Γένος : 1. *Herbaspirillum*

Τάξη Rhodocyclales

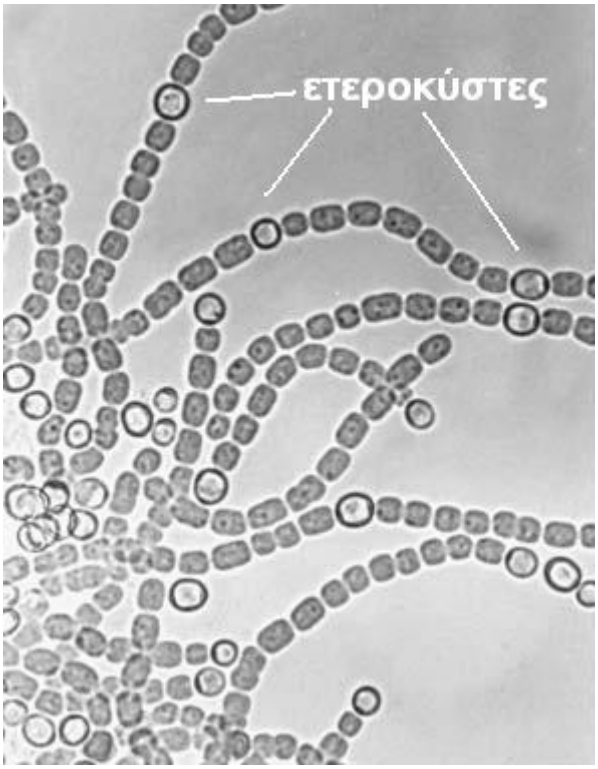
- **Οικογένεια :** Rhodocyclaceae
  Γένος : 1. *Shinella*

Παρόλο που τα περισσότερα στελέχη του *Rhizobium* μπορούν να επάγουν σχηματισμό φυματίων σε περισσότερους από έναν ξενιστές και πολλά διαφορετικά είδη απομονώνονται συχνά από ένα ψυχανθές, οι συμβιούντες οργανισμοί που έχουν μελετηθεί σε βάθος προέρχονται από λίγα ψυχανθή. Μόνο δύο μη ψυχανθή φυτά τα οποία είναι είδη των *Parasponia* spp. και *Trema* spp. σχηματίζουν συμβιωτική σχέση με βακτήρια των γενών *Rhizobium* ή *Bradyrhizobium* (Tilak *et al*., 2005). Σύμφωνα με στοιχεία, φαίνεται ότι τα ριζόβια υπήρχαν στη γη πολύ πριν την εμφάνιση των ψυχανθών (Franche *et al*., 2008). Βάσει μοριακών αναλύσεων ακολουθιών χλωροπλαστών, όλα τα φυτά που παρουσιάζουν το φαινόμενο της συμβίωσης σχηματίζουν έναν μονό κλάδο εντός των αγγειόσπερμων και γι' αυτόν τον λόγο φαίνεται ότι υπάρχει κοινή εξελικτική προέλευση των οικογενειών των φυτών αυτών (Soltis *et al*., 1995). Τέλος, μία άλλη ξεχωριστή συμβίωση αποτελεί η δυνατότητα ενός τροπικού ψυχανθούς, του *Sesbania rostrata*, να σχηματίζει φυμάτια όχι μόνο στις ρίζες αλλά και στον βλαστό του. Αυτή η ικανότητα επιτρέπει στο φυτό αυτό να δεσμεύει άζωτο όταν αναπτύσσεται σε υγρές συνθήκες κατά τις οποίες δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός φυματίων στις ρίζες. Επιπροσθέτως, τα φυμάτια του βλαστού φαίνεται να έχουν την δυνατότητα δέσμευσης αζώτου ακόμη και όταν οι ρίζες απορροφούν νιτρικά από το έδαφος. Το βακτήριο που εμπλέκεται σε αυτή την διαδικασία ανήκει στο γένος *Azorhizobium* (Paul & Clark, 1989).

Ενώ τα περισσότερα ξυλώδη ψυχανθή απαντούν κυρίως σε τροπικές περιοχές μία άλλη περίπτωση συμβίωσης ψυχανθών με βακτήρια, τους ακτινομύκητες, εντοπίζεται σε εύκρατα κλίματα καθώς και σε αρκτικές περιοχές (Vitousek *et al*., 2002). Πρόκειται για τα βακτήρια του γένους *Frankia* τα οποία είναι ινώδους μορφής και αναπτύσσονται ακτινωτά (και σε αυτό το γεγονός οφείλεται και η επονομασία 'ακτινομύκητες', που είναι η ονομασία της οικογένειας που ανήκουν) (Διαμαντίδης, 1994). Τα μέλη του γένους *Frankia* έχουν υψηλό ποσοστό G+C είναι Gram θετικά και ανήκουν στην οικογένεια Frankiaceae της τάξης Actinomycetales (Franche *et al*., 2008). Σχηματίζουν φυμάτια σε ρίζες ξυλωδών φυτών κάποιων ειδών των γενών *Ceanothus, Alnus, Hippophae, Casuarina* κ.ά. μερικά από τα οποία εισβάλλουν εύκολα σε φτωχά εδάφη υπό αντίξοες συνθήκες. Το γεγονός αυτό προσδίδει στα βακτήρια του γένους *Frankia* αυξημένο ενδιαφέρον αν και τα είδη αυτά με τα οποία συμβιώνουν είναι διαδεδομένα στην Ελλάδα κυρίως ως καλλωπιστικά. Εκτάσεις με *Alnus glutinosa* αναφέρονται στο δέλτα του ποταμού Σπερχειού, στα όρη Πάικο και Πήλιο, καθώς και σε άλλες περιοχές (Ευθυμίου *et al*., 2005, Φωτιάδης, 2005, Κοράκης & Αθανασιάδης, 2006). Η συνεισφορά των βακτηρίων αυτών στην αζωτοδέσμευση είναι σημαντική και μπορεί να φτάσει τα 100 kg/ha ανά έτος (Hubbell & Kidder, 2003). Γενικά, τα βακτήρια του γένους *Frankia* σχηματίζουν φυμάτια σε περισσότερα από 280 είδη ξυλωδών φυτών από 8 διαφορετικές οικογένειες. Ωστόσο, οι διαδικασίες που ορίζουν τη συμβιωτική αυτή σχέση δεν είναι πλήρως κατανοητές και παρουσιάζουν σημαντικές

διαφορές σε διάφορα επίπεδα σε σχέση με τα ριζόβια (Franche *et al*., 2008, Tilak *et al*., 2005).

Η τελευταία κατηγορία συμβιωτικών αζωτοδεσμευτικών οργανισμών είναι μέλη των κυανοβακτηρίων. Τα κυανοβακτήρια αποτελούν τη μεγαλύτερη και πιο ποικίλη ομάδα Gram αρνητικών προκαρυωτικών οργανισμών (Franche *et al*., 2008). Τα πιο σημαντικά αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια είναι νηματώδη στελέχη τα οποία διαφοροποιούνται ώστε να δημιουργηθούν ετεροκύστες. Βακτήρια των γενών *Nostoc* και *Anabaena* (Nostocales) είναι οι πιο σημαντικοί εκπρόσωποι αυτών των κυανοβακτηρίων. Ετεροκύστες είναι υψηλώς εξειδικευμένα κύτταρα που διαφοροποιούνται εντός του νηματίου όπου εντοπίζεται η αζωτοδέσμευση όταν υπάρχει έλλειψη αζώτου (Εικ. Α.3) (Elmerich, 2007, Franche *et al*., 2008). Το άζωτο που δεσμεύεται από τις ετεροκύστες διοχετεύεται στα φυτικά κύτταρα· σε αντάλλαγμα, τα φυτικά κύτταρα προμηθεύουν τις ετεροκύστες με υδατάνθρακες που προέρχονται από τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Η πιο γνωστή συμβιωτική σχέση κυανοβακτηρίου είναι αυτή που δημιουργείται μεταξύ της υδροχαρούς φτέρης *Azolla* και του είδους *Anabaena azollae* και είναι η μοναδική συμβιωτική σχέση κυανοβακτηρίου με εφαρμογές στην γεωργία (Hove & Lejeune, 2002). Για παράδειγμα, στην Ασία και συγκεκριμένα στο Βιετνάμ και στη νότια Κίνα αναφέρεται ότι η χρήση της *Azolla* ως χλωρή λίπανση είναι πρακτική που ακολουθείται από τους αρχαίους χρόνους (Elmerich, 2007).



Εικ. Α.3 Στέλεχος *Anabaena* ελεύθερης διαβίωσης σε θρεπτικό μέσο απουσία αζώτου όπου οι ετεροκύστες φαίνονται καθαρά μεταξύ των κανονικών κυττάρων (Franche *et al*., 2008).

Η αλληλούχηση του *Klebsiella oxytoca* αποκάλυψε ότι ένας μόνο πυρήνας γονιδίων είναι υπεύθυνος για την έκφραση της νιτρογενάσης. Η οργάνωση του οπερονίου του *A. azollae* που κωδικοποιεί για τη νιτρογενάση έχει αρκετές ομοιότητες με αυτήν του *K. oxytoca* και άλλων αζωτοδεσμευτικών οργανισμών (Haselkorn, 2007). Η σχέση αυτή παρουσιάζει ξεχωριστό ενδιαφέρον για έναν επιπρόσθετο λόγο· είναι η μοναδική η οποία διατηρείται και κατά τον αναπαραγωγικό κύκλο του ξενιστή φυτού. Η σχέση *Azolla- A. azollae* είναι η μοναδική παρατηρούμενη συμβίωση μεταξύ βακτηρίου και πτεριδόφυτου (Vitousek *et al*., 2002). Η συμβίωση που παρατηρείται μεταξύ του κυανοβακτηρίου *Nostoc* με είδη των γενών *Gunnera* ή της ομάδας των κυκαδόφυτων (Cycadophyta) είναι η μοναδική παρατηρούμενη μεταξύ βακτηρίου και αγγειόσπερμου ή γυμνόσπερμου, αντίστοιχα. Το γένος *Gunnera* αποτελείται περίπου από 40 είδη και πιθανότατα, συνεισφέρει σημαντικά ποσά αζώτου σε ορεινές τροπικές περιοχές καθώς και σε περιοχές του νότιου ημισφαιρίου. Η είσοδος των βακτηρίων πραγματοποιείται από ειδικούς αδένες του βλαστού που σχηματίζονται στη βάση των μίσχων. Μετά την προσβολή, δρομολογείται η διαφοροποίηση φυτικών κυττάρων σε ετεροκύστες όπου πραγματοποιείται η αζωτοδέσμευση (Vitousek *et al*., 2002, Franche *et al*., 2008). Στα κυκαδόφυτα η είσοδος των κυανοβακτηρίων (*Nostoc* καθώς και ορισμένα άλλα γένη) πραγματοποιείται μέσω ειδικών πλάγιων ριζών που αναπτύσσονται και ονομάζονται κοραλλοειδείς ρίζες στις οποίες ένα στρώμα κυττάρων είναι δεκτικό στην προσβολή (Franche *et al*., 2008). Πολλά κυκαδόφυτα αναφέρονται ως ανθεκτικά στις πυρκαγιές και στην ξηρασία (Vitousek *et al*., 2002). Τέλος, εκτός από τα αγγειώδη φυτά, παρατηρείται μεγάλη ποικιλία μη αγγειωδών κατώτερων φυτών που σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με κυανοβακτήρια όπως βρύα (*Blasia*), μεγαπλαγκτόν (υπερυδατικά ή μεσόπλευστα φυτά), άλγες και λειχήνες (Hubbell & Kidder, 2003, Franche *et al*., 2008).

Η σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού έχει σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές επιδράσεις σε σημαντικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο έδαφος (Hsu & Buckley, 2009). Μία από τις πιο σημαντικές είναι η βιολογική δέσμευση αζώτου που πραγματοποιείται αποκλειστικά από προκαρυωτικούς οργανισμούς. Τη μεγαλύτερη συνεισφορά αζώτου στο έδαφος φαίνεται να έχουν οι συμβιωτικοί οργανισμοί, οι οποίοι όμως αποικίζουν σχεδόν αποκλειστικά ρίζες ψυχανθών.

Τα σιτηρά καθώς και άλλα φυτά της οικογένειας Poaceae αποτελούν βασική τροφή του αναπτυγμένου αλλά κυρίως και του αναπτυσσόμενου κόσμου και καταλαμβάνουν το 50% των καλλιεργούμενων εκτάσεων στον πλανήτη (Franche *et al*., 2008). Οι οργανισμοί που προμηθεύουν με ανηγμένο άζωτο τα αγρωστώδη είναι ελεύθερης διαβίωσης ή ενδοφυτικοί. Αυτά τα βακτήρια μπορεί να μην έχουν την αζωτοδεσμευτική δύναμη των συμβιωτικών αλλά η δυνατότητά τους ως οργανισμοί που προμηθεύουν άζωτο τις καλλιέργειες αγρωστωδών με εναλλακτικό τρόπο (βιολογικό και οικονομικό) τα καθιστά ιδιαιτέρως σημαντικά.

Α.3 ΜΗ-ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΑ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Οι μικροοργανισμοί που αποικούν στη ριζόσφαιρα κατατάσσονται σε ορισμένες ομάδες ανάλογα με την επίδρασή τους στα φυτά και τον τρόπο που αλληλεπιδρούν με τις ρίζες. Ως προς τη επίδρασή τους, χωρίζονται σε παθογόνους και μη παθογόνους. Οι μη παθογόνοι, οι οποίοι είναι ταυτόχρονα και ωφέλιμοι, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Η μία περιλαμβάνει μύκητες και βακτήρια τα οποία δημιουργούν αμοιβαίες συμβιωτικές σχέσεις με το φυτό ξενιστή (*Rhizobium, Frankia* κ.ά.). Η άλλη κατηγορία περιλαμβάνει βακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού και είναι γνωστά ως PGPB (**P**lant **G**rowth **P**romoting **B**acteria) και περιλαμβάνει βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης τα οποία επιδρούν θετικά τόσο στην ανάπτυξη του φυτού όσο και στον εμπλουτισμό του εδάφους. Τα PGPB σχετίζονται με πολλά, αν όχι όλα, τα είδη φυτών και απαντούν συχνά σε πολλά περιβάλλοντα (Mantelin & Touraine, 2004). Η πιο καλά μελετημένη ομάδα των PGPB είναι τα PGPR (**P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobacteria).

PGPR καλούνται τα βακτήρια τα οποία αποικούν στη ριζόσφαιρα και έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη του φυτού μέσω άμεσων ή έμμεσων μηχανισμών. Στην ομάδα αυτήν ανήκουν στελέχη ορισμένων γενών όπως τα γένη *Azoarcus, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Clostridium, Pseudomonas* και *Serratia* (Somers *et al*, 2004). Ορισμένα από τα βακτήρια αυτά είναι, επίσης, δυνατό να εισέλθουν στη ρίζα και να πολλαπλασιαστούν ενδοφυτικά. Ορισμένα, μάλιστα, είναι ικανά να ξεπεράσουν το εμπόδιο της ενδοδερμίδας και να εγκατασταθούν μέσω του αγγειοφόρου συστήματός και σε άλλα όργανα, όπως οι βλαστοί, τα φύλλα, οι βολβοί κ.ά. Τα PGPR διεγείρουν την ανάπτυξη των φυτών είτε με άμεση έκκριση φυτοορμονών είτε υποβοηθώντας τη θρέψη του φυτού, για παράδειγμα με διαλυτοποίηση φωσφόρου και βιολογική δέσμευση αζώτου. Ακόμα πιο έμμεσοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την προστασία των φυτών από φυτοπαθογόνα εδάφους μέσω: α) παραγωγής αντιβιοτικών, β) σιδηροφόρων ουσιών, γ) ένζυμων και άλλων μεταβολιτών που εμποδίζουν τη δράση μικροοργανισμών που βρίσκονται στη ριζόσφαιρα. Κάποια στελέχη φαίνεται να έχουν και προστατευτική δράση έναντι διασυστηματικών και επιφανειακών παθογόνων. Η ‘ανοσοποίηση’ εκδηλώνεται ως καθυστέρηση στην έκφραση των συμπτωμάτων και μείωση στην ένταση και εξέλιξη της ασθένειας με παράλληλη ενεργοποίηση μηχανισμών που συμβάλλουν στη διασυστηματική προστασία των φυτών έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων και ιών και ονομάζεται επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (Induced Systemic Resistance, ISR) (Τζάμος, 2004, Compant *et al*. 2005, Zehnder *et al*., 2001, Kloepper *et al*., 1999).

Α.3.1 ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΔΙΑΒΙΩΣΗΣ

Τα βακτήρια που ζουν στο έδαφος λέγονται ελεύθερης διαβίωσης καθώς δεν εξαρτώνται άμεσα από τις εκκρίσεις των ριζών για την επιβίωσή τους. Εν τούτοις, οι βακτηριακοί πληθυσμοί της ριζόσφαιρας έχουν αποδοτικά συστήματα απορρόφησης και

καταβολισμού οργανικών ενώσεων που περιέχονται στις εκκρίσεις των ριζών Tilak *et al*., 2005). Οι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί ελεύθερης διαβίωσης παρουσιάζουν δυσκολίες στην καλλιέργειά τους στο εργαστήριο και γι' αυτόν τον λόγο ίσως έχει υποτιμηθεί η οικολογική τους σημασία. Όπως οι συμβιωτικοί οργανισμοί έτσι και αυτοί της ελεύθερης διαβίωσης κατέχουν τα γονίδια *nif* που απαιτούνται για την παραγωγή της νιτρογενάσης. Συγκεκριμένα, το γονίδιο *nifH*, το οποίο κωδικοποιεί για μία υπομονάδα της νιτρογενάσης, αποτελεί έναν πολύ χρήσιμο δείκτη ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη και την ταξινόμηση αζωτοδεσμευτικών οργανισμών χωρίς αυτοί να χρειάζεται να καλλιεργηθούν. Μελέτες σε σχέση με την ποικιλότητα του *nifH* στο έδαφος αποκαλύπτουν αλληλουχίες οι οποίες αντιστοιχούν σε διάφορους μη αναγνωρισμένους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς. Μάλιστα, φαίνεται ότι οι μη καλλιεργήσιμοι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό από αυτό των καλλιεργήσιμων και ότι είναι οι κυρίαρχοι οργανισμοί που δεσμεύουν άζωτο στο έδαφος (Poly *et al*., 2001, Zehr *et al*., 2003, Sarita *et al*., 2008). Τα καλλιεργήσιμα βακτήρια, με εξαίρεση την κοινή παρουσία των γονιδίων *nif*, επιδεικνύουν γενετική ποικιλότητα, απεικονίζοντας έτσι και το μεγάλο εύρος των οικοσυστημάτων όπου εντοπίζονται. Τα κυριότερα γνωρίσματα της ποικιλόμορφης φύσης των περισσότερων γενών αζωτοδεσμευτικών οργανισμών ελεύθερης διαβίωσης παρουσιάζονται παρακάτω μαζί με ενδείξεις για ευεργετικές επιδράσεις που, πιθανώς, να παρουσιάζουν ως βιολιπάσματα (Kennedy *et al*., 2004).

A.3.1.1 *Azospirillum*

Βακτήρια του γένους *Azospirillum* (α-Proteobacteria) είναι γνωστό εδώ και χρόνια ότι αποικούν στη ριζόσφαιρα ορισμένων φυτών και προάγουν την ανάπτυξή τους. Είναι ευρέως διαδεδομένα στο εδαφικό υπόστρωμα και έχουν απομονωθεί από πολλά είδη φυτών που περιλαμβάνουν αγρωστώδη έως κακτοειδή (Hartmann & Baldani, 2006). Αναπτύσσονται τόσο σε τροπικά όσο και σε εύκρατα κλίματα σε συνθήκες συμβατικής καλλιέργειας και σε θερμοκήπια (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί 13 είδη: *A. brasilense*, *A. lipoferum* (Tarrand *et al*., 1978), *A. oryzae* (Xie & Yokota, 2005a), *A. amazonense* (Magalhães *et al*, 1983), *A. halopraeferens* (Reinhold *et al*., 1987), *A. irakense* (Khammas *et al*., 1989), *A. largimobile* (Sly & Stackebrandt, 1999), *A. doebereinerae* (Eckert *et al*., 2001), *A. melinis* (Peng *et al*., 2006), *A. canadense* (Mehnaz *et al*, 2007a), *A. zeae* (Mehnaz *et al*, 2007b), *A. rugosum* (Young *et al*., 2008) και *A. picis* (Lin *et al*., 2009).

Ο πρώτος που απομόνωσε και παρατήρησε βακτήρια του γένους *Azospirillum* ήταν ο Ολλανδός μικροβιολόγος M. Beijerinck το 1922 (Baldani *et al*., 2005). Για πολλά χρόνια, λόγω έλλειψης κατάλληλων μεθόδων και τεχνογνωσιών τα στελέχη που είχαν απομονωθεί αρχικά δεν έτυχαν προσοχής. Τελικά, έπειτα από την ανακάλυψη της συσχέτισης τέτοιου τύπου βακτηρίων και της ρίζας, το επιστημονικό ενδιαφέρον αναζωπυρώθηκε και οδήγησε σε εκτεταμένες ταξινομικές μελέτες. Πλέον, στα μέσα της δεκαετίας του '70 από την

εκτεταμένη έρευνα της Johanna Döbereiner θεωρείται ότι έγινε η αποκαλούμενη 'ανακάλυψη εκ νέου' ('rediscovery') του *Spirillum*, το οποίο μετονομάστηκε αργότερα σε *Azospirillum*. Η μετονομασία πραγματοποιήθηκε από την έρευνα των Tarrand *et al*. (1978) στην οποία συμμετείχε και η Döbereiner (Hartmann & Baldani, 2006, Schmid & Hartmann, 2007).

Τα μέλη του γένους *Azospirillum* είναι αρνητικά κατά Gram (ή μεταβλητά) ελεύθερης διαβίωσης αζωτοδεσμευτικά βακτήρια ριζόσφαιρας. Είναι αερόβιοι ετερότροφοι οργανισμοί οι οποίοι δεσμεύουν άζωτο υπό μικροαερόφιλες συνθήκες. Ορισμένα στελέχη εισχωρούν στη ρίζα έχοντας ενδοφυτική δράση (Kennedy *et al*., 2004). Πρόκειται για ραβδία ελαφρώς κυρτά ή ευθέα, μεγέθους 0,6-1,7 x 2,1-3,8 μm τα οποία συχνά έχουν οξείες άκρες. Σε μη ευνοϊκά περιβάλλοντα, όπως έλλειψη υγρασίας και θρεπτικών συστατικών, αναπτύσσουν ενδοκυτταρικά κόκκους με β-πολυ-υδροξυβουτυρικό οξύ. Είναι κινητά σε υγρές καλλιέργειες και φέρουν μονό μαστίγιο. Σε στερεά υποστρώματα σε θερμοκρασία 30ºC παρατηρούνται αρκετά πλάγια μαστίγια μικρότερου μήκους. Σε περίπτωση μεγάλης έλλειψης οξυγόνου, ορισμένα στελέχη μπορεί να μετατρέπουν νιτρικά σε νιτρώδη ή σε οξείδιο του αζώτου και αέριο άζωτο. Οι άριστες τιμές ανάπτυξης για τη θερμοκρασία είναι από 33 έως 41ºC και για το pH από 5,5 έως 7,5. Σε θερμοκρασία 33-35ºC για μία έως δύο εβδομάδες σε καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα BMSA[1], οι αποικίες των *A. brasilense* και *A. lipoferum* έχουν ροζ χρώμα, είναι αδιαφανείς με ακανόνιστο ή στρογγυλό σχήμα και συχνά παρατηρούνται πτυχές. Ο χρωματισμός στο BMSA είναι καλύτερος όταν η καλλιέργεια γίνεται παρουσία φωτός. Οι αποικίες ορισμένων στελεχών του *A. brasilense* έχουν σκούρο ρόδινο χρώμα το οποίο αποδίδεται στο σχηματισμό καροτενοειδών που πραγματοποιείται σε αερόβιες συνθήκες και ίσως σχετίζεται με την προστασία της νιτρογενάσης από την οξείδωση. Σε άλλα είδη δεν παρατηρείται κανένας χρωματισμός (Baldani *et al*., 2005, Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Το *A. brasilense* φέρει και εναλλακτική νιτρογενάση (Betancourt *et al*., 2008). Γενικά, μεταβολίζουν με την ίδια ευκολία τόσο πηγές άνθρακα όσο και αζώτου, γεγονός το οποίο τα καθιστά ιδιαιτέρως προσαρμοσμένα στα ανταγωνιστικά περιβάλλοντα των ριζοσφαιρών. Εκτός του εδάφους, απαντούν σε πολλά μέρη του φυτού και παρότι απομονώνονται συνήθως από αγρωστώδη έχει διαπιστωθεί η παρουσία τους και σε πολλά άλλα είδη φυτών. Η παρουσία τους στη ριζόσφαιρα δεν επάγει τη δημιουργία φυματίων στα φυτά (Baldani *et al*., 2005, Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Τα βακτήρια του γένους *Azospirillum* είναι διαδεδομένα σε όλη την υφήλιο και υπάρχουν σε μεγάλους αριθμούς (μέχρι 10^7/g) στη ριζόσφαιρα. Τόσο το *A. brasilense* όσο και το *A. lipoferum* μπορεί να απομονωθούν από το 30-90% των δειγμάτων εδάφους και ριζόσφαιρας από όλον τον κόσμο (Hartmann & Baldani, 2006). Γενικά, αποικούν κυρίως

[1] **BMS agar**: 200g κόνδυλοι πατάτας, 2,5g L-μηλικό οξύ, 2,0g KOH, 2,6g ακατέργαστη ζάχαρη, διάλυμα βιταμινών (0.01g βιοτίνη, 0,02g πυριδοξίνη, 1000ml αποσταγμένο νερό), 1ml Bromothymol Blue (0,5% αλκοολικό διάλυμα) 15g άγαρ (pH: 7,0) (Baldani *et al*., 2005).

στην επιφάνεια του ριζικού συστήματος αλλά ορισμένα στελέχη είναι ενδοφυτικά. Για παράδειγμα, το *A. brasilense* στέλεχος Sp7 εντοπίζεται κυρίως στην επιφάνεια ριζών ενώ το *A. brasilense* στέλεχος Sp245 παρουσιάζει, κυρίως, ενδοφυτική δράση σε κύτταρα της επιδερμίδας της ρίζας (Elmerich, 2007). Λόγω του γεγονότος ότι τα προηγούμενα χρόνια οι απομονώσεις είχαν πραγματοποιηθεί από τροπικά και υποτροπικά αγρωστώδη, είχε δοθεί η εντύπωση ότι τα βακτήρια αυτά αποικούν μόνο αγρωστώδη φυτά. Πλέον, αυτή η θέση δεν υποστηρίζεται μιας και έχει διαπιστωθεί η παρουσία τους και σε άλλα είδη φυτών (μπανάνα, κακτοειδή, σακχαροκάλαμο) καθώς και σε μη στάσιμα νερά λιμνών και σε φυτά που μεγαλώνουν κοντά στην αρκτική περιοχή του Καναδά (Baldani *et al*., 2005). Τα *A. brasilense* και *A. lipoferum* είναι ευρέως διαδεδομένα ανά τον κόσμο και έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτά όπως ψυχανθή και οπωροκηπευτικά. Το *A. lipoferum* είναι το κυρίαρχο είδος σε ρίζες φυτών ρυζιού. Απομονώνονται, επίσης, από ρίζες, βλαστούς και φύλλα σακχαροκάλαμου ενώ το *A. amazonense* μόνο από τις ρίζες και φύλλα του. Αυτά τα βακτήρια είναι προαιρετικά αζωτοδεσμευτικά (Kennedy *et al*., 2004). Το *A. amazonense* έχει απομονωθεί, επίσης, από ρίζες καλαμποκιού, σόργου, ρυζιού, σιταριού και φοινίκων σε περιοχές της Βραζιλίας, της Χαβάης και της Ταϊλάνδης. Τα υπόλοιπα είδη δε φαίνεται να είναι τόσο κοσμοπολίτικα· για παράδειγμα, το *A. halopraeferens* έχει παρατηρηθεί σε ρίζες του φυτού *Leptochloa fusca* στο Πακιστάν. Το *A. doebereinerae* έχει απομονωθεί από το C_4-αγρωστώδες φυτό *Miscanthus* (Baldani *et al*., 2005). Το *A. rugosum* απομονώθηκε από έδαφος μολυσμένο με πετρέλαιο (Young *et al*., 2008).

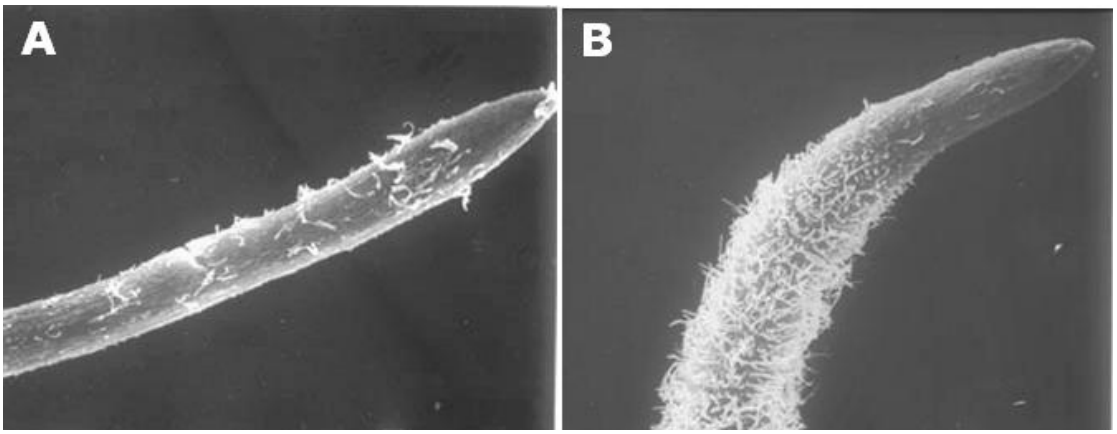
Το ποσοστό G+C του DNA των βακτηρίων του γένους *Azospirillum* κυμαίνεται από 64 έως 71% (Ben Dekhil *et al*., 1997). Πιθανώς, το γονιδίωμα του *Azospirillum* χωρίζεται σε ορισμένες χρωμοσωμικές δομές. Όπως συμβαίνει σε πολλά είδη α-Πρωτεοβακτηρίων έτσι και στα *A. brasilense* και *A. lipoferum* αυτές οι δομές απαντούν ως γραμμικό ή κυκλικό DNA. Κάποια στελέχη των παραπάνω ειδών περιέχουν έξι πλασμίδια με μέγεθος από 4MDa έως 300MDa. Όλα τα στελέχη *A. brasilense* και *A. lipoferum* φέρουν πλασμίδια 90 MDa (p90), τα οποία μοιράζονται συντηρημένες περιοχές και γονίδια που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση ρίζας με *A. brasilense*. Σε γενικές γραμμές, τα είδη του *Azospirillum* έχουν εκτιμώμενο μέγεθος γονιδιώματος από 4,8 έως 9,7 Mbp με πολύπλοκη οργάνωση και κατανεμημένες τις γενετικές πληροφορίες σε πολλά πλασμίδια. (Holguin *et al*., 1999, Martin-Didonet *et al*., 2000). Το *A. brasilense* είναι εξοπλισμένο με το σύστημα ‘switch-off’ παρουσία αμμωνίας το οποίο έχει ρόλο στη ρύθμιση της αζωτοδέσμευσης και αναλύεται περαιτέρω στο κεφάλαιο των φωτοσυνθετικών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (Leigh, 2000).

Βακτήρια του γένους *Azospirillum* θεωρούνται κατάλληλα για εφαρμογές σε καλλιέργειες ως βιολιπάσματα. Βιολιπάσματα ονομάζονται τα υλικά τα οποία περιέχουν ζωντανούς οργανισμούς οι οποίοι, όταν εφαρμόζονται σε σπέρματα, επιφάνειες φυτών ή στο έδαφος, αποικίζουν το συγκεκριμένο φυτό και προωθούν την ανάπτυξή του αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών. Αναφέρονται συχνά μελέτες εμβολιασμού του *Azospirillum* κυρίως σε σιτηρά με αποτέλεσμα την προώθηση της ανάπτυξής τους. Μάλιστα,

κυκλοφορεί και εμπορικό σκεύασμα το οποίο περιέχει *A. lipoferum* με την ονομασία Azogreen-m (Mehnaz & Lazarovits, 2006). Βάσει πολλών δημοσιεύσεων, συμπεραίνεται ότι εμβολιασμός διαφόρων φυτών με *Azospirillum* έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης από 5-30% στο 60-70% των πειραμάτων. Τα πιο ευεργετικά αποτελέσματα παρουσιάστηκαν σε ελαφρά εδάφη με μέτρια λίπανση και σε υδατοκαλλιέργειες. Τα αποτελέσματα σε συνθήκες θερμοκηπίου ήταν καλύτερα από αυτά στον αγρό αν και ορισμένες μελέτες αντικρούουν αυτά τα στοιχεία (Bashan & Holguin, 1997, Holguin *et al*., 1999, Kennedy *et al*., 2004, Dobbelaere & Okon, 2007). Επιπροσθέτως, εμβολιασμός καλλιέργειας ψυχανθών με *Azospirillum* συγχρόνως με *Rhizobium* απέδωσε αύξηση κατά 15-30% από αντίστοιχο εμβολιασμό μόνο με το ριζόβιο (Dobbelaere *et al*., 2001). Δεν πρέπει να υποτιμηθεί το γεγονός ότι παρόλο που η συνεισφορά του *Azospirillum* είναι σχετικά μικρή (φτάνει μόλις το 10% των συνολικών αναγκών του σιταριού) πιθανώς αυξάνει την ικανότητα του φυτού να αφομοιώνει εδαφικό άζωτο (Kennedy *et al*., 2004).

Παρά τη αζωτοδεσμευτική ικανότητά του, η βελτίωση της απόδοσης σε πολλά φυτά αποδίδεται κυρίως στην αύξηση του ριζικού συστήματος λόγω παραγωγής αυξητικών ουσιών και συνεπακόλουθα, αυξημένους ρυθμούς απορρόφησης νερού και θρεπτικών συστατικών (Tilak *et al*., 2005).

Σημαντικό πλεονέκτημα του γένους *Azospirillum* αποτελεί η παραγωγή αυξινών η οποία έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση του φυτού. Έπειτα από τον εμβολιασμό του φυτού με *Azospirillum*, παρατηρείται αλλαγή στη μορφολογία της ρίζας, η οποία αποδίδεται στην παραγωγή ρυθμιστών ανάπτυξης από το βακτήριο. Η αύξηση των πλάγιων ριζών και των ριζικών τριχιδίων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της επιφάνειας του ριζικού συστήματος και, επομένως, αύξηση της απορρόφησης θρεπτικών συστατικών (Εικ. Α.4).



Εικ. Α.4 Φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Μορφολογία ριζικού τριχιδίου τομάτας 48 ώρες μετά από εμβολιασμό με *A. brasilense*. **Α.** Μάρτυρας (χωρίς εμβολιασμό, **Β.** Εμβολιασμός με 108 cfu/ml (Dobbelaere & Okon, 2007).

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

Επίσης, ο εμβολιασμός φυτών με *Azospirillum* μπορεί να συμβάλλει στη διασυστηματική προστασία των φυτών έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων και ιών. Σε περίπτωση δοκιμών με φυτά ρυζιού, περιόρισε την προσβολή του βακτηρίου *Xanthomonas oryzae* αυξάνοντας την παραγωγή σημαντικά. Στο βαμβάκι παρατηρήθηκε παραγωγή ρυθμιστών ανάπτυξης, αντιμυκητιακών, αντιβακτηριακών και σιδηροφόρων ενώσεων (Kennedy *et al*., 2004). Τέλος, τα βακτήρια *Azospirillum* μπορούν να ενισχύσουν την αποκατάσταση μολυσμένων υδάτων από μικροάλγες βοηθώντας τον πολλαπλασιασμό και τον καταβολισμό των αλγών αυτών. Ακόμα, μπορούν να ενισχύσουν την αναδάσωση συγκεκριμένων παράκτιων τροπικών δέντρων (*Avicennia* sp.), να αποτρέψουν τη διάβρωση ερημοποιημένων περιοχών και να προωθήσουν την επαναβλάστησή τους (Bashan Y., Envronmental applications for *Azospirillum* sp., http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/environapp.pdf). Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα διαφοροποιητικά χαρακτηριστικά του γένους *Azospirillum* σε σχέση με γένη άλλων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (Baldani *et al*., 2005).

Οργανισμός: / **Χαρακτηριστικά**	*Azospirillum*	*Rhodospirillum rubrum*	*Magnetospirillum magnetotacticum*	*Azorhizobium caulinodans*	*Xanthobacter autotrophicus*	*Beierinckia*
Σχήμα κυττάρου:						
Καμπυλωτό	+	-	-	-	-	-[1]
Ελικοειδές	-[2]	+	+	-	-	-
Διάμετρος κυττάρου (μm)	0,6-1,7	0,8-1,0	0,2-0,4	0,5-0,6	0,4-0,8	0,5-1,5
Κινητικότητα	+	+	+	+	-[3]	Δ
Επικρατών τύπος μαστιγίου	ΜΠ,Π	ΔΠΘ	ΔΠ	ΠΤ,Π	Δ	ΠΤ
Δραστηριότητα νιτρογενάσης	+	+	+	+	+	+
Δέσμευση αζώτου μόνο υπό μικροαερόφιλες συνθήκες	+	+	+	+	+	-
Αζωτοδέσμευση προς όφελος των φυτών	+	-	-	+	+	-
Φωτοαυτότροφα	-	+	-	-	-	-

(συνέχεια)

Οργανισμός: / Χαρακτηριστικά	*Azospirillum*	*Rhodospirillum rubrum*	*Magnetospirillum magnetotacticum*	*Azorhizobium caulinodans*	*Xanthobacter autotrophicus*	*Beierinckia*
Παραγόμενες βλαστικές ή ριζικές υπερτροφίες	-	-	-	+	-	-
%mol G+C του DNA	64-71	64-64	65	66-68	65-70	55-61

Πίν. Α.3 Διαφοροποιητικά χαρακτηριστικά ορισμένων αζωτοδεσμευτικών οργανισμών

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

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

Α.3.1.2 *Pseudomonas*

Το γένος *Pseudomonas* αντιπροσωπεύει μία ευρεία ομάδα ειδών ικανών να καταβολίζουν μεγάλο αριθμό οργανικών και ανόργανων ενώσεων τα οποία επιβιώνουν και εντοπίζονται σε ιδιαίτερα ετερογενή περιβάλλοντα. Τα βακτήρια *Pseudomonas* απαντούν σε εδαφικά και υδατικά περιβάλλοντα ενώ αποτελούν σημαντικά παθογόνα φυτών, ζώων και του ανθρώπου. Είναι, επίσης, γνωστά για την μεταβολική τους ικανότητα και τη γενετική τους προσαρμοστικότητα. Γενικά, αναπτύσσονται ραγδαία και είναι ικανά να μεταβολίζουν μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένων και τοξικών ενώσεων όπως αλειφατικοί και αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Συχνά, ορισμένα στελέχη *Pseudomonas* παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, βαρέα μέταλλα, οργανικούς διαλύτες απορρυπαντικά κ.ά. (Moore *et al*., 2006). Το γένος *Pseudomonas* αποτελείται από τουλάχιστον 183 είδη και το *P. aeruginosa* αποτελεί το τυπικό είδος του γένους (Euzéby, 1997). Τα περισσότερα είδη *Pseudomonas* προσελκύουν το ενδιαφέρον ως παθογόνα αλλά ορισμένα έχουν περιβαλλοντική σημασία. Ένα από αυτά είναι το *Pseudomonas stutzeri* το οποίο έχει την ικανότητα να αζωτοδεσμεύει.

Το *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. Το 1987 διαπιστώθηκε για πρώτη φορά ότι δεσμεύει ατμοσφαιρικό άζωτο από την έρευνα των Krotzky & Werner. Η μορφολογία της αποικίας του είναι ασυνήθιστη διότι είναι πτυχωτή, ξηρή και ιδιαιτέρως συνεκτική (Rius *et al*., 2001). Έχει περιγραφεί ως κοραλλοειδής κατασκευή είτε ως κρατήρας με ραβδώσεις οι οποίες διακλαδίζονται και ενώνονται (Εικ. Α.5). Η μορφολογία της αποικίας δεν είναι ούτε κοινή σε όλες τις περιπτώσεις αλλά ούτε και αμετάβλητη. Σε εργαστηριακές συνθήκες και έπειτα από ορισμένες ανακαλλιέργειες οι αποικίες παρουσιάζονται ομαλές, λιγότερο συνεκτικές και με πιο ωχρό χρώμα. Το *P. stutzeri* είναι Gram αρνητικό βακτήριο με σχήμα ραβδίου και είναι κινητό μέσω μονού πολικού μαστίγιου. Διαθέτει τριχίδια τύπου IV τα οποία, πιθανώς, να συνεισφέρουν και στην κινητικότητα του βακτηρίου. Η θερμοκρασία ανάπτυξης του *P. stutzeri* είναι από 4°C έως

45°C αλλά η βέλτιστη θερμοκρασία είναι περίπου 35°C. Το περιεχόμενο G+C των στελεχών κυμαίνεται από 60,7% έως 66,3%. Τα βακτήρια *P. stutzeri* χωρίζονται σε δύο ομάδες: η μία ομάδα περιλαμβάνει στελέχη με G+C κοντά στο 62%, που δεν ανέχονται θερμοκρασία 43°C και μία δεύτερη τα οποίας τα στελέχη έχουν G+C 65-66% και αντέχουν σε θερμοκρασίες από 43°C και πάνω. Το γονιδίωμα αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα το οποίο εκτιμάται ότι έχει μέγεθος από 3,75 Mb έως 4,64 Mb και έως τέσσερα πλασμίδια (Lalucat *et al*., 2006). Έχει ευρεία διάδοση αλλά απαντά, κυρίως, σε εδάφη και νερά ενώ ορισμένα στελέχη έχουν απομονωθεί από κλινικά δείγματα (Rius *et al*., 2001).

Εικ. Α.5 Μορφολογία αποικίας *Pseudomonas stutzeri* (Lalucat *et al*., 2006).

Γενικά, τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* ταξινομούνται σε 5 ομάδες βάσει υβριδισμού DNA με ριβοσωμικό RNA. Αυτές οι ομάδες καλούνται rRNA ομάδες ομολογίας. Το *P. stutzeri* αποτελεί ένα μη φθορίζον, απονιτροποιητικό γ-Πρωτεοβακτήριο, το οποίο περιλαμβάνεται στη rRNA ομάδα ομολογίας I και στην οποία περιλαμβάνονται τα *P. aeruginosa, P. fluorescens, P. putida* και άλλα, τα οποία αποτελούν τις 'αληθινές' ψευδομονάδες (δηλ. *Pseudomonas* sensu stricto) (Moore *et al*., 2006). Ταξινομικά, το είδος *P. stutzeri* χωρίζεται σε 18 genomovar μέσω DNA-DNA υβριδισμού, RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) και αναλύσεων αλληλουχιών που κωδικοποιούν για το γονίδιο16S (Sikorski *et al*., 2005). Ο όρος genomovar καθιερώθηκε για πρώτη φορά για το *P. stutzeri* και χρησιμοποιείται για στελέχη τα οποία παρουσιάζουν γενετική απόκλιση αλλά έχουν φαινοτυπικές ομοιότητες. Αντίστροφα, όταν ένα στέλεχος έχει όμοια γενετική σύσταση αλλά διαφορετικό φαινότυπο από ένα ορισμένο είδος τότε αποτελεί υποείδος του (Lalucat *et al*., 2006).

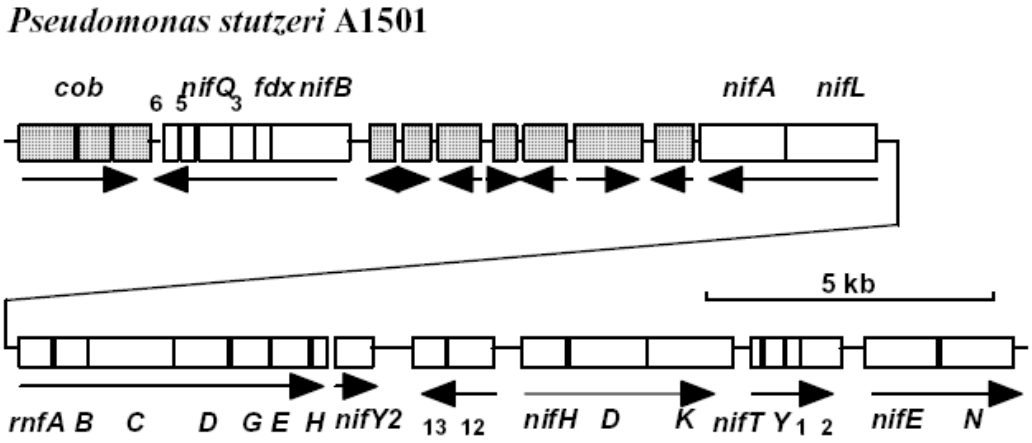
Το *P. stutzeri* είναι το μοναδικό είδος του γένους *Pseudomonas* το οποίο δεσμεύει ατμοσφαιρικό άζωτο. Ορισμένα είδη στα οποία αποδίδεται η ιδιότητα της αζωτοδέσμευσης και ανήκαν στο γένος *Pseudomonas* έχουν μεταφερθεί σε γένη των α- και β-Πρωτεοβακτηρίων ("*Pseudomonas paucimobilis*", "*P. diazotrophicus*", "*P. saccharophila*", κ.ά.). Το *P. azotofigens* αναφέρεται ως αζωτοδεσμευτικό αλλά αντιπροσωπεύεται μόνο από ένα στέλεχος. Το στέλεχος *P. stutzeri* A15 (πρωτύτερα γνωστό ως *Alcaligenes faecalis*)

αποτελεί μοντέλο για τη μελέτη της αζωτοδέσμευσης και ανήκει στο genomovar I. Έχει απομονωθεί από φυτά ρυζιού στα οποία αναπτύσσεται ενδοφυτικά και έχει διαπιστωθεί ότι προάγει την ανάπτυξή τους δεσμεύοντας άζωτο (Lalucat *et al*., 2006). Επίσης, διαθέτει τρεις διαφορετικές αναγωγάσες νιτρικών οι οποίες καθιστούν δυνατή την μετατροπή νιτρικών σε νιτρώδη μέσω τριών ξεχωριστών φυσιολογικών διαδικασιών: α) αφομοίωση νιτρικών, β) αναπνοή μέσω νιτρικών και γ) απελευθέρωση νιτρικών. Πιθανώς, στην περίπτωση του *P. stutzeri* A15, όπως και σε αυτήν των βακτηρίων *Rhizobium*, η αναγωγή νιτρικών να προωθεί την αζωτοδέσμευση διότι η παρουσία νιτρικών έχει ανασταλτική δράση προς αυτήν (Rediers *et al*., 2007). Άλλα στελέχη του *P. stutzeri* έχουν απομονωθεί από ρίζες σόργου, από σιτάρι, από ριζόσφαιρα κάπαρης (*Capparis spinosa*) και από εδαφικά δείγματα (Lalucat *et al*., 2006, Yan *et al*., 2008). Σε γενικές γραμμές, τα στελέχη του *P. stutzeri* αναπτύσσονται ικανοποιητικά παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Ωστόσο, προκειμένου να αζωτοδεσμεύσουν απαιτούνται μικροαερόφιλες συνθήκες. Όλα τα στελέχη περιγράφονται ως προαιρετικά αναερόβια παρουσία νιτρικού. Ορισμένα στελέχη είναι επίσης αναερόβια με χλωρικό ή υπερχλωρικό ως τελικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων (Lalucat *et al*., 2006).

Στο *P. stutzeri* A15 μία περιοχή 30 kb περιέχει τα οπερόνια *nif* και τα γειτονικά προς αυτή γονίδια (Εικ. Α.6). Σε αυτήν την περιοχή έχουν εντοπιστεί 37 ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια. Όπως και σε άλλα γ-Πρωτεοβακτήρια έτσι και στο *P. stutzeri* A15 υπάρχουν τα ρυθμιστικά γονίδια *nifL* και *nifA*. Μεταξύ του *nifLA* και του οπερονίου *nifHDK* η περιοχή αυτή περιλαμβάνει μία ομάδα γονιδίων *rnfABCDGEH* τα οποία αρχικά έχουν αναγνωριστεί στο *Rhodobacter capsulatus*. Τα γονίδια αυτά πιθανώς να έχουν ρόλο στη μεταφορά ηλεκτρονίων στη νιτρογενάση αλλά έχουν εντοπιστεί και σε μη αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Η οργάνωση των *nif* και *rnf* γονιδίων είναι παρόμοια με αυτήν του *A. vinelandii* αν και στο *A. vinelandii* τα *rnf* δεν βρίσκονται κοντά στο *nifHDK* (Pedrosa & Elmerich, 2007). Επίσης, η αμινοξική ακολουθία του οπερονίου *nifHDK* του *P. stutzeri* A15 έχει πολύ υψηλή ομολογία (87-91%) με το αντίστοιχο του *A. vinelandii*. Επιπροσθέτως, η οργάνωση των γονιδίων *nifH* είναι πανομοιότυπη στα δύο αυτά στελέχη. Τα παραπάνω στοιχεία υποδηλώνουν ότι το *A. vinelandii* πιθανώς να ανήκει στο γένος *Pseudomonas* sensu stricto (Rediers *et al*., 2004).

Το γονιδίωμα του στελέχους *P. stutzeri* A1501 (προέρχεται από το A15) αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα το οποίο έχει μέγεθος 4.567.418 bp και δεν παρατηρείται παρουσία πλασμιδίου. Έχουν εντοπιστεί τέσσερις περιοχές με μη τυπικό ποσοστό G+C οι οποίες διαθέτουν ένθεν και ένθεν γονίδια που κωδικοποιούν για tRNA. Τα χαρακτηριστικά αυτά χαρακτηρίζουν αυτές τις περιοχές ως γονιδιωματικές νησίδες οι οποίες, πιθανώς, έχουν αποκτηθεί πρόσφατα. Επιπλέον, μία πέμπτη περιοχή με μέγεθος 49 kb και μη τυπικό ποσοστό G+C περιέχει 59 γονίδια μεταξύ των οποίων και τα γονίδια της αζωτοδέσμευσης (*nif*). Πιθανώς, πρόκειται για νησίδα αζωτοδέσμευσης η οποία αποκτήθηκε μέσω οριζόντιας μεταφοράς και έχει παρατηρηθεί και σε άλλους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς όπως το *Rhizobium leguminosarum* (Yan *et al*., 2008). Η άποψη ότι τα γονίδια αζωτοδέσμευσης στο

P. stutzeri έχουν αποκτηθεί μέσω οριζόντιας μεταφοράς ενισχύεται από τη φυλογένεια του γονιδίου *nifH* (Lalucat *et al*., 2006).



Εικ. Α.6 Οργάνωση των γονιδίων *nif* και σχετικών γονιδίων του *P. stutzeri* A1501. Τα οριζόντια βέλη υποδεικνύουν τη διεύθυνση της μεταγραφής. Τα σκιασμένα ορθογώνια υποδεικνύουν γονίδια τα οποία δε σχετίζονται με την αζωτοδέσμευση. Τα νούμερα αντιστοιχούν σε μη ταυτοποιημένα αναγνωστικά πλαίσια (Pedrosa & Elmerich, 2007).

Α.3.1.3 *Azotobacter*

Το γένος *Azotobacter* ανήκει στην τάξη Pseudomonadales της κλάσης των γ-Πρωτεοβακτηρίων. Στο γένος περιλαμβάνονται 7 είδη: *A. chroococcum, A. vinelandii, A. beijerinckii, A. nigricans, A. armeniacus, A. paspali, A. salinestris* (Kennedy *et al*., 2005). Τα βακτήρια του γένους *Azotobacter* είναι ετεροτροφικοί, υποχρεωτικά αερόβιοι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί ελεύθερης διαβίωσης οι οποίοι εξαρτώνται από ανηγμένες οργανικές ενώσεις, όπως τα σάκχαρα, για την εξασφάλιση πηγών ενέργειας (Kennedy *et al*., 2004, Tilak *et al*., 2005).

Η πρώτη δημοσιευμένη αναφορά απομόνωσης αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων του γένους *Azotobacter* παρουσιάστηκε το 1901 από τον Ολλανδό μικροβιολόγο Beijerinck, ο οποίος αναφέρει τα είδη *A. chroococcum* και *Azomonas agilis*. Το είδος *A. vinelandii* περιγράφηκε δύο χρόνια αργότερα από τον Lipman. Τις δεκαετίες του ’60 και του ’70 οι έρευνες στο *Azotobacter* επικεντρώθηκαν κυρίως σε δύο πεδία: α) τη φυσιολογία ανοχής σε οξυγόνο των *A. vinelandii* και *A. chroococcum* και β) τη βιοχημεία του ενζυμικού συστήματος του *A. vinelandii*. Η πιο σπουδαία ίσως ανακάλυψη έγινε στη δεκαετία του ’80 η οποία αναφέρεται στη διαπίστωση ότι το *A. vinelandii* περιέχει και μία εναλλακτική νιτρογενάση η οποία δεν συμπεριλαμβάνει μολυβδαίνιο. Περαιτέρω έρευνες τις δεκαετίες

του ’80 και του ’90 απέδειξαν ότι τα *A. vinelandii* και *A. paspali* φέρουν τρία διαφορετικά, από γενετική άποψη, ένζυμα νιτρογενάσης και ότι το *A. chroococcum* φέρει δύο ξεχωριστά ένζυμα για αζωτοδέσμευση (Kennedy & Bishop, 2004). Το *A. salinestris* φέρει εναλλακτική νιτρογενάση (Betancourt *et al*., 2008). Τις τελευταίες δεκαετίες, με τα εργαλεία της μοριακής βιολογίας και γενετικής να προοδεύουν, το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί σε μοριακές αναλύσεις οι οποίες έχουν οδηγήσει στην πρώτη δημοσίευση του γονιδιώματος του *A. vinelandii* το 2002. Το στέλεχος *Av*OP (ή αλλιώς στέλεχος UW ή CA) του ίδιου είδους αποτελεί το μοντέλο για το γένος *Azotobacter* λόγω της επιδεκτικότητάς του σε μοριακούς χειρισμούς όπως μετασχηματισμός, σύζευξη κ.ά. (Kennedy & Bishop, 2004).

Τα βακτήρια του γένους *Azotobacter* είναι Gram αρνητικά βακτήρια και το σχήμα των κυττάρων τους ποικίλει από ευθέα ραβδία με στρογγυλές άκρες ώς ελλειπτικές ή ακόμα και κοκκοειδείς μορφές, ανάλογα με το υπόστρωμα και την ηλικία. Η διάμετρός τους είναι 2μm ή περισσότερο και το μήκος φτάνει τα 4μm. Το *A. paspali* είναι συνήθως πιο επίμηκες σε σχέση με τα άλλα είδη. Τα βακτήρια του γένους *Azotobacter* μπορεί να είναι κινητά με πλευρικά μαστίγια ή μη κινητά (Kennedy *et al*., 2005). Πλευρικά μαστίγια φέρουν τα είδη *A. vinelandii*, *A. paspali* και *A. chroococcum* (Vanbleu & Vanderleyden, 2007). Σε ορισμένα στελέχη όλων των ειδών παρατηρείται παραγωγή υδατοδιαλυτών ή μη υδατοδιαλυτών χρωστικών. Τα βακτήρια του γένους *Azotobacter* χρησιμοποιούν ως πηγές άνθρακα σάκχαρα, αλκοόλες και άλατα οργανικών οξέων ενώ ως πηγές αζώτου αξιοποιούν αμμωνιακά άλατα, νιτρικά και ουρία. Το εύρος pH για την ανάπτυξή τους είναι 4,8-8,5 και το άριστο pH για αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα από 7,0 έως 7,5. Τα περισσότερα είδη έχουν απομονωθεί από το έδαφος ενώ ένα μικρό ποσοστό από νερό (Kennedy *et al*., 2005). Το είδος *A. paspali* παρουσιάζει εξειδίκευση καθώς έχει απομονωθεί μόνο από τη ριζόσφαιρα του *Paspalum notatum*, ενός υποτροπικού τετραπλοειδούς αγρωστώδους φυτού, και επιδεικνύει αζωτοδέσμευση της τάξης 15-90 kg N/εκτάριο/έτος (Tilak *et al*., 2005, Elmerich, 2007).

Η αζωτοδέσμευση υπό αερόβιες συνθήκες αποτελεί το βασικό χαρακτηριστικό του γένους *Azotobacter*. Όπως προαναφέρθηκε, στο *Azotobacter* εντοπίζονται και οι τρεις μορφές ενζυμικών συστημάτων νιτρογενάσης NiF, VnF και AnF οι οποίες χρησιμοποιούνται από το βακτήριο για δέσμευση αζώτου ανάλογα με την παρουσία μετάλλων στο περιβάλλον. Τα γονίδια *nifHDK* κωδικοποιούν για βασικές δομικές πρωτεΐνες του συστήματος νιτρογενάσης. Τα υπόλοιπα γονίδια του οπερονίου *nif* εκφράζουν πρωτεΐνες σχετικές με τη μεταφορά ηλεκτρονίων, την αναγωγή κ.ά. Η πρωτεΐνη NifA έχει ρόλο ενεργοποιητή των γονιδίων *nif* ενώ αρνητική ρύθμιση στην παραγωγή της NifA παρέχει η NifL η οποία είναι χαρακτηριστική για τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια των γ-Πρωτεοβακτηρίων, όπως το *Azotobacter* και το *Klebsiella oxytoca* (Kennedy *et al*., 2005). Εκτός από τη δέσμευση αζώτου, τα βακτήρια *Azotobacter* είναι ικανά να χρησιμοποιούν νιτρικά ως πηγή αζώτου με αναγωγή των τελευταίων σε νιτρώδη και έπειτα σε αμμωνιακά.

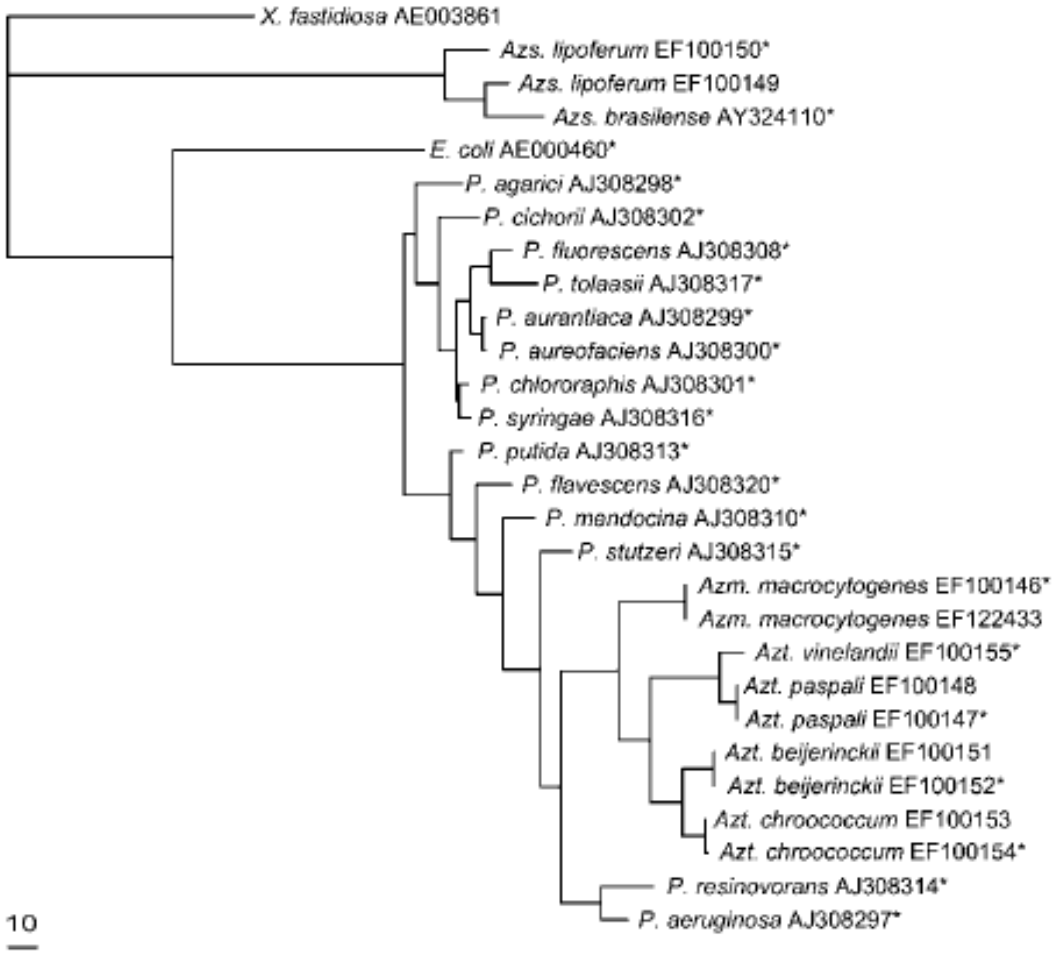
Το γονίδια που κωδικοποιούν για την αναγωγάση των νιτρικών και των νιτρωδών έχουν απομονωθεί από το *Av*OP και είναι τα *nasB* και *nasA*, αντίστοιχα (Kennedy & Bishop, 2004).

Τα βακτήρια του γένους *Azotobacter* παράγουν ορισμένες ενώσεις οι οποίες παρουσιάζουν ξεχωριστό ενδιαφέρον για διαφορετικούς λόγους. Υπό συνθήκες περιβαλλοντικού στρες, ορισμένα είδη έχουν την ικανότητα να δημιουργούν κύστες οι οποίες αυξάνουν σημαντικά την πιθανότητα επιβίωσης του βακτηρίου. Τα φυτικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε μη κινητές κύστες οι οποίες περιέχουν κόκκους β-πολύ-υδροξυβουτυρικού οξέος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συγκέντρωση κυττάρων σε ένα πλέγμα πολυσακχαριτών και τον σχηματισμό μακροσκοπικών όγκων, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν άζωτο και επιπλέον, παρουσιάζουν υψηλή δραστικότητα της αναγωγάσης του νιτρικού και της συνθάσης του γλουταμινικού (Vanbleu & Vanderleyden, 2007). Το *A. vinelandii* παράγει αλγινικό οξύ, έναν πολυσακχαρίτη ο οποίος είναι συστατικό των κύστεων. Το αλγινικό οξύ παρουσιάζει ενδιαφέρον για τη βιομηχανία και μπορεί να παραχθεί σε ικανοποιητικές ποσότητες ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας (Kennedy *et al*., 2005). Το *A. vinelandii* παράγει, επίσης, τουλάχιστον δώδεκα φερεδοξίνες εκ των οποίων οι τέσσερις πιθανώς να εμπλέκονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων προς τη νιτρογενάση (Kennedy & Bishop, 2004). Ορισμένα είδη *Azotobacter* παράγουν σιδηροφόρους ουσίες. Ο σίδηρος είναι απαραίτητο στοιχείο και ο ανταγωνισμός για αυτόν στη ριζόσφαιρα είναι ιδιαίτερα έντονος. Σε αερόβιες συνθήκες, ο σίδηρος λαμβάνει αδιάλυτες μορφές και αφομοιώνεται με δυσκολία από τα βακτήρια. Οι σιδηροφόροι είναι μόρια μικρού μοριακού βάρους που παράγονται υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου προκειμένου να δεσμεύουν σίδηρο και να το μεταφέρουν στο μικροβιακό κύτταρο (Bally & Elmerich, 2007, Vanbleu & Vanderleyden, 2007). Επίσης, αναφέρεται η παραγωγή κυτοκινινών για τα *A. chroococcum* και *A. beijerinckii* σε ριζόσφαιρα του αγρωστώδους *Festuca* sp. (Baca & Elmerich, 2007). Το είδος *A. paspali* συνθέτει και εκκρίνει ινδολοξικό οξύ, τρεις γιβερελλίνες και δύο κυτοκινίνες (Kennedy *et al*., 2005). Τέλος, πολλά είδη *Azotobacter* παράγουν ουσίες οι οποίες θεωρούνται ότι έχουν ανασταλτική δράση έναντι παθογόνων όπως το *Botrytis cinerea* (Vanbleu & Vanderleyden, 2007) ενώ έχει βρεθεί ότι σε συνδυασμό με τα *Azospirillum* και *Klebsiella*, τα *Azotobacter* περιορίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia* και *Pythium* sp. στο αγγούρι (Bally & Elmerich, 2007).

Το ποσοστό του περιεχομένου G+C του γένους κυμαίνεται από 63,2 έως 67,5% και το τυπικό είδος του γένους είναι το *A. chroococcum*. Το μέγεθος του γονιδιώματος των ειδών του *Azotobacter* κυμαίνεται από 3,10Mb (*A. chroococcum* NCIB 9043) έως 5,3Mb (*A. chroococcum* στέλεχος M4). Η διαφορά στο μέγεθος του γονιδιώματος του ίδιου είδους ενισχύει την άποψη περί γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ στελεχών του *A. chroococcum*. Ένα διαφοροποιητικό χαρακτηριστικό για το συγκεκριμένο είδος ενδέχεται να είναι η παρουσία ενός ή πολλαπλών πλασμιδίων διότι δεν υπάρχουν αναφορές προς το παρόν για πλασμίδια σε άλλα είδη του *Azotobacter*. Επίσης, όλα τα είδη έχουν από έξι ως οκτώ

αντίγραφα του γονιδίου *rrn*. Το *Azotobacter* ταξινομείται, πλέον, ως γένος της οικογένειας Pseudomonadaceae ενώ παλιότερα ανήκε στην οικογένεια *Azotobacteraceae*, η οποία, ταξινομικά, δεν είναι πλέον αποδεκτή οικογένεια (Euzéby, 1997). Μοριακές αναλύσεις του γονιδίου 16S rRNA καθώς και άλλων συντηρημένων γονιδίων υποδεικνύουν την τοποθέτηση των ειδών του *Azotobacter* στο γένος *Pseudomonas sensu stricto*. Εάν τελικά το γένος επαναπροσδιοριστεί ως *Pseudomonas* τότε θα πρέπει να ταξινομηθεί στην ομάδα του *P.* a*eruginosa* (Εικ. Α.7). Αν και αρχικά διατυπώθηκαν ορισμένες αμφιβολίες επ' αυτού λόγω του ότι η δέσμευση αζώτου δεν είναι διαδεδομένη μεταξύ των ειδών του *Pseudomonas*, τα τελευταία χρόνια έχουν απομονωθεί στελέχη *Pseudomonas*, τα οποία αζωτοδεσμεύουν. Πιθανώς, η ικανότητα αυτή να αποκτήθηκε μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Rediers *et al*., 2004, Young & Park, 2007).

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



Εικ. A.7 Συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών του γονιδίου 16S rRNA ορισμένων ειδών των *Azomonas* (Azm.), *Azospirillum* (Azs.), *Azotobacter* (Azt.) και *Pseudomonas* μέσω του αλγορίθμου Neighboor Joining. Η μπάρα αντιστοιχεί σε υποκαταστάσεις ανά θέση. Αλληλουχίες σημειωμένες με αστερίσκο (*) προέρχονται από τα τυπικά στελέχη. Οι αλληλουχίες AY324110*, EF100149 και EF100150* αναφέρονται στα *Azospirillum brasilense* (ATCC 29145T) και *Azospirillum lipoferum* (8672 και ATCC 29707T), αντίστοιχα (Young & Park, 2007).

A.3.1.4 *Xanthobacter*

Τα μέλη του γένους *Xanthobacter* είναι κίτρινα ραβδία τα οποία περιέχουν τη χρωστική ζεαξανθίνη (καροτενοειδές) και είναι Gram αρνητικά αν και μερικές φορές κατά τη χρώση παρουσιάζουν την όψη των Gram θετικών. Ανήκουν στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων και το ποσοστό G+C του γένους κυμαίνεται από 60-70%. Όλα τα στελέχη είναι ικανά να οξειδώνουν υδρογόνο και γενικά θεωρούνται και μεθυλοτροφικά. Επίσης, όλα τα στελέχη δεσμεύουν άζωτο υπό χημειοετεροτροφικές και χημειολιθο-

αυτοτροφικές συνθήκες αλλά μόνο υπό μικροαερόφιλες συνθήκες και απουσία αμμωνίας. Τα είδη που ανήκουν στο γένος είναι τα *Xanthobacter autotrophicus* (τυπικό είδος), *Xanthobacter flavus*, *Xanthobacter agilis*, *Xanthobacter tagetidis*, *Xanthobacter aminoxidans* και *Xanthobacter viscosus*. Τα περιβάλλοντα από τα οποία έχουν απομονωθεί στελέχη *Xanthobacter* είναι: έδαφος μολυσμένο με πετρέλαιο ή/και απόβλητα, θαλάσσια ιζήματα, ύδατα και ιζήματα λιμνών, έδαφος και ριζόσφαιρα πλημμυρισμένων ορυζώνων, ριζόσφαιρα κατηφέ (*Marigold* sp.), έδαφος κήπων, υπόνομοι και φύλλα δέντρων (Wiegel, 2006).

Τα *Xanthobacter*, πιθανώς, να συνεισφέρουν σημαντικές ποσότητες αζώτου στα φυτά. Τα στελέχη που έχουν κυρίαρχο ρόλο στην αλληλεπίδραση *Xanthobacter* και φυτών ανήκουν στα *X. autotrophicus* και *X. flavus*. Το *X. autotrophicus* δεσμεύει άζωτο ετεροτροφικά σε τιμές που ανέρχονται σε 20-25mg αζώτου ανά g σακχαρόζης. Η πιο σημαντική ιδιότητα του *Xanthobacter* είναι η αυτοτροφική αζωτοδέσμευση αλλά δεν έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες επ' αυτού. Ως τώρα δεν έχουν απομονωθεί από τη ρίζα κάποιου φυτού αλλά, πιθανώς, να επηρεάζουν την ανάπτυξη του φυτού μέσω της ριζόσφαιρας. Επιπλέον και σύμφωνα με ορισμένες ενδείξεις, το *X. flavus* δεσμεύει άζωτο στην επιφάνεια φύλλων ρυζιού και σιταριού. Ίσως, τα βακτήρια αυτά να καταβολίζουν τα συστατικά του κηρού του φύλλου ώστε να παραχθεί η απαιτούμενη ενέργεια για την αζωτοδέσμευση. Ως προς τη νιτρογενάση, έχει διαπιστωθεί ότι περιέχουν την τυπική νιτρογενάση (Nif) που παρουσιάζουν τα περισσότερα αερόβια αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Υπάρχουν ενδείξεις και για την ύπαρξη της εναλλακτικής νιτρογενάσης βαναδίου (Vnf) αλλά το ερώτημα αυτό δεν έχει ξεκαθαριστεί ακόμα. Αξίζει να αναφερθεί ότι, πιθανώς, μελλοντικά το γένος ριζοβίων *Azorhizobium* να ενσωματωθεί στο γένος *Xanthobacter* (Wiegel, 2006).

A.3.1.5 *Beijerinckia*

Βακτήρια του γένους *Beijerinckia* απομονώθηκαν για πρώτη φορά από χαλαζιακά εδάφη στο Μπαγκλαντές, το 1936. Αργότερα διαπιστώθηκε η παρουσία τους, κυρίως, σε όξινα εδάφη τροπικών περιοχών. Είναι αζωτοδεσμευτικά υποχρεωτικά αερόβια βακτήρια τα οποία απαντούν κυρίως στο ριζοπλάνο αλλά και στη ριζόσφαιρα. Έχει βρεθεί ότι έχουν ωφέλιμες επιδράσεις σε ρίζες σακχαροκάλαμου, ρυζιού και άλλων αγρωστωδών. Τα είδη του γένους είναι τα *B. indica* (συνώνυμα: *Azotobacter acida*, *Beijerinckia acida* και *Beijerinckia congensis*), *B. fluminensis* και *B. derxii* (με δύο υποείδη) (Becking, 2006a).

Έχουν την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν σε θρεπτικά υποστρώματα απουσία αζώτου υπό ισχυρά όξινες συνθήκες έως και pH 3,0. Είναι Gram αρνητικά, κινητά με πλευρικά μαστίγια τα οποία όμως δε διαθέτουν ορισμένα στελέχη. Τα κύτταρά τους είναι μικρότερα από αυτά των *Azotobacter* και *Azomonas* (1,7-4,5x0,5-1,5 μm) και έχουν σχήμα ραβδίων με στρογγυλές άκρες και ελαφρώς στενότερα στη μέση. Ένα άλλο χαρακτηριστικό των

κυττάρων είναι η παρουσία λιποειδών σωμάτων -ενός σε κάθε πόλο- τα οποία περιέχουν β-πολύ-υδροξυβουτυρικό οξύ. Το ποσοστό G+C του γένους κυμαίνεται από 54,7-60,7%. Πολλά στελέχη καταβολίζουν νιτρικό είτε ελάχιστα είτε καθόλου. Επίσης, για δέσμευση αζώτου απαιτείται παρουσία μολυβδαινίου ενώ δεν χρειάζεται ασβέστιο και βανάδιο. Το γεγονός ότι η απουσία μολυβδαινίου δεν αντικαθίσταται από την παρουσία βαναδίου υποδηλώνει ότι τα *Beijerinckia* δεν περιέχουν τη νιτρογενάση VnF (Becking, 2006a).

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

A.3.1.6 *Derxia*

Το γένος *Derxia* αντιπροσωπεύεται από ένα μόνο είδος, το *Derxia gummosa*. Πολλές φορές αναφέρεται και το είδος *D. indica* αλλά δεν είναι αποδεκτό διότι δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να το διαφοροποιούν από το *D. gummosa*. Τα βακτήρια του γένους *Derxia* εντοπίζονται κυρίως σε εδάφη τροπικών περιοχών και παρουσιάζουν αντοχή σε χαμηλό pH (Becking, 2006b).

Τα κύτταρα του *Derxia* είναι ευθέα ραβδία (3,0-6,0x1,0-1,2μm) με πολυάριθμα λιποειδή σώματα και στρογγυλές άκρες τα οποία είναι κινητά και φέρουν μικρό πολικό μαστίγιο. Είναι Gram αρνητικά βακτήρια και ανήκουν στην κλάση των β-Πρωτεοβακτηρίων (Becking, 2006b, Schmid & Hartmann, 2007). Η αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται υπό αερόβιες ή μικροαερόφιλες συνθήκες. Μπορούν να επιβιώνουν και ως προαιρετικοί αυτότροφοι υδρογόνου και να χρησιμοποιούν υδρογόνο ως πηγή ενέργειας και ως αναγωγική δύναμη για την ανάπτυξη τους και για αναγωγή CO_2. Η αποδοτικότητα αζωτοδέσμευσης κυμαίνεται συνήθως από 9-25 mg αζώτου ανά g καταναλισκόμενης γλυκόζης σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς άζωτο αλλά για τα περισσότερα στελέχη είναι χαμηλότερη από αυτήν των *Azotobacter* και *Beijerinckia*. Σε εργαστηριακές καλλιέργειες το νιτρικό δεν ανάγεται σε νιτρώδες ή N_2 και δεν παράγεται ινδολοξικό από τρυπτοφάνη. Για δέσμευση αζώτου απαιτείται μολυβδαίνιο ενώ το βανάδιο δεν μπορεί να υποκαταστήσει το μολυβδαίνιο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα *Derxia* δεν περιέχουν την εναλλακτική νιτρογενάση VnF (Becking, 2006b). Προς το παρόν, δεν έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές έρευνες που να αποδεικνύουν την σημασία του *Derxia* ως PGPR σε καλλιέργειες φυτών αν και έχει απομονωθεί και από ριζόσφαιρα σακχαροκάλαμου (Peng *et al.*, 2006) και έχει

επιδείξει μικρή συνεισφορά στην προώθηση της ανάπτυξης του *Pennisetum purpureum* σε συνδυασμό με στελέχη *Azotobacter* σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια (Baldani & Baldani, 2005).

Α.3.1.7 *Paenibacillus* και *Bacillus*

Το γένος *Bacillus* είναι ένα εξαιρετικά ετερογενές γένος αερόβιων, ραβδιόμορφων, ενδοσποριογονικών βακτηρίων. Από μοριακές αναλύσεις του γονιδίου 16S rRNA προέκυψαν 10 φυλογενετικές ομάδες *Bacillus* εκ των οποίων η μία αποτελεί πλέον το γένος *Paenibacillus*. Κατά τον διαχωρισμό της ομάδας αυτής, συμπεριλήφθηκαν στο νέο γένος *Paenibacillus* τα *Bacillus azotofixans* (πλέον *Paenibacillus durus*), *B. macerans* (πλέον *Paenibacillus macerans*) και *B. polymyxa* (πλέον *Paenibacillus polymyxa*) τα οποία είναι αζωτοδεσμευτικά βάσει δραστηριότητας της νιτρογενάσης. Από την καθιέρωση του γένους *Paenibacillus* διαρκώς μεταφέρονται είδη που πρωτύτερα ταξινομούνταν ως *Bacillus* και ταυτόχρονα απομονώνονται νέα είδη και των δύο γενών μερικά από τα οποία έχουν ικανότητα δέσμευσης αζώτου. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί 101 είδη *Paenibacillus* που σημαίνει ότι τα τελευταία πέντε χρόνια ο αριθμός των ειδών του γένους έχει σχεδόν διπλασιαστεί (Euzéby, 1997, Ding *et al*., 2005).

Αζωτοδεσμευτικά μέλη του γένους *Paenibacillus* έχουν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα πολλών και σημαντικών καλλιεργούμενων φυτών. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα: *P. polymyxa*, *P. macerans*, *P. durus* (συνώνυμα: *Paenibacillus azotofixans*, *Bacillus azotofixans*, *Clostridium durum*), *P. peoriae*, *P. borealis*, *P. brasilensis*, *P. forsythiae*, *P. sabinae*, *P. zanthoxyli*, *P. massiliensis*, *P. graminis* και *P. odorifer* (Euzéby, 1997, Ding *et al*., 2005, Van Dommelen & Vanderleyden, 2007). Είναι από τα λίγα Gram θετικά βακτήρια τα οποία παρουσιάζουν αζωτοδεσμευτική ικανότητα. Το *P. durus* επιδεικνύει γενετική ποικιλομορφία και συγκεκριμένοι γονότυποι αποικίζουν τη ριζόσφαιρα σιταριού και σακχαροκάλαμου. Επίσης, σημαντικές διαφορές εντοπίζονται σε πληθυσμούς του *P. durus* από ριζόσφαιρα και ριζοπλάνο καλαμποκιού και αποδίδονται στον διαφορετικό τύπο εδάφους απ' όπου απομονώθηκαν (Baldani & Baldani, 2005). Η οργάνωση των γονιδίων *nif* ενός στελέχους *P. durus* περιλαμβάνει τρεις ομάδες, καθεμία από τις οποίες περιέχει ένα αντίγραφο του γονιδίου *nifH*: α) *nifB nifHDK*, β) *nifB nifH* και γ) *nifH* (Pedrosa & Elmerich, 2007). Ενίσχυση αλληλουχιών του γονιδίου *nifH* έχει, επίσης, πραγματοποιηθεί για στελέχη ορισμένων αζωτοδεσμευτικών ειδών *Paenibacillus* αλλά όχι όλων (Ding *et al*., 2005). Στελέχη του γένους *Paenibacillus* μπορούν να επηρεάσουν ευνοϊκά και με άλλους τρόπους την ανάπτυξη των φυτών. Αυτό μπορεί να γίνει είτε άμεσα μέσω παραγωγής φυτοορμονών και θρεπτικών συστατικών είτε έμμεσα με ανταγωνιστική δράση έναντι παθογόνων. Για παράδειγμα, το *P. polymyxa* παράγει πολυμυξίνη, ένα αντιβιοτικό με αντιμυκητιακή και αντιβακτηριακή δράση. Το ίδιο βακτήριο έχει ανασταλτική δράση στο παθογόνο του σιταριού *Gaeumannomyces graminis* var. tritici ενώ επάγει τη διασυστηματική ανοσοποίηση

ορισμένων φυτών στο παθογόνο *Pectobacterium carotovorum* (πρώην *Erwinia carotovora*) (Bally & Elmerich, 2007, Van Dommelen & Vanderleyden, 2007).

Βάσει δραστηριότητας νιτρογενάσης, έχουν αναφερθεί αρκετά είδη του γένους *Bacillus* τα οποία έχουν ικανότητα αζωτοδέσμευσης. Ορισμένα από αυτά είναι τα: *B. megaterium, B. alkalidiazotrophicus, B. cereus, B. pumilus, B. circulans, B. licheniformis, B. subtilis, B. brevis* και *B. firmus* (Ding *et al*., 2005, Sorokin *et al*., 2008). Ωστόσο, ενίσχυση του γονιδίου *nifH* δεν έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία σε πολλά στελέχη που θεωρούνται αζωτοδεσμευτικά. Ενδεικτικά, αναφέρονται ορισμένα στελέχη στα οποία έχει ανιχνευθεί το *nifH*: *B. cereus, B. megaterium* και *B. marisflavi* (Ding *et al*., 2005). Αζωτοδεσμευτικό στέλεχος *Bacillus* sp. έχει επίσης απομονωθεί από εκτομυκόρριζα δέντρου *Pseudotsuga* sp. (ψευδοτσούγκα) (Li *et al*., 1992).

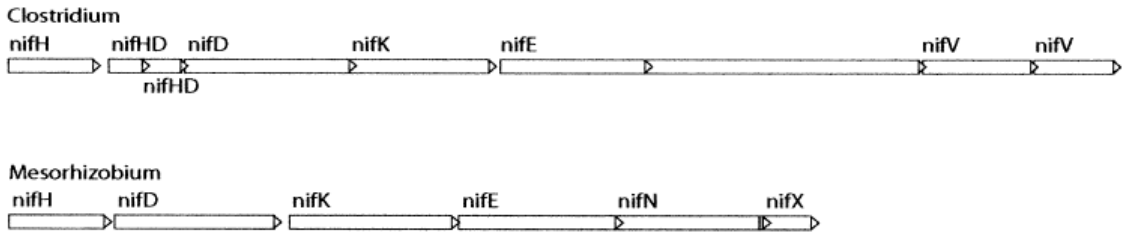
A.3.1.8 *Clostridium*

Το γένος Clostridium ανήκει στο φύλο Firmicutes (πρώην Gram θετικά χαμηλού ποσοστού G+C) και περιλαμβάνει 199 είδη και υποείδη βάσει της πιο πρόσφατης αναφοράς (List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature) (Euzéby, 1997). Πρόκειται για σποριογονικά, υποχρεωτικά αναερόβια, Gram θετικά βακτήρια με χαμηλό ποσοστό G+C τα οποία δεν ανάγουν θειικό οξύ. Απομονώνονται κυρίως από το έδαφος, από σκόνη αλλά και από περιττώματα καθώς τα σπόριά του παρουσιάζουν ανθεκτικότητα εντός του πεπτικού συστήματος. Παρουσιάζουν κλινικό ενδιαφέρον διότι αποτελούν σημαντικά παθογόνα του ανθρώπου όπως το *C. tetani* το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σοβαρή ασθένεια τέτανος. Λόγω του σχηματισμού ανθεκτικών σπορίων, μπορούν να απομονωθούν σχεδόν από κάθε είδος περιβάλλοντος από λιωμένο πάγο της Ανταρκτικής, από όξινες ή αλκαλικές θερμές πηγές έως και άμμο ερημικών περιοχών. Το τυπικό είδος του γένους είναι το *Clostridium butyricum* (Wiegel *et al*., 2006).

Η πρώτη απομόνωση βακτηρίου *Clostridium* έγινε το 1893 από τον Ρώσο μικροβιολόγο Winogradsky και επρόκειτο για το *Clostridium pasteurianum* (Elmerich, 2007). Το *C. pasteurianum* παρουσιάζει την ικανότητα να δεσμεύει άζωτο και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως μοντέλο για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό του ενζυμικού συμπλόκου της νιτρογενάσης. Σε στέλεχος αυτού του βακτηρίου διαπιστώθηκε για πρώτη φορά (1965) ότι η νιτρογενάση αποτελείται από δύο πρωτεΐνες και όχι από μία όπως θεωρείτο ως τότε (Evans & Burris, 1992). Από την πρώτη απομόνωση *Clostridium* έως σήμερα έχει χαρακτηριστεί πλήθος στελεχών *Clostridium* τα οποία έχουν την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν. Ορισμένα από αυτά είναι τα *C. aceticum, C. acetobutylicum, C. acidisoli, C. akagii, C. arcticum, C. beijerinckii, C. cellobioparum, C. butyricum, C. felsineum, C. formiaceticum, C. hungatei, C. kluyveri, C. tetanomorphum, C. thermosaccharolyticum* (αζωτοδέσμευση ακόμα και στους 60ºC) και *C. tyrobutyricum*. Πιθανώς, το εύρος της

ιδιότητας της αζωτοδέσμευσης εντός του γένους *Clostridium* να έχει υποτιμηθεί (Young, 1992, Wahlund & Madigan, 1993, Euzéby, 1997, Lovell *et al*., 2000).

Πολλοί αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα των γονιδίων που κωδικοποιούν για τη νιτρογενάση ή ομόλογα γονίδια νιτρογενάσης. Το *C. pasteurianum* έχει μία οικογένεια γονιδίων *nifH* η οποία αποτελείται από πέντε γονίδια *nifH* (Wang *et al*., 1988, Zehr *et al*., 2003). Επίσης, κατέχει εναλλακτική νιτρογενάση (ανεξάρτητη του μολυβδαινίου) (Kennedy & Bishop, 2004). Γενικά, η ομάδα γονιδίων *nif* δεν έχει το γονίδιο *nifA*, το οποίο σε άλλα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια ενεργοποιεί τη μεταγραφή των υπόλοιπων γονιδίων *nif*. Οι περιοχές του *C. pasteurianum* οι οποίες θεωρούνται ως προαγωγείς της μεταγραφής παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με αντίστοιχες περιοχές του *Escherichia coli* (Enkh-Amgalan *et al*., 2006). Είναι σαφές ότι πληροφορίες για το γονιδίωμα ενός οργανισμού δεν παρέχουν μόνο οι ακολουθίες των βάσεων αλλά και η δομή των οπερονίων. Για παράδειγμα, στο *C. acetobutylicum* φαίνεται η διαφοροποίηση στη διάταξη των γονιδίων *nif* και η απουσία ή η παρουσία τους σε σχέση με αυτήν του συμβιωτικού αζωτοδεσμευτικού βακτηρίου *Mesorhizobium loti* (Εικ. Α.8) (Zehr *et al*., 2003).



Εικ. Α.8 Σύγκριση διάταξης γονιδίων *nif* των *Mesorhizobium loti* (NC 002678) και *Clostridium acetobutylicum* (NC 003030) (Zehr *et al*., 2003).

Υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου, υπάρχει ανάγκη για σύστημα απορρόφησης το οποίο εξαρτάται από ενέργεια ώστε να διατηρηθεί ικανοποιητική συγκέντρωση NH_4^+ εντός των κυττάρων. Η ενεργή μεταφορά μετριέται, συνήθως, με συσσώρευση ραδιενεργού NH_4^+. Η παρουσία φορέων NH_4^+ έχει διαπιστωθεί σε πολλά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια καθώς και στο *C. pasteurianum* (Pedrosa & Elmerich, 2007).

Ένα άλλο ενδιαφέρον στοιχείο αποτελεί το γεγονός ότι *Clostridium* με αζωτοδεσμευτική ικανότητα έχουν εντοπιστεί ενδοφυτικά σε consortium με μη αζωτοδεσμευτικά βακτήρια σε διάφορα αγρωστώδη. Σε τέτοιου είδους consortia θεωρείται ότι η δέσμευση αζώτου υπό αναερόβιες συνθήκες υποστηρίζεται από την κατανάλωση και την εξάλειψη του οξυγόνου από τα υπόλοιπα βακτήρια του consortium (Van Dommelen & Vanderleyden, 2007). Τα consortia ευνοούν και την ανταλλαγή γονιδίων μέσω οριζόντιας μεταφοράς λόγω της συγκέντρωσης πληθυσμών βακτηρίων σε τόσο μικρό χώρο και με τόσο

στενή εξάρτηση (Raymond *et al*., 2004). Μέχρι πρόσφατα, τα στελέχη του γένους *Clostridium* δεν θεωρούνταν ως ενδοφυτικά (Kennedy *et al*., 2004). Πράγματι, η ιδιότητα της εισχώρησης αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων σε φυτά αποδιδόταν κυρίως είτε σε Gram αρνητικά αερόβια είτε σε προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Όμως, ύστερα από τη διαπίστωση της ύπαρξης *Clostridium* σε αγρωστώδη, πρέπει να αναθεωρηθεί αυτή η άποψη και τα *Clostridium* να αναγνωριστούν ως υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια με ικανότητα για ενδοφυτική αζωτοδέσμευση η οποία, ωστόσο, πρέπει να υποστηρίζεται από εξάλειψη του οξυγόνου από μη αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (Miyamoto *et al*., 2004).

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

Α.3.1.9 Φωτοσυνθετικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια

Η ικανότητα ορισμένων φωτοσυνθετικών βακτηρίων να αζωτοδεσμεύουν διαπιστώθηκε πρώτη φορά το 1949 από τους Gest και Kamen. Από τότε έως σήμερα έχει αναγνωριστεί ένας μεγάλος αριθμός φωτοσυνθετικών βακτηρίων που δεσμεύουν άζωτο τα οποία ανήκουν κυρίως στη ομάδα των πορφυρών μη θειικών βακτηρίων ενώ ορισμένα μέλη ανήκουν στις ομάδες των πορφυρών θειοβακτηρίων (*Chromatium*), των πράσινων θειοβακτηρίων (*Chlorobium*) και της οικογένειας Heliobacteriaceae (Madigan, 1995).

Για πολλά χρόνια η τυπική νιτρογενάση (Nif) θεωρείτο το μοναδικό διαθέσιμο ενζυμικό σύστημα των φωτοσυνθετικών βακτηριών με την ικανότητα της δέσμευσης αζώτου. Είναι πλέον όμως γνωστό ότι η αζωτοδέσμευση μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω εναλλακτικής νιτρογενάσης απουσία μολυβδαινίου. Η νιτρογενάση σιδήρου (Anf) έχει χαρακτηριστεί στα πορφυρά μη θειικά βακτήρια *Rhodobacter capsulatus* και *Rhodospirillum rubrum*. Επίσης, φυσιολογικές ενδείξεις για την λειτουργία της υπάρχουν και για τα *Phaeospirillum fulvum* και *Heliobacterium gestii* (Madigan, 1995).

Τα φωτοσυνθετικά πορφυρά βακτήρια επιδεικνύουν αξιοσημείωτη μεταβολική ποικιλότητα. Είναι ικανά να αναπτύσσονται τόσο φωτοτροφικά (αναερόβια/παρουσία φωτός) όσο και στο σκοτάδι είτε μέσω αναπνοής είτε μέσω ζύμωσης. Όλα τα πορφυρά μη θειικά

βακτήρια αζωτοδεσμεύουν υπό φωτοετεροτροφικές συνθήκες ωστόσο ορισμένα πορφυρά βακτήρια αζωτοδεσμεύουν και ως αυτότροφα (Moreno, 1998). Η αναερόβια δέσμευση αζώτου απουσία φωτός έχει παρατηρηθεί για πορφυρά μη θειικά βακτήρια και βακτήρια *Heliobacterium* τα οποία σε συνθήκες σκότους συνεχίζουν να δεσμεύουν άζωτο και αναπτύσσονται αργά. Αντίθετα, δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι αναερόβια δέσμευση αζώτου απουσία φωτός συμβαίνει στα πορφυρά βακτήρια, στα *Chlorobium* και τα πράσινα θειοβακτήρια. Ενώ κατά την αναερόβια αζωτοδέσμευση η νιτρογενάση είναι προφανώς ασφαλής από την επίδραση του O_2, κατά την ίδια διαδικασία σε αερόβιες συνθήκες και απουσία φωτός προκύπτει το πρόβλημα της προστασίας του ενζυμικού συμπλόκου από το O_2. Έτσι, τα φωτοσυνθετικά βακτήρια πρέπει να προμηθεύονται με επαρκή ποσότητα οξυγόνου προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αναπνοή (παραγωγή ATP) και ταυτόχρονα να εμποδίζεται η ανασταλτική δράση του οξυγόνου επί της νιτρογενάσης (Madigan, 1995).

i) *Πορφυρά μη θειικά βακτήρια*

Βάσει παλιότερων μεθόδων ταξινόμησης προκαρυωτικών οργανισμών, όλα τα πορφυρά μη θειικά βακτήρια περιλαμβάνονταν στην οικογένεια Rhodospirillaceae. Οι Madigan και συνεργάτες (1984) αναγνώρισαν 17 στελέχη τριών γενών της οικογένειας αυτής ως αζωτοδεσμευτικά. Πλέον, τα περισσότερα είτε έχουν μετονομαστεί είτε έχουν μεταφερθεί σε άλλα γένη και οικογένειες (Πίν. Α.4).

Παλιά Ταξινόμηση (Rhodospirillaceae)		Νέα Ταξινόμηση		
Rhodopseudomonas	*capsulata*	*Rhodobacter*	*capsulatus*	Rhodobacteraceae
Rhodopseudomonas	*sphaeroides*	*Rhodobacter*	*sphaeroides*	Rhodobacteraceae
Rhodopseudomonas	*gelatinosa*	*Rubrivivax*	*gelatinosus*	-
Rhodopseudomonas	*viridis*	*Blastochloris*	*viridis*	Hyphomicrobiaceae
Rhodopseudomonas	*blastica*	*Rhodobacter*	*blasticus*	Rhodobacteraceae
Rhodopseudomonas	*palustris*	*Rhodopseudomonas*	*palustris*	Bradyrhizobiaceae
Rhodopseudomonas	*acidophila*	*Rhodoblastus*	*acidophilus*	Bradyrhizobiaceae
Rhodopseudomonas	*sulphidophila*	*Rhodovulum*	*sulfidophilum*	Rhodobacteraceae
Rhodopseudomonas	*globiformis*	*Rhodopila*	*globiformis*	Acetobacteraceae
Rhodopseudomonas	*sulfoviridis*	*Blastochloris*	*sulfoviridis*	Hyphomicrobiaceae
Rhodospirillum	*rubrum*	*Rhodospirillum*	*rubrum*	Rhodospirillaceae
Rhodospirillum	*fulvum*	*Phaeospirillum*	*fulvum*	Rhodospirillaceae
Rhodospirillum	*molischianum*	*Phaeospirillum*	*molischianum*	Rhodospirillaceae
Rhodospirillum	*photometricum*	*Rhodospirillum*	*photometricum*	Rhodospirillaceae
Rhodospirillum	*salexigens*	*Rhodothalassium*	*salexigens*	Rhodobacteraceae
Rhodospirillum	*tenue*	*Rhodocyclus*	*tenuis*	Rhodocyclaceae
Rhodomicrobium	*vannielii*	*Rhodomicrobium*	*vannielii*	Hyphomicrobiaceae

Πίν. Α.4 Η παλιά και η νέα ταξινόμηση των 17 στελεχών πορφυρών μη θειικών βακτηρίων που αναφέρονται ως αζωτοδεσμευτικά φωτοσυνθετικά στελέχη στη δημοσίευση των Madigan και συνεργατών. Το *Rubrivivax gelatinosus* δεν έχει ταξινομηθεί ακόμα σε κάποια οικογένεια. (Madigan *et al.*, 1984, Euzéby, 1997: List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Last full update: February 26, 2009. URL: http://www.bacterio.net).

Η ομάδα των πορφυρών μη θειικών βακτηρίων περιλαμβάνει τα *Rhodospirillum rubrum* (τυπικό είδος της οικ. Rhodospirillaceae) και το *Rhodobacter capsulatus* (τυπικό είδος της οικ. Rhodobacteraceae) τα οποία αποτελούν τα πιο μελετημένα φωτοσυνθετικά είδη από την άποψη της αζωτοδέσμευσης (Roberts & Ludden, 1992, Euzéby, 1997). Επιπλέον, αζωτοδεσμευτικό φωτοσυνθετικό είδος αποτελεί το *Rhodocista centenaria* (πρώην *Rhodospirillum centenum*) (Hartmann & Baldani, 2006) και το *Rhodobacter azotoformans* (Hsu & Buckley, 2009). Τα παραπάνω είδη ανήκουν στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων. Αρχικά, τα πορφυρά μη θειικά βακτήρια όντας μέλη της οικογένειας Rhodospirillaceae ανήκαν όλα στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων. Έπειτα, όμως, από τη μεταφορά ορισμένων στελεχών σε νέα taxa, ορισμένα πορφυρά μη θειικά βακτήρια περιλαμβάνονται, πλέον, στην κλάση των β-Πρωτεοβακτηρίων. Ορισμένα από αυτά είναι τα *Rhodocyclus tenuis* (Rhodocyclaceae) (πρώην *Rhodospirillum tenue*), *Rhodoferax fermentans*, *Rhodoferax antarcticus* (Comamonadaceae) και το *Rubrivivax gelatinosus* (Burkholderiales) (Euzéby, 1997, Imhoff, 2006).

Το *Rba. capsulatus* αποτελεί βακτήριο μοντέλο για τα φωτοσυνθετικά είδη που αζωτοδεσμεύουν. Είναι ικανό να αναπτύσσεται παρουσία πολλών πηγών αζώτου όπως η αμμωνία, τα περισσότερα αμινοξέα, πουρίνες, ουρία, πολυαμίνες και μοριακό άζωτο (Masepohl *et al*., 2002). Όπως το *Rhodospirillum rubrum* και το *Rhodopseudomonas palustris*, έτσι και αυτό διαθέτει δύο συστήματα νιτρογενάσης, την τυπική νιτρογενάση και μία εναλλακτική νιτρογενάση σιδήρου (Anf) (Betancourt *et al*., 2008). Η αμμωνία είναι η προτιμώμενη πηγή αζώτου και η δέσμευση αζώτου εξαρτάται από τη διαθεσιμότητά της. Επιπλέον, η δέσμευση αζώτου ελέγχεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, από την παρουσία μολυβδαινίου, από το φως και το οξυγόνο (Masepohl *et al*., 2002). Το *Rba. capsulatus* είναι ικανό να αναπτύσσεται με πέντε διαφορετικούς τρόπους: φωτοαυτοτροφικά, φωτοετεροτροφικά, χημειοοργανοτροφικά μέσω αερόβιας αναπνοής, χημειοοργανοτροφικά μέσω ζύμωσης και χημειολιθοτροφικά με δότη ηλεκτρονίων το H_2 (δέκτης ηλεκτρονίων το O_2). Αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται τουλάχιστον σε τέσσερις από τις παραπάνω συνθήκες (Madigan, 1995).

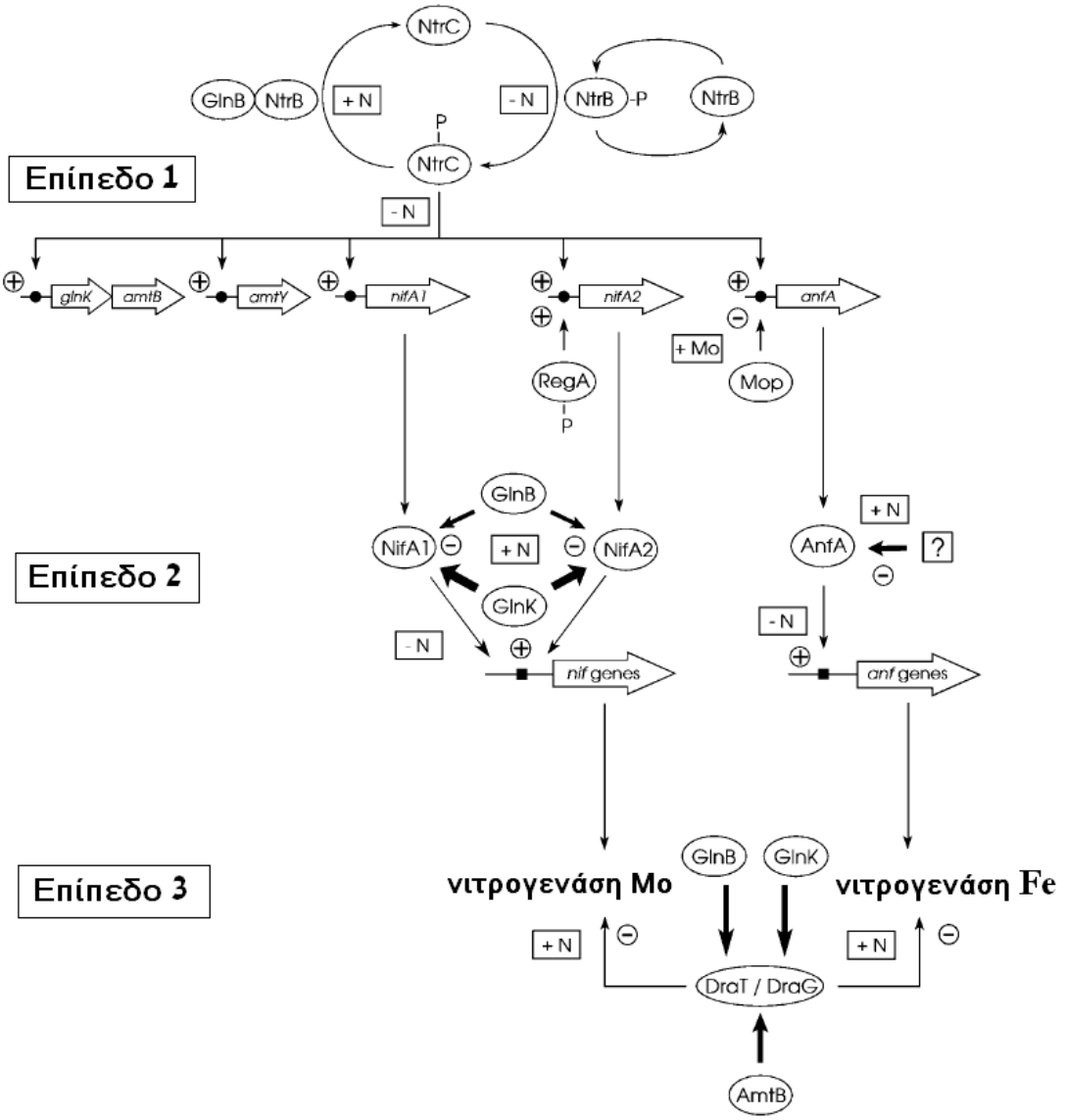
Είναι γνωστό ότι η διαδικασία της δέσμευσης αζώτου απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας και ρυθμίζεται από τη διαθεσιμότητα της αμμωνίας. Η ρύθμιση της σύνθεσης και της δραστηριότητας τόσο της τυπικής νιτρογενάσης όσο και της νιτρογενάσης σιδήρου πραγματοποιείται σε τρία επίπεδα (Εικ. Α.9). Το *Rba. capsulatus* υπολογίζει τα επίπεδα κυτταρικό άζωτο μέσω ενός συστήματος ρύθμισης αζώτου (Ntr). Υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου, ενεργοποιείται από το Ntr η μεταγραφή των ρυθμιστικών γονιδίων *nifA1*, *nifA2* και *anfA*. Επιπλέον, εκτός από την αμμωνία η μεταγραφή του *anfA* αναστέλλεται παρουσία ιχνών μολυβδαινίου μέσω των πρωτεϊνών MopA και MopB (Επίπεδο 1). Κατά το δεύτερο επίπεδο ρύθμισης, πραγματοποιείται μετα-μεταφραστική ρύθμιση των NifA και AnfA η οποία εξαρτάται επίσης από τα επίπεδα αμμωνίας. Απουσία αμμωνίας ενεργοποιείται η έκφραση όλων των υπόλοιπων γονιδίων *nif* και *anf* και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση

της νιτρογενάσης. Κατά το τρίτο επίπεδο ρύθμισης το οποίο είναι γνωστό ως 'switch-off/switch-on', η δραστηριότητα της νιτρογενάσης ελέγχεται από την αντιστρέψιμη ADP-ριβοσυλίωση της NifH και της AnF για την οποία μεσολαβούν οι DraT και DraG ως αποτέλεσμα παρουσίας αμμωνίας ή συνθηκών σκότους (Masepohl *et al*., 2002). Δηλαδή σε συνθήκες με τις οποίες δεν ευνοείται η δραστηριότητα της νιτρογενάσης, μία ομάδα ADP-ριβόζης από NAD^+ συνδέεται ομοιοπολικά με ένα κατάλοιπο αργινίνης σε μία μόνο υπομονάδα NifH και έτσι πραγματοποιείται η απενεργοποίηση της νιτρογενάσης ('switch-off'). Η διαδικασία αυτή καταλύεται από την DraT (dinitrogenase ADP-ribosyltransferase). Όταν η προστιθέμενη αμμωνία εξαλειφθεί από τον κυτταρικό μεταβολισμό, η ομάδα της ADP-ριβόζης απομακρύνεται από την αναγωγάση της νιτρογενάσης ενεργοποιώντας έτσι την DraG (dinitrogenase reductase activating glycohydrolase) και οδηγώντας στην ενεργοποίηση της νιτρογενάσης ('switch-on') (Huergo *et al*., 2006).

ii) *Πορφυρά θειοβακτήρια* (Chromatiaceae *και* Ectothiorhodospiraceae)

Η ιδιότητα της δέσμευσης αζώτου αναφέρεται για ορισμένα taxa της οικογένειας Chromatiaceae της κλάσης των γ-Πρωτεοβακτηρίων. Τα μέλη της οικογένειας Chromatiaceae είναι Gram αρνητικά, κινητά φωτοσυνθετικά βακτήρια τα οποία περιέχουν εσωτερικές φωτοσυνθετικές μεμβράνες. Ως φωτοσυνθετικές χρωστικές εντοπίζονται οι βακτηριοχλωροφύλλες *α* και *β* και ορισμένα καροτενοειδή. Εντοπίζονται κυρίως σε υδατικά περιβάλλοντα. Παρόμοια χαρακτηριστικά παρουσιάζουν και τα μέλη του γένους *Ectothiorhodospira* (Ectothiorhodospiraceae, γ-Πρωτεοβακτήρια) (Imhoff, 2005).

Το *Allochromatium vinosum* (πρώην *Chromatium vinosum*) έχει μελετηθεί εκτενώς για τις αζωτοδεσμευτικές του ικανότητες και είναι το πρώτο φωτοσυνθετικό βακτήριο στο οποίο έχουν παρατηρηθεί διαρκώς ενεργά αζωτοδεσμευτικά εκχυλίσματα άνευ κυττάρων. Σε in vivo μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι ο οργανισμός αυτός είναι εξοπλισμένος με το σύστημα 'switch-off' παρουσία αμμωνίας προκειμένου να ελέγχεται αποτελεσματικά η δραστηριότητα της νιτρογενάσης, όπως συμβαίνει και στα πορφυρά μη θειικά βακτήρια. Εκτός του *A. vinosum*, ως αζωτοδεσμευτικά τα οποία ανήκαν στο γένος *Chromatium*, αναφέρονται επίσης τα *Allochromatium minutissimum* και *Allochromatium warmingii*, *Marichromatium gracile*, *Thiocystis minor* και *Thiocystis violascens*. Άλλα μέλη της οικογένειας Chromatiaceae τα οποία αζωτοδεσμεύουν είναι τα: *Thiocapsa roseopersicina*, *Thiocapsa rosea*, *Thiocystis violacea*, *Thiococcus pfennigii* και *Lamprobacter modesohalophilus*. Τα είδη της οικογένειας Ectothiorhodospiraceae που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν άζωτο ανήκουν όλα στο γένος *Ectothiorhodospira* για το οποίο αναφέρεται ότι πιθανώς όλα τα είδη του να έχουν αυτήν την ιδιότητα. Τα είδη για τα οποία είναι επιβεβαιωμένη η αζωτοδέσμευση είναι τα *Ectothiorhodospira mobilis* (στο οποίο έχει ενσωματωθεί το *Ect. marismortui*) και *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* (στο οποίο έχει ενσωματωθεί το *Ect. vacuolata*). Από τους παραπάνω οργανισμούς ο πιο διαδεδομένος είναι, πιθανώς, το *Thiocapsa roseopersicina* (Madigan, 1995, Euzéby, 1997).



Εικ. Α.9 Μοντέλο μηχανισμού ρύθμισης της αζωτοδέσμευσης στο *Rba. capsulatus*. Παρουσιάζεται η ακολουθία ρύθμισης που ελέγχει τα γονίδια δέσμευσης αζώτου και τη δραστηριότητα της νιτρογενάσης μολυβδαινίου (Nif) και της νιτρογενάσης σιδήρου (Anf) σε σχέση με τη διαθεσιμότητα αμμωνίας. Η παρουσία μολυβδαινίου υποδεικνύεται από [+ Mo] (Masepohl *et al*., 2002).

iii) *Πράσινα θειοβακτήρια* (*οικ.* Chlorobiaceae*, φύλο* Chlorobi)

Τα πράσινα θειοβακτήρια εντοπίζονται και αυτά, κυρίως, σε υδατικά περιβάλλοντα και αναπτύσσονται φωτοσυνθετικά υπό ανοξικές συνθήκες. Οι δότες ηλεκτρονίων για τη φωτοσυνθετική αφομοίωση CO_2 είναι είτε ανηγμένες θειώδεις ενώσεις είτε μοριακό υδρογόνο. Είναι αυστηρά αναερόβια, υποχρεωτικά φωτοτροφικά και ικανά για

φωτολιθοαυτοτροφική ανάπτυξη με ενώσεις που περιέχουν θείο ως δότη ηλεκτρονίων (Overmann, 2005). Τα πράσινα θειοβακτήρια διαθέτουν, όπως και τα πορφυρά βακτήρια, το σύστημα 'switch-off' παρουσία αμμωνίας για τη ρύθμιση της δραστηριότητας της νιτρογενάσης, το οποίο είναι αντιστρέψιμο. Ορισμένα από τα είδη τα οποία έχει βρεθεί ότι αζωτοδεσμεύουν είναι τα εξής: *Chlorobium phaeobacteroides*, *Chl. limicola*, *Chl. limicola* f. sp. *thiosulfatophilum*, *Chl. luteolum*, *Chl. clathratiforme*, *Prosthecochloris aestaurii*, *Chlorobaculum tepidum* και *Chloroherpeton thalassium* (Madigan, 1995, Euzéby, 1997, Overmann, 2005).

Το θερμόφιλο πράσινο θειοβακτήριο *Chlorobaculum tepidum* (πρώην *Chlorobium tepidum*) επιδεικνύει εξαιρετικές αζωτοδεσμευτικές ικανότητες και ο χρόνος που απαιτείται για μία γενιά παρουσία αμμωνίας είναι μόλις δύο ώρες (Madigan, 1995). Δεσμεύει άζωτο σε πολύ μεγάλες θερμοκρασίες ως 60ºC αλλά η βέλτιστη θερμοκρασία για δραστηριότητα νιτρογενάσης είναι 48ºC (Wahlund & Madigan, 1993). Επίσης, σε δημοσιεύσεις για το *Chl. limicola* αναφέρεται υψηλή δραστηριότητα νιτρογενάσης in vivo ενώ όταν πηγή αζώτου είναι το γλουταμικό παρατηρείται αναστολή της νιτρογενάσης και δεν φωτοπαράγεται H_2 (Madigan, 1995).

iv) *Πράσινα μη θειικά βακτήρια*

Αν και τα πράσινα μη θειικά βακτήρια έχουν φαινοτυπικές ομοιότητες με τα πράσινα θειοβακτήρια και παράγουν και αυτά χλωροσώματα, δεν έχουν στενή φυλογενετική σχέση με τα πράσινα θειοβακτήρια. Η αζωτοδέσμευση δεν είναι διαδεδομένη στο φύλο Chloroflexi και διαπιστωμένη αζωτοδέσμευση υπάρχει μόνο για το *Oscillochloris trichoides* (Oscillocloridaceae) ενώ ενδείξεις για δραστηριότητα νιτρογενάσης υπάρχουν για το *Chloroflexus aurantiacus* ("Chloroflexaceae") (Madigan, 1995).

v) Heliobacteriaceae *(ηλιοβακτήρια)*

Τα ηλιοβακτήρια περιλαμβάνουν τέσσερα γένη των οποίων τα στελέχη είναι όλα αζωτοδεσμευτικά. Πρόκειται για αυστηρώς αναερόβια βακτήρια γνωστά ως οι μοναδικοί φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που ανήκουν στα ενδοσποριογονικά Gram θετικά βακτήρια χαμηλού ποσοστού G+C. Αυτά τα βακτήρια αναπτύσσονται, κυρίως, σε εδάφη ορυζώνων ενώ έχουν απομονωθεί και από θερμές πηγές και λίμνες. Έχουν εξαιρετική απόδοση δέσμευσης αζώτου και θεωρείται ότι συμβάλλουν πάρα πολύ (αν όχι το περισσότερο) στον εφοδιασμό των ορυζώνων με άζωτο (Enkh-Amgalan *et al*., 2006). Τα είδη ηλιοβακτηρίων είναι τα εξής: *Heliobacterium chlorum*, *Hbt. gestii*, *Hbt. modesticaldum*, *Heliobacillus mobilis*, *Heliophilum fasciatum* και *Heliorestis daurensis*.

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

είδους των ηλιοβακτηρίων, του *Hbt. chlorum*. Η ομάδα αποτελείται από έντεκα γονίδια με τον ίδιο προσανατολισμό εντός μιας περιοχής 10kb και παρουσιάζει ομοιότητες με άλλους αυστηρά αναερόβιους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς (Enkh-Amgalan *et al*., 2006). Η αζωτοδέσμευση στα ηλιοβακτήρια ρυθμίζεται επιπρόσθετα από το σύστημα 'switch-off' παρουσία αμμωνίας (Leigh, 2000).

Εκτός από τις μοναδικές φωτοσυνθετικές ιδιότητες τους, τα ηλιοβακτήρια έχουν αρκετές διαφορές από άλλους αναερόβιους ανοξικούς φωτότροφους οργανισμούς. Όσον αφορά στον μεταβολισμού άνθρακα, τα ηλιοβακτήρια είναι υποχρεωτικά ετερότροφα. Αναπτύσσονται είτε φωτοετεροτροφικά (ανοξικά παρουσία φωτός) σε ορισμένα οργανικά υποστρώματα είτε μέσω ζύμωσης πυρουβικού σε σκότος. Η αυτότροφη ανάπτυξη, η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό των φωτοσυνθετικών οργανισμών, δεν έχει παρατηρηθεί σε καμία καλλιέργεια ηλιοβακτηρίων ως τώρα. Τέλος, τα ηλιοβακτήρια είναι τα μοναδικά βακτήρια του φύλου Firmicutes που ταυτόχρονα φωτοσυνθέτουν και παράγουν ενδοσπόρια (Matthew Sattley *et al*., 2008).

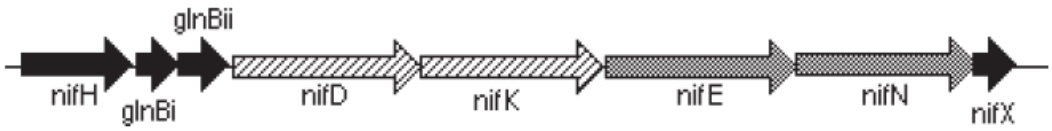
Α.3.1.10 Archaea (αρχαιοβακτήρια)

Από την επικράτεια των αρχαιοβακτηρίων μόνο ορισμένα μεθανογόνα έχουν αναγνωριστεί ως αζωτοδεσμευτικά. Βακτήρια με την ικανότητα να παράγουν μεθάνιο περιγράφηκαν για πρώτη φορά στις αρχές του εικοστού αιώνα (Lobo & Zinder, 1992). Πέρασαν, όμως, πολλά χρόνια μέχρι να ανακαλυφθεί το 1984 ότι ορισμένα από αυτά είναι ικανά να δεσμεύουν άζωτο (Kessler *et al.*, 1997). Τα μεθανογόνα βακτήρια από φυσιολογική άποψη αποτελούν μία ομογενή ομάδα αυστηρώς αναερόβιων οργανισμών που παράγουν μεθάνιο χρησιμοποιώντας ορισμένα απλά υποστρώματα. Σχεδόν όλα τα μεθανογόνα μπορούν να χρησιμοποιήσουν H_2-CO_2 και τα περισσότερα μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιήσουν μυρμηγκικό ως δότη ηλεκτρονίων για την αναγωγή CO_2. Εντοπίζονται σε ποικίλα ανοξικά περιβάλλοντα, όπως ιζήματα, πλημμυρισμένα εδάφη, γαστροεντερικές οδοί ζώων, αναερόβιοι βιοαντιδραστήρες και γεωθερμικές πηγές (Lobo & Zinder, 1992).

Τα μεθανογόνα βακτήρια ανήκουν στο φύλο Euryarchaeota και παρουσιάζουν συγγένεια με βακτήρια του ίδιου φύλο όπως βακτήρια της κλάσης Halobacteria και ορισμένα θερμόφιλα είδη τα οποία, όμως, δεν αζωτοδεσμεύουν. Στην τάξη Methanococcales έχει βρεθεί ότι αζωτοδεσμεύει το *Methanococcus maripaludis* και το *Methanothermococcus thermolithotrophicus* (πρώην *Methanococcus thermolithotrophicus*). Τα *Methanococcus voltae* και *Methanocaldococcus jannaschii* (πρώην *Methanococcus jannaschii*) παρόλο που έχουν *nif* ομόλογες ακολουθίες, δεν δεσμεύουν άζωτο. Η τάξη Methanomicrobiales περιλαμβάνει το αζωτοδεσμευτικό *Methanospirillum hungatei*, η τάξη Methanosarcinales το *Methanosarcina barkeri* και η τάξη Methanobacteriales το *Methanobacterium bryantii* (Leigh, 2000). Αναφέρεται, επίσης, ανάλυση του γονιδίου *nifD* για τα *Methanothermobacter*

thermautotrophicus, Methanosarcina acetivorans και *Methanosarcina mazei* (Henson *et al*., 2004).

Η νιτρογενάση των αρχαιοβακτηρίων (αρχαία) παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με αυτήν των ευβακτηρίων και ορισμένα ευρήματα στη δομή των οπερονίων τους φανερώνει την εξελικτική τους σχέση. Όμως, παρουσιάζουν και κάποιες διαφορές όπως το γεγονός ότι η αναγωγάση της νιτρογενάσης (NifH) είναι ομοτετραμερές και όχι ομοδιμερές (Leigh, 2000). Μία άλλη σημαντική διαφορά εντοπίζεται στην οργάνωση των έξι γονιδίων *nif* κατά την οποία τα γονίδια αυτά είναι συγκεντρωμένα σε ένα οπερόνιο και ανάμεσα στο *nifH* και τα άλλα *nif* παρεμβάλλονται δύο γονίδια *glbBi* και *glnBii* τα οποία κωδικοποιούν για τη ρυθμιστική πρωτεΐνη P_{II} (Εικ. Α.10). Επίσης, η μεταγραφή των γονιδίων *nif* πραγματοποιείται από προαγωγείς οι οποίοι είναι τυπικοί των αρχαίων και δεν παρουσιάζουν ομοιότητες με αυτούς των ευβακτηρίων (Kessler *et al*., 1998). Όπως και στα ευβακτήρια, η νιτρογενάση που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση αζώτου στα αρχαία θεωρείτο ότι ήταν μόνο η τυπική νιτρογενάση (Nif). Σχετικά πρόσφατα, όμως, αποκαλύφθηκε η παρουσία και της εναλλακτικής νιτρογενάσης βαναδίου (Vnf) στο στέλεχος *Methanosarcina barkeri* 227. Για τα γονίδια $nifH_1$ και $nifH_2$ τα οποία είχαν αναγνωριστεί στο οπερόνιό του-όπως και σε αυτό των άλλων μεθανογόνων- προτάθηκε η μετονομασία τους σε *nif* και *vnf*, αντίστοιχα (Chien *et al*., 2000). Εναλλακτική νιτρογενάση αναφέρεται επίσης για το *Methanosarcina acetivorans* (Betancourt *et al*., 2008). Η ρύθμιση της μεταγραφής δεν είναι όμοια με αυτήν των περισσότερων Πρωτεοβακτηρίων δηλαδή δεν αφορά ρύθμιση του γονιδίου *nifA*. Η ρύθμιση της μεταγραφής στο *M. maripaludis* πραγματοποιείται μέσω καταστολής (Leigh, 2000). Όσον αφορά στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της αζωτοδέσμευσης, το σύστημα ρύθμισης 'switch-off' παρουσία αμμωνίας το οποίο υπάρχει στο *A. brasilense*, στο *Rhodospiillum rubrum* και στα ηλιοβακτήρια είναι παρόν και στα αζωτοδεσμευτικά αρχαία. Όμως, στα μεθανογόνα βακτήρια δε φαίνεται να εμπλέκεται ADP-ριβοσυλίωση όπως συμβαίνει στα ευβακτήρια (Leigh, 2000, Enkh-Amgalan *et al*., 2006).



Εικ. Α.10 Οργάνωση οπερονίου *nif* του *Methanococcus maripaludis* (Leigh, 2000).

Α.3.1.11 Θειοαναγωγικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια

Τα θειοαναγωγικά βακτήρια είναι μικροοργανισμοί οι οποίοι ανάγουν θειικά ιόντα (SO_4^{2-}) προς θειούχα (S^{2-}). Τα βακτήρια αυτά έχουν ιδιαίτερη περιβαλλοντική σημασία και δεν αποτελούν παθογόνα του ανθρώπου. Πρόκειται για αυστηρώς αναερόβια βακτήρια τα οποία εντοπίζονται κυρίως σε λιμνάζοντα ύδατα και ιζήματα θαλάσσιων περιοχών καθώς και σε μολυσμένα περιβάλλοντα (Gibson, 1990). Τα θειοαναγωγικά βακτήρια που παρουσιάζουν αζωτοδεσμευτικές ιδιότητες ανήκουν σε δύο κλάσεις: τα δ-Πρωτεοβακτήρια και την κλάση Firmicutes (πρώην Gram θετικά χαμηλού ποσοστού G+C). Τα θειοαναγωγικά βακτήρια που ανήκουν στην κλάση δ-Πρωτεοβακτήρια και παρουσιάζουν δραστηριότητα νιτρογενάσης είναι τα *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio salexigens*, *Desulfovibrio gigas*, *Desulfobacter latus*, *Desulfobater curvatus*, *Desulfomicrobium baculatum*, *Desulfonema limicola*. Από τα παραπάνω, το *Desulfovibrio gigas* έχει απομονωθεί από ριζόσφαιρα ρυζιού ενώ το *Desulfonema limicola* από ρίζες παραθαλάσσιων τροπικών δέντρων. Τα θειοαναγωγικά βακτήρια που ανήκουν στην κλάση Firmicutes (τάξη Clostridiales) και παρουσιάζουν δραστηριότητα νιτρογενάσης είναι τα *Desulfotomaculum reducens* και *Desulfosporosinus orientis* (Lovell *et al*., 2000, Zehr *et al*., 2003, Flores-Mireles *et al*., 2007, Sarita *et al*., 2008). Αξίζει να αναφερθεί ότι τα *Desulfosporosinus orientis* και *Desulfotomaculum reducens* αν και ανήκουν στα Firmicutes είναι Gram αρνητικά (Spring & Rosenzweig, 2006, Widdel, 2006).

Α.3.1.12 Μεθανοτροφικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια

Τα μεθανοτροφικά βακτήρια είναι μία ομάδα οργανισμών που κατέχουν έναν υψηλά εξειδικευμένο μεταβολισμό περιορισμένο στο να καταβολίζει μόνο μεθάνιο και μεθανόλη. Είναι εξ ορισμού υποχρεωτικά μεθυλοτροφικοί οργανισμοί και δεν έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσονται σε υποστρώματα οργανικών ενώσεων με δεσμούς C-C. Περιβάλλοντα στα οποία η παρουσία μεθανοτροφικών βακτηρίων είναι κοινή περιλαμβάνουν ορυζώνες, λασπώδη έλη, ιζήματα γλυκών υδάτων, εδάφη λειμώνων και φυλλοβόλων δασών ενώ σε γενικές γραμμές δεν έχουν απομονωθεί από ακραία περιβάλλοντα όπως είναι τα υπεραλκαλικά (Bowman, 2006).

Τα μεθανοτροφικά βακτήρια χωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες, την I και II. Η ομάδα I χωρίζεται επιπλέον σε δύο ομάδες την τύπου I και τύπου X. Οι ομάδες I και X ανήκουν στα γ-Πρωτεοβακτήρια και τα βακτήριά της είναι όλα μέλη της οικογένειας Methylococcaceae. Η ομάδα II περιλαμβάνει βακτήρια της οικογένειας Methylocystaceae η οποία ανήκει όμως στα α-Πρωτεοβακτήρια. Αζωτοδεσμευτικά μεθανοτροφικά βακτήρια εντοπίζονται σε όλα τα μέλη της ομάδας II και σε ορισμένα της ομάδας I. Συγκεκριμένα, στην ομάδα II δέσμευση αζώτου επιδεικνύουν τα δύο γένη της οικογένειας Methylocystaceae, το *Methylosinus* και το *Methylocystis*. Στην οικογένεια Methylococcaceae (ομάδα I και X) αζωτοδέσμευση παρατηρείται στα γένη *Methylococcus*,

Methylosphaera και σε ορισμένα είδη του *Methylomonas* (*M. fodinarum*, *M. aurantiaca* και *M. methanica*-ορισμένα στελέχη) (Bowman, 2005, Bowman, 2006).

A.3.1.13 *Vibrio*

Το γένος *Vibrio* (γ-Πρωτεοβακτήρια) είναι ένα πολυμελές γένος που αποτελείται από μικρά ευθέα ή κυρτά Gram αρνητικά ραβδία με μονά ή πολλαπλά πολικά μαστίγια και σε στερεά μέσα ορισμένα είδη αναπτύσσουν και πλευρικά. Προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί, με δυνατότητα μεταβολισμού με ζύμωση ή αναπνοή που απαντούν κυρίως σε ύδατα ανάλογα με τη συγκέντρωση Na^+, τα διαθέσιμα θρεπτικά στοιχεία και τη θερμοκρασία. Δώδεκα από τα είδη *Vibrio* αποτελούν κλινικές απομονώσεις και τα έντεκα αντιπροσωπεύουν σημαντικά παθογόνα του ανθρώπου όπως το *Vibrio cholerae* (τυπικό είδος), που προκαλεί την ασθένεια χολέρα (Farmer *et al*., 2005).

Λίγα μόνο είδη του γένους *Vibrio* έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν άζωτο από την ατμόσφαιρα. Αυτά είναι τα *Vibrio diazotrophicus*, *Vibrio natriegens*, *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio pelagius* (έχει προταθεί το όνομα *Listonella pelagia*) (Urdaci *et al*., 1988, Farmer *et al*., 2005), *V. campbellii* (Holguin *et al*., 1992), *Vibrio porteresiae* (Rameshkumar *et al*., 2008) και *Vibrio parahaemolyticus* (Criminger *et al*., 2007). Τα *V. parahaemolyticus* και *V. cincinnatiensis* αποτελούν κλινικά δείγματα.

A.3.1.14 *Magnetospirillum* και *Geobacter*

Ορισμένα μέλη των μεταλλοαναγωγικών βακτηρίων *Magnetospirillum* (Rhodospirillaceae, α-Πρωτεοβακτήρια) και *Geobacter* (Geobacteraceae, δ-Πρωτεοβακτήρια) είναι ικανά να δεσμεύουν άζωτο. Τα βακτήρια αυτά έχουν σημαντική θέση σε ιζηματογενή περιβάλλοντα. Τα περιβάλλοντα αυτά περιλαμβάνουν όρια οξικών-ανοξικών νερών εκβολών ποταμών και αλατούχα έλη, όπου μαγνητοτακτικά βακτήρια είναι κοινά, καθώς και εδαφικά διαλύματα μολυσμένα με πετρελαϊκά παράγωγα, όπου βακτήρια αναγωγής τρισθενούς σιδήρου είναι πολύ σημαντικά στην αποδόμηση αρωματικών υδρογονανθράκων (Bazylinski *et al*., 2000).

Το είδος *Magnetospirillum magnetotacticum* ήταν γνωστό ως *Aquaspirillum magnetotacticum* και είναι ικανό να δεσμεύει ατμοσφαιρικό άζωτο. Το έτερο είδος του γένους , το *Magnetospirillum gryphiswaldense* είναι επίσης αζωτοδεσμευτικό. Το γένος παρουσιάζει συγγένεια με τα *Rhodospirillum* και, πιθανώς, να έχουν ομόλογα *nifHDK*. Τα αναερόβια *Geobacter metallireducens* και *Geobacter sulfurreducens* είναι, επίσης, αζωτοδεσμευτικά και αποτελούν μοντέλα για την έρευνα αναγωγής τρισθενούς σιδήρου σε ιζηματογενή περιβάλλοντα (Bazylinski *et al*., 2000, Methé *et al*., 2005). Η αζωτοδεσμευτική ικανότητα των *Magnetospirillum* και *Geobacter* πιθανώς να έχει σημαντικό ρόλο σε βιογεοχημικές διαδικασίες όπως η παραγωγή Fe_3O_4 (μαγνητίτης) και Fe_3S_4 και η οξείδωση οργανικής ύλης σε συνδυασμό με αναγωγή τρισθενούς σιδήρου και τετρασθενούς ουρανίου

ή άλλων μετάλλων, σε περιβάλλοντα πτωχά σε άζωτο. Για παράδειγμα, σε υδροφόρους ορίζοντες μολυσμένους με πετρελαϊκά παράγωγα δεν παρατηρείται ανηγμένο άζωτο οπότε δεν ευνοείται και η ανάπτυξη βακτηρίων. Η παρουσία (ως 80%) όμως στελεχών *Geobacter* σε τέτοια περιβάλλοντα υποδεικνύει ότι αυτά τα βακτήρια έχουν αποκτήσει το πλεονέκτημα της αζωτοδέσμευσης και μπορούν να ανταγωνιστούν ικανοποιητικά άλλα μεταλλοαναγωγικά είδη που δεν αζωτοδεσμεύουν σε αυτές τις συνθήκες (όπως είναι τα *Shewanella oneidensis* και *Geothrix fermentans*) (Holmes *et* al., 2004, Methé *et al*., 2005). Αυτό μπορεί να ισχύει και για την περίπτωση των μαγνητοτακτικών βακτηρίων τα οποία αποκτούν πλεονέκτημα σε όρια οξικών-ανοξικών περιβαλλόντων και είναι οι κυρίαρχοι οργανισμοί λόγω του επιτυχούς ανταγωνισμού για άζωτο και άλλα στοιχεία (Bazylinski *et al*., 2000).

A.3.1.15 *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*)

Το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Thiobacillus ferrooxidans* σχετικά πρόσφατα μεταφέρθηκε στο γένος *Acidithiobacillus* με νέα ονομασία *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Πριν από αυτό το γεγονός, τα μέλη του γένους *Thiobacillus* ταξινομούνταν ως α-, β- ή γ-Πρωτεοβακτήρια όμως με τη βοήθεια μοριακών αναλύσεων βάσει του γονιδίου 16S rRNA διαπιστώθηκε ότι το *Acidithiobacillus ferrooxidans* ανήκει στα γ-Πρωτεοβακτήρια (Kelly & Wood, 2000). Πρόκειται για υποχρεωτικά οξύφιλα και αερόβια, Gram αρνητικά ραβδία κινητά με πολικό μονό μαστίγιο. Αναπτύσσεται σε pH από 1,3-4,5 (άριστο 2,5). Είναι αυτοτροφικό και υπό συνθήκες έλλειψης CO_2 είναι υποχρεωτικά χημειολιθοαυτοτροφικό (Kelly & Wood, 2005). Εξασφαλίζει τον απαιτούμενο άνθρακα μέσω δέσμευσης ατμοσφαιρικού CO_2 και η απαιτούμενη ενέργεια προέρχεται είτε από οξείδωση δισθενούς σιδήρου προς τρισθενή είτε από οξείδωση ανηγμένων θειούχων ενώσεων προς θειικό οξύ (Pretorius *et al*., 1987).

Η πρώτη αναφορά περί ικανότητας αζωτοδέσμευσης του *Acidithiobacillus ferrooxidans* εντοπίζεται το 1978 και η πρώτη αλληλούχηση γονίδιων *nif* έγινε το 1987 (Pretorius *et al*., 1987). Έχει απομονωθεί από πολλά περιβάλλοντα παγκοσμίως, όπου διατίθενται σίδηρος και θείο προς οξείδωση και, κυρίως, από όξινα στραγγιζόμενα νερά μεταλλωρυχείων και ανθρακωρυχείων, τα οποία έχουν εγκαταλειφθεί (Εικ. Α.11 [Α]). Λόγω των ακραίων συνθηκών που απαιτεί για την ανάπτυξή του, το *Acidithiobacillus ferrooxidans* δεν έχει μεγάλη σημασία για την γεωργία. Αντίθετα, βρίσκει ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται σε ανάκτηση μετάλλων κυρίως από υδατικά διαλύματα στον τομέα της μεταλλουργίας. Η τεχνική αυτή ονομάζεται βιοεκχύλιση (bioleaching/biomining) και ευθύνεται για το 10% της παραγωγής χαλκού παγκοσμίως (Εικ. Α.11 [Β]). Η βιοεκχύλιση είναι μέρος της επιστήμης της βιοϋδρομεταλλουργίας και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάκτηση και άλλων μετάλλων όπως μολυβδαινίου, ψευδαργύρου κ.ά. Η αζωτοδέσμευση είναι γνωστό ότι είναι μία ενεργοβόρος διαδικασία. Γι’

αυτόν τον λόγο, πρέπει να γίνουν κατανοητές οι διαδικασίες και η φυσιολογία της αζωτοδέσμευσης στο *A. ferrooxidans* προκειμένου να διευκρινιστεί κατά πόσο εμποδίζει και ανταγωνίζεται η δέσμευση ατμοσφαιρικού αζώτου την βιοεκχύλιση (Valdés *et al*., 2008). Έως σήμερα, τα μόνα οξύφιλα βακτήρια που έχει βρεθεί ότι αζωτοδεσμεύουν είναι το *A. ferrooxidans*, το *Leptospirillum ferrooxidans* και το *Leptospirillum ferrodiazotrophum* (κλάση [Nitrospira]) (Tyson *et al*., 2005).

Εικ. Α.11 Α. Όξινα στραγγιζόμενα νερά προερχόμενα από πυριτικά μεταλλεύματα εγκαταλειμμένου ορυχείου προ-ρωμαϊκής εποχής (Rio Tinto, Ισπανία), Β. Εμπορική εφαρμογή βιοεκχύλισης σε σωρό για ανάκτηση χαλκού (Valdés *et al*., 2008).

Α.3.1.16 Άλλοι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί

Υπάρχουν ορισμένα βακτήρια τα οποία παρουσιάζουν την ιδιότητα τα αζωτοδέσμευσης αλλά δεν υπάρχουν αρκετές δημοσιεύσεις είτε δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη σημασία για τη γεωργία.

- *Trichodesmium thiebautii* (Lovell *et al*., 2000) (ταξινομικά ανήκει στο γένος *Oscillatoria*, Κυανοβακτήρια).
- *Zymomonas* sp. (Sphingomonadales, α-Πρωτεοβακτήρια) (Schmid & Hartmann, 2007).
- *Sphingomonas azotifigens* (Sphingomonadales, α-Πρωτεοβακτήρια) απομονωμένο από ρύζι. Η ονομασία *Rhizomonas* δεν είναι αποδεκτή και τα είδη έχουν μεταφερθεί στο γένος *Sphingomonas* (Euzéby, 1997, Xie & Yokota, 2006).
- *Ideonella* (Burkholderiales, β-Πρωτεοβακτήρια) (Schmid & Hartmann, 2007).
- *Beggiatoa* (Thiotrichaceae, γ-Πρωτεοβακτήρια) (Nelson *et al*., 1982).
- *Pelomonas saccharophila* (πρώην *Pseudomonas saccharophila*) (Xie & Yokota, 2005b).

Α.3.2 ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΑ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Ο όρος 'ενδοφυτικός οργανισμός' χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1866 και αναφερόταν σε μύκητες που αναπτύσσονταν στο εσωτερικό φυτικών ιστών. Αργότερα, η χρήση του όρου επεκτάθηκε και στα βακτήρια ενώ στο πεδίο της βιολογικής δέσμευσης αζώτου αναφέρεται για πρώτη φορά από τη Döbereiner για έρευνα σε αγρωστώδη το 1992 (Baldani & Baldani, 2005).

Ως ενδοφυτικά βακτήρια αναφέρονται τα βακτήρια τα οποία είναι ικανά σε κάποια φάση της ανάπτυξής τους να αποικίσουν το εσωτερικό των φυτών χωρίς να προκαλέσουν ορατή βλάβη (Baldani & Baldani, 2005). Πρακτικά, είναι τα βακτήρια τα οποία μπορούν να απομονωθούν από φυτικούς ιστούς οι οποίοι έχουν απολυμανθεί εξωτερικά. Παραδοσιακά, οι ενδοφυτικοί οργανισμοί διακρίνονται σε υποχρεωτικά ενδοφυτικούς και σε προαιρετικά ενδοφυτικούς. Οι υποχρεωτικά ενδοφυτικοί οργανισμοί εντοπίζονται αυστηρά στο εσωτερικό των φυτών και σε καμία φάση δεν εντοπίζονται εκτός φυτού εκτός από περιπτώσεις μετάδοσης από φυτό σε φυτό ή από φυτό σε έντομο και κατόπιν πάλι σε φυτό. Οι προαιρετικά ενδοφυτικοί οργανισμοί είναι δυνατό να αναπτύσσονται εντός του φυτού ή σε άλλα περιβάλλοντα. Ο κύκλος ζωής των προαιρετικά ενδοφυτικών βακηρίων μπορεί να χαρακτηριστεί διφασικός και εναλλάσσεται μεταξύ φυτών και εδάφους. Συνήθως, αυτά τα βακτήρια προέρχονται από το έδαφος και εισέρχονται στο φυτό μέσω των σημείων έκπτυξης πλάγιων ριζικών τριχιδίων και πολλαπλασιάζονται διασυστηματικά (Hardoim *et al*., 2008). Στην περίπτωση του *Azoarcus*, σημαντικό ρόλο στην αποίκιση της επιφάνειας της ρίζας έχουν τα τριχίδια (pili) τύπου IV ενώ στη διασυστηματική εξάπλωση εμπλέκονται υδρολυτικά ένζυμα τα οποία υποβοηθούν τη διείσδυση στους ιστούς (Franche *et al*, 2008). Επιπλέον, χρησιμοποιείται αλλά όχι ευρέως ο όρος διερχόμενα (passenger) ενδοφυτικά βακτήρια ο οποίος αναφέρεται σε βακτήρια τα οποία εισέρχονται στο φυτό συμπτωματικά και απουσία επιλεκτικών δυνάμεων διατηρούνται εκεί (Hardoim *et al*., 2008).

Πρόσφατα, προτάθηκε ο όρος ανταγωνιστικά (competent) ενδοφυτικά βακτήρια ο οποίος αναφέρεται σε οργανισμούς οι οποίοι αποικίζουν επιτυχώς το φυτό εισβάλλοντας ενεργά στον φυτικό ιστό και έχουν την ικανότητα να διαμορφώνουν τη φυσιολογία του και οι οποίοι επιλέγονται 'μεροληπτικά' οδηγώντας σε διατήρηση της σχέσης φυτού-μικροβίου ώστε να αποβαίνει ευεργετική. Ο όρος αυτός διαφέρει από τον όρο 'ευκαιριακά' ή 'οπορτουνιστικά' βακτήρια τα οποία είναι ανταγωνιστικά ριζοσφαιρικά βακτήρια τα οποία είναι δυνατό να εισχωρήσουν στο φυτό συμπτωματικά αλλά δε διαθέτουν γονίδια τα οποία να εγγυώνται την επιτυχία της σχέσης φυτού-βακτηρίου (Hardoim *et al*., 2008). Τα πιο μελετημένα ενδοφυτικά βακτήρια ανήκουν στα γένη *Gluconacetobacter*, *Azarcus* και *Herbaspirillum* (Franche *et al*, 2008).

Α.3.2.1 *Gluconacetobacter*

Το είδος *Gluconacetobacter diazotrophicus* είναι το πιο σημαντικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο της οικογένειας Acetobacteraceae. Αρχικά, απομονώθηκε από ιστούς ρίζας, βλαστού και φύλλων σακχαροκάλαμου και του είχε δοθεί η ονομασία *Acetobacter diazotrophicus* αλλά έπειτα από μοριακές αναλύσεις του γονιδίου 16S rRNA τοποθετήθηκε στο γένος *Gluconacetobacter*. Το *G. diazotrophicus* έχει επίσης απομονωθεί από γλυκοπατάτα (*Ipomoea batatas*), φυτά καφέ, φυτά ανανά, τα αγρωστώδη *Eleusine coracana* και *Pennisetum purpureum*, ρίζες τσαγιού, καρπούς μάνγκο, ριζόσφαιρα, μπανανιάς και από ορυζώνες. Έχει επίσης απομονωθεί από τον ψευδόκοκκο (*Saccharococcus sacchari*) που προσβάλλει το σακχαροκάλαμο και από ενδότροφη μυκόρριζα. Το γένος *Gluconacetobacter* περιλαμβάνει δύο αζωτοδεσμευτικά είδη, απομονωμένα από φυτά καφέ, το *G. azotocaptans* και *G. johannae* με το τελευταίο να έχει ονομαστεί έτσι προς τιμήν της Johanna Döbereiner. Πρόσφατα, το *G. azotocaptans* απομονώθηκε από ριζόσφαιρα καλαμποκιού. Το τέταρτο αζωτοδεσμευτικό είδος του γένους είναι το *Gluconacetobacter kombuchae* (Baldani & Baldani, 2005, Pedraza, 2007, Saravanan *et al*., 2008).

Το *G. diazotrophicus* αποτελεί βακτήριο μοντέλο των ενδοφυτικών μικροοργανισμών με σκοπό την αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ βακτηρίων-μη ψυχανθών φυτών (Saravanan *et al*., 2008). Αναφέρεται ως υποχρεωτικά ενδοφυτικό βακτήριο ενώ αναφέρεται και ως οπορτουνιστικό ενδοφυτικό βακτήριο (Muthukumarasamy *et al*., 2002). Όμως, σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, το *G. diazotrophicus* έχει απομονωθεί και από τη ριζόσφαιρα ορισμένων φυτών όπως το *Eleusine coracana* και φυτά καφέ, τσαγιού και μπανάνας. Ο χαρακτηρισμός του βακτηρίου ως ενδοφυτικό δικαιολογείται είτε από την αδυναμία απομόνωσής του από το έδαφος είτε από την αδυναμία επιβίωσής του στο έδαφος. Πιθανώς, η απάντηση για αυτό το φαινόμενο να βρίσκεται σε άλλα δύο αζωτοδεσμευτικά είδη του *Gluconacetobacter*, τα *G. azotocaptans* και *G. johannae*, τα οποία έχουν απομονωθεί μόνο από ριζόσφαιρα φυτών και δεν έχουν επιδείξει ενδοφυτική δράση (Πίν. Α.5). Ορισμένοι παράγοντες οι οποίοι να αιτιολογούν την δυνατότητα επιβίωσης του *G. diazotrophicus* στη ριζόσφαιρα είναι: α) εμπλουτισμός της ριζόσφαιρας σακχαροκάλαμου με σακχαρόζη, β) η υψηλή οργανική ουσία των εδαφών που αναπτύσσονται φυτά καφέ και γ) οι ποσότητες φωσφόρου στην οργανική ουσία εδάφους ορυζώνων. Άλλοι παράγοντες μπορεί να αφορούν αυξημένη εδαφική υγρασία (>35%) και τη δυνατότητα εκμετάλλευσης συγκεκριμένων απλών οργανικών οξέων, τα οποία είναι διαθέσιμα στο έδαφος μέσω αποδόμησης της οργανική ύλης. Επιπροσθέτως, η παρουσία συγκεκριμένων κυτταρολυτικών ενζύμων όπως η ενδογλυκανάση, η ενδοξυλογλυκανάση και η ενδοπολυμεθυλογαλακτορουνάση εγείρουν την υπόθεση ότι τα ένζυμα αυτά βοηθούν το *G. diazotrophicus* να ανταγωνιστεί επιτυχώς άλλους μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας και να αποικίσει αποτελεσματικά τους εσωτερικούς ιστούς των φυτών.

Το *G. diazotrophicus* είναι Gram αρνητικό, υποχρεωτικά αερόβιο βακτήριο το οποίο παρουσιάζει αντοχή σε χαμηλό pH και ανήκει στην κλάση α-Πρωτεοβακτήρια (τάξη

Rhodospirillales) (Saravanan *et al*., 2008). Τα κύτταρα είναι ευθέα ραβδία με στρογγυλά άκρα τα οποία στο μικροσκόπιο παρατηρούνται μεμονωμένα, σε ζεύγη είτε σε αλυσιδωτές δομές. Ο πληθυσμός του σε ιστούς σακχαροκάλαμου κυμαίνεται από 10^6-10^7 κύτταρα/g νωπού ιστού. Έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε πολύ χαμηλό pH (3,0) με την άριστη τιμή pH για ανάπτυξη να είναι 5,5. Το *G. diazotrophicus* αναπτύσσεται σε διαλύματα σακχαρόζης υψηλής συγκέντρωσης (10%) και έχει την ικανότητα να δεσμεύει άζωτο υπό μικροαερόφιλες συνθήκες ενώ η αζωτοδέσμευση αναστέλλεται μερικώς παρουσία αμμωνίας (Muthukumarasamy *et al*., 2002). Όσον αφορά το μεταβολισμό οργανικών ενώσεων, το *G. diazotrophicus* διαθέτει τον μηχανισμό της γλυκόλυσης, το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης και ένα μοναδικό μονοπάτι οξείδωσης εξωκυτταρικής αλδόζης κατά το οποίο η γλυκόζη οξειδώνεται προς γλυκονικό (Saravanan *et al*., 2008). Άλλα χαρακτηριστικά του είδους αφορούν: α) έλλειψη της αναγωγάσης του νιτρικού (με αποτέλεσμα την ικανότητα να δεσμεύει άζωτο ακόμα και παρουσία νιτρικών), β) παραγωγή φυτοορμονών, γ) διαλυτοποίηση φωσφορικού και ψευδαργύρου, δ) μεγάλη αντοχή στο οσμωτικό στρες και ε) ανταγωνισμός με φυτοπαθογόνα (Mehnaz & Lazarovits, 2006, Reis *et al*., 2007, Pedraza, 2007, Triplett, 2007, Saravanan *et al*., 2008). Η αυξίνη ινδολοξικό οξύ παράγεται από όλα τα αζωτοδεσμευτικά είδη του *Gluconacetobacter* και οι γιβερελλίνες A_1 και A_3 μόνο από το *G. diazotrophicus* (Pedraza, 2007). Η προαναφερθείσα ιδιότητα της διαλυτοποίησης φωσφόρου και ψευδαργύρου θεωρείται ως ευεργετική για την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών, διότι μετατρέπει τα στοιχεία αυτά σε αφομοιώσιμες, για τα φυτά, μορφές (Saravanan *et al*., 2008). Επίσης, ρόλο στην προώθηση τα ανάπτυξης των φυτών πιθανώς να έχει και η υδρόλυση του αμινοκυκλοπροπανο-καρβοξυλικού οξέος (ACC) το οποίο αποτελεί πρόδρομη ένωση του αιθυλενίου. Το αιθυλένιο έχει αρνητική επίδραση στο φυτό μειώνοντας τον ρυθμό ανάπτυξής του. Έτσι, το βακτήριο παράγοντας την απαμινάση του αμινοκυκλοπροπανο-καρβοξυλικού οξέος μεταβολίζει το ACC προς α-κετοβουτυρικό οξύ και αμμωνία περιορίζοντας την αρνητική επίδραση του αιθυλενίου στα φυτά (Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado, 2005, Saleem *et al*., 2007). Τέλος, έχει διαπιστωθεί ότι το *G. diazotrophicus*: α) παρουσιάζει ανταγωνιστική δράση με ένα παθογόνο του σακχαροκάλαμου, τον μύκητα *Colletrotrichum falcatum* (Muthukumarasamy *et al*., 2002), β) περιορίζει την ανάπτυξη του παθογόνου *Xanthomonas albilineans* λόγω παραγωγής ενός ενζύμου που λύει τα κυτταρικά τοιχώματα με δραστηριότητα παρόμοια της λυσοζύμης (Bally & Elmerich, 2007) και γ) ότι ελέγχει την ανάπτυξη του νηματώδη *Meloidogyne incognita* (Saravanan *et al*., 2008).

Οι απομονώσεις του *G. diazotrophicus* από διάφορα περιβάλλοντα δεν φαίνεται να παρουσιάζουν μεγάλη γενετική ποικιλομορφία (Muthukumarasamy *et al*., 2002). Το εκτιμώμενο μέγεθος του γονιδιώματός του είναι 4,3 Mb (Pedraza, 2007) και είναι διαπιστωμένο ότι φέρει πλασμίδια με μεγέθη από 50-110 MDa. Τα γονίδια *nif* δεν εντοπίζονται στα πλασμίδια αλλά στο χρωμόσωμα. Η πρώτη φάση χαρακτηρισμού των γονιδίων *nif* περιλάμβανε δομικά γονίδια της νιτρογενάσης, γονίδια ‘ωρίμανσης’ του

συστήματος της νιτρογενάσης, γονίδια υπεύθυνα για τη ρύθμιση της αζωτοδέσμευσης και για λειτουργίες μεταφοράς ηλεκτρονίων. Έπειτα, αναγνωρίστηκαν 32 ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια (ORF) σε μία περιοχή 31 kb και διαπιστώθηκε ότι η ομάδα των γονιδίων *nif/fix* του *G. diazotrophicus* αποτελεί τη μεγαλύτερη ομάδα γειτνιαζόντων γονιδίων που συμμετέχουν στην αζωτοδέσμευση ή σε σχετικές με αυτή λειτουργίες που έχει παρατηρηθεί σε οποιονδήποτε αζωτοδεσμευτικό οργανισμό ώς σήμερα. Έχουν, επίσης, αναγνωριστεί τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη δομή και τη λειτουργία της νιτρογενάσης τα οποία είναι τα *nifHDKENX*, *nifUSVW*, *nifB*, *nifQ* και αυτά που απαιτούνται για την ενεργοποίηση μεταγραφής άλλων γονιδίων *nif*, δηλαδή τα *rpoN* και *nifA*-το οποίο παρουσιάζει ευαισθησία στο O_2 και σε NH_4^+ (Baldani & Baldani, 2005, Saravanan *et al*., 2008). Άλλα γονίδια που σχετίζονται έμμεσα με την αζωτοδέσμευση είναι το *mcpA* που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη που απαντά σε χημειοτακτικά σήματα και το *modABCD* που εκφράζει ένα σύστημα μεταφοράς μολυβδαινίου. Η οργάνωση των γονιδίων αζωτοδέσμευσης του *G. diazotrophicus* έχει ομοιότητες με αυτήν του *Azospirillum brasilense* ενώ μία περιοχή (από *nifE* έως *nifW*) έχει ομοιότητες με το *Rhodobacter capsulatus*. Το *G. diazotrophicus* και το *A. brasilense* είναι οι μόνοι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί οι οποίοι φέρουν γονίδιο τύπου *mcp-A* που σχετίζεται με την ομάδα γονιδίων *nif/fix*. Η πρωτεΐνη McpA εμπλέκεται στο χημειοτακτισμό πολλών οργανισμών (Reis *et al*., 2007). Λόγω της ενδοφυτικής του φύσης το *G. diazotrophicus* χρησιμοποιείται ως φορέας για ετερόλογη έκφραση ορισμένων γονιδίων (Baldani & Baldani, 2005).

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

Α.3.2.2 Άλλα αζωτοδεσμευτικά μέλη της οικογένειας Acetobacteraceae

Έπειτα από μία εκτενή ταξινομική μελέτη, προτάθηκε η δημιουργία ενός νέου γένους και είδους της οικογένειας Acetobacteraceae το οποίο ονομάστηκε *Swaminathania salitolerans*. Το συγκεκριμένο είδος απομονώθηκε από εκτάσεις άγριου ρυζιού (*Porteresia coarctata*) στην Ινδία πλούσιες σε άλατα και παρουσιάζει τη δυνατότητα να δεσμεύει άζωτο και να διαλυτοποιεί φώσφορο παρουσία NaCl (3%). Το *S. salitolerans* απαντά τόσο στη ριζόσφαιρα όσο και ενδοφυτικά στους βλαστούς και τη ρίζα (Saravanan *et al*., 2008, Tilak *et al*., 2005).

Οργανισμός και χώρα απομόνωσης	**Είδος καλλιέργειας**	**Πηγή απομόνωσης**
Gluconacetobacter diazotrophicus		
Βραζιλία	Σακχαροκάλαμο	Βλαστός,ρίζα, φύλλα και φυτ. χυμός
Βραζιλία	Γλυκοπατάτα	Σπόρια του *Glomus occultum* και του *Acaulospora*
Αυστραλία	Σακχαροκάλαμο	Ψευδόκοκκος *Saccharococcus sacchari*
Βραζιλία	Pennisetum purpureum και γλυκοπατάτα	Βλαστός, ρίζα και κόνδυλος
Μεξικό	Σακχαροκάλαμο	Βλαστός, ρίζα και ψευδόκοκκος
Μεξικό	Καφές	Βλαστός, ρίζα και ριζόσφαιρα
Κένυα	Τσάι, μπανάνα και καφές	Ρίζα και ριζόσφαιρα
Ινδία	Eleusine coracana	Βλαστός, ρίζα, φύλλα και ριζόσφαιρα
Μεξικό	Ανανάς	Βλαστός, ρίζα και φύλλα
Ινδία	Καρότο, ραπανάκι, πατζάρι και καφές	Ιστοί ρίζας
Ινδία και Κορέα	Υγροβιότοπος ρυζιού	Βλαστός, ρίζα και ριζόσφαιρα
G. *azotocaptans* και *G. johannae*		
Μεξικό	Καφές	Ριζόσφαιρα και ριζοπλάνο
G. azotocaptans		
Καναδάς	Καλαμπόκι	Ριζόσφαιρα
Swaminathania salitolerans		
Ινδία	Άγριο ρύζι	Βλαστός, ρίζα και ριζόσφαιρα
G. *kombuchae*		
Ινδία		Τσάι Kombucha
Acetobacter peroxydans		
Ινδία	Υγροβιότοπος ρυζιού	Βλαστός, ρίζα και ριζόσφαιρα
A. *nitrogenifigens*		
Ινδία		Τσάι Kombucha

Πίν. Α.5 Πηγές απομόνωσης και είδη καλλιέργειας ορισμένων αζωτοδεσμευτικών μελών της οικογένειας Acetobacteraceae (Saravanan *et al*., 2008).

Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι ακόμα ένα γένος της οικογένειας Acetobacteraceae έχει την ικανότητα της δέσμευσης αζώτου. Πρόκειται για το *Acetobacter peroxydans* το οποίο απομονώθηκε από υγροβιότοπους ρυζιού στην Ινδία από ριζόσφαιρα αλλά και ενδοφυτικά

από στελέχη και ιστούς ρίζας. Από μελέτη σε τσάι Kombucha διαπιστώθηκε η παρουσία ενός επιπλέον αζωτοδεσμευτικού είδος του γένους *Acetobacter*, το *A. nitrogenifigens*. Η διαπίστωση της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας σε αυτό το γένος παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι παρότι το γένος έχει ανακαλυφθεί από τον 20° αιώνα δεν του έχει αποδοθεί ξανά η ιδιότητα αυτή (Saravanan *et al*., 2008). Τέλος, το είδος *Asaia bogorensis* το οποίο αποτελεί και παθογόνο του ανθρώπου, έχει απομονωθεί από φυτά ανανά και πιθανώς να έχει την ικανότητα αζωτοδέσμευσης. Επίσης, σε εργαστηριακές μελέτες του *A. bogorensis* και ορισμένων *Asaia* spp. (απομονωμένων από το φυτό *Byrsonima crassifolia* ανιχνεύθηκε ινδολοξικό οξύ στο θρεπτικό υπόστρωμα (Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado, 2005, Saravanan *et al*., 2008).

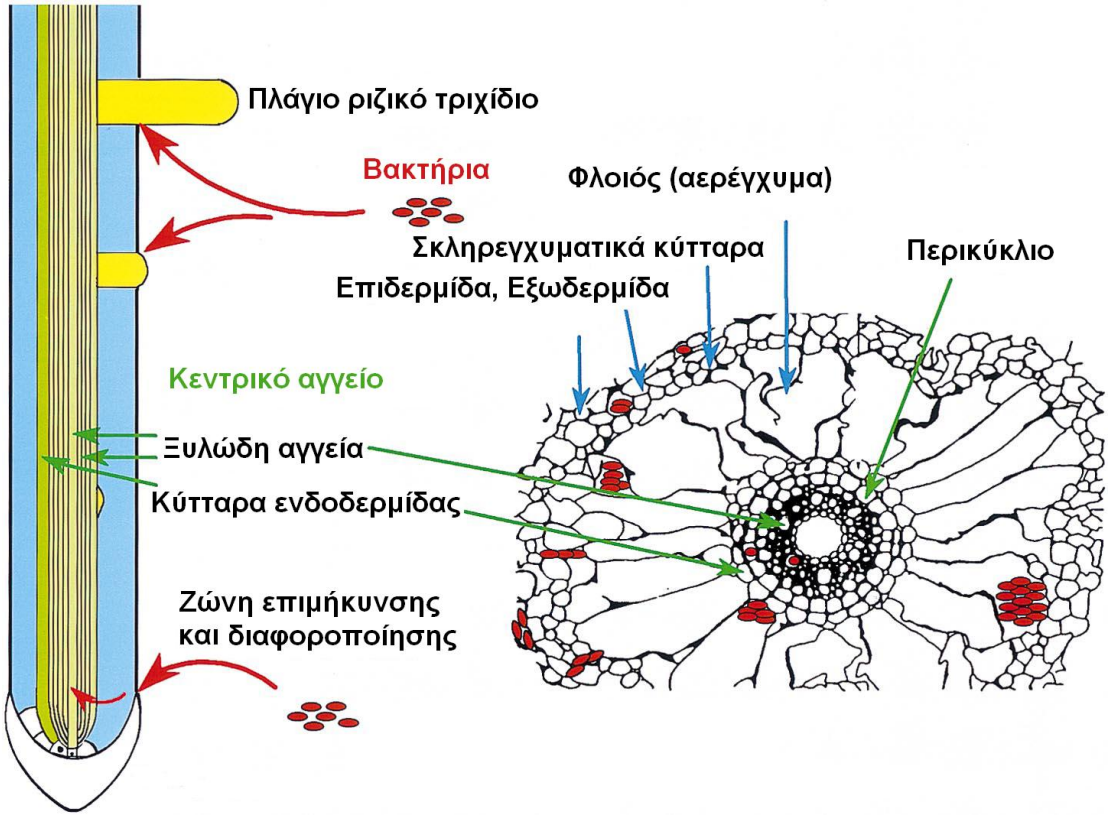
A.3.2.3 *Azoarcus*

Το γένος *Azoarcus* χωρίζεται σε δύο ομάδες βακτηρίων βάσει των οικολογικών τους διαφορών: α) εδαφικά βακτήρια τα οποία μπορούν να αποδομήσουν αρωματικούς υδρογονάνθρακες υπό απονιτροποιητικές συνθήκες και β) ενδοφυτικά ή επιφυτικά βακτήρια αγρωστωδών τα οποία δεν επιβιώνουν εύκολα σε έδαφος χωρίς την παρουσία ριζών (Reinhold-Hurek & Hurek, 2006). Το γένος περιγράφηκε για πρώτη φορά έπειτα από απομόνωση δύο ειδών από το αγρωστώδες *Leptochloa fusca*, των *Azoarcus indigens* και *Azoarcus communis* (Reinhold-Hurek *et al*., 1993). Το *A. indigens* αποτελεί το τυπικό είδος του γένους. Τα είδη του *Azoarcus* τα οποία έχει βρεθεί ότι αζωτοδεσμεύουν είναι τα *A. indigens*, *A. communis* και *Azoarcus* sp. BH72 από την κατηγορία του γένους που σχετίζεται με αγρωστώδη και το *A. tolulyticus* από τα εδαφικά *Azoarcus* (Reinhold-Hurek & Hurek, 2006). Το *Azoarcus* sp. BH72 αποτελεί το είδος μοντέλο του γένους και δικαιούται να ταξινομηθεί ως νέο είδος βάσει DNA/DNA υβριδισμού αλλά παραμένει χωρίς ονομασία διότι περιλαμβάνει μόλις ένα στέλεχος (Reinhold-Hurek & Hurek, 2007). Τα *A. indigens*, *A. communis* και *Azoarcus* sp. BH72 έχουν απομονωθεί από επιφάνεια στελεχών και ρίζας καθώς και από ριζόσφαιρα του *Leptochloa fusca*, από ριζόσφαιρα ρυζιού, από σκληρώτια σε ορυζώνες και από ασκοκάρπια σε εκτάσεις *L. fusca*. Εξαίρεση των ενδο-, επι- φυτικών *Azoarcus* αποτελεί *A. communis* το οποίο έχει απομονωθεί επιπλέον και από πετρελαϊκά απόβλητα διυλιστηρίου. Το *A. tolulyticus*, το οποίο είναι το μοναδικό από τα εδαφικά *Azoarcus* το οποίο αζωτοδεσμεύει, έχει απομονωθεί από εδάφη μολυσμένα με τολουένιο (Zhou *et al*., 1995). Πρόσφατα, απομονώθηκε από ριζόσφαιρα σιταριού στέλεχος βακτηρίου του οποίου το γονίδιο *nifH* είχε υψηλή ομολογία με αυτό του *A. tolulyticus* (Sarita *et al*., 2008). Τα βακτήρια *Azoarcus* δεν έχουν απομονωθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες και αυτό οφείλεται, πιθανώς, στο ότι τα στελέχη του είναι κυρίως μη καλλιεργήσιμα στο εργαστήριο και στο ότι οι περισσότερες έρευνες επικεντρώνονται σε καλλιεργούμενα φυτά ενώ το συγκεκριμένο βακτήριο έχει την τάση να συσχετίζεται με αυτοφυή (μη καλλιεργούμενα) φυτά (Reinhold-Hurek & Hurek, 2007). Το τελευταίο υποστηρίζεται και

από το γεγονός ότι οι πληθυσμοί του *Azoarcus* σε άγριο ρύζι και σε παραδοσιακές ποικιλίες ρυζιού είναι μεγαλύτερος από αυτόν που παρουσιάζεται σε πιο σύγχρονες καλλιεργούμενες ποικιλίες ρυζιού (Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado, 2005). Υπάρχουν ενδείξεις, επίσης, ότι βακτήρια *Azoarcus* διαβιούν ενδοφυτικά και σε σόργο αλλά δεν έχει αποδειχτεί ως σήμερα (Saikia & Jain, 2007, Triplett, 2007). Εμβολιασμός καλαμποκιού με βακτήρια *Azoarcus* δεν είχε επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών είτε παρουσία είτε απουσία λιπασμάτων (Triplett, 2007).

Τα βακτήρια του γένους *Azoarcus* βάσει αναλύσεων του γονιδίου 16S rRNA ανήκουν στην κλάση β-Πρωτεοβακτήρια στην τάξη Rhodocyclales. Πρόκειται για ένα ετερογενές γένος το οποίο sensu lato περιλαμβάνει τα βακτήρια των γενών *Azovibrio*, *Azospira* και *Azonexus*, τα οποία είναι επίσης αζωτοδεσμευτικά υπό μικροαερόφιλες συνθήκες. Το *Azoarcus* sensu stricto παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με το γένος *Thauera*. Γενικά, είναι Gram αρνητικά βακτήρια, με ευθέα ή ελαφρώς κυρτά ραβδία με εξαίρεση το *A. buckelii* το οποίο έχει κοκκοειδές σχήμα. Παρουσιάζουν ιδιαίτερα μεγάλη κινητικότητα και διαθέτουν ένα ή δύο πολικά μαστίγια (Reinhold-Hurek & Hurek, 2006). Έχουν αερόβιο μεταβολισμό χρησιμοποιώντας το O_2 ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων ενώ σε αναερόβιες συνθήκες τον ρόλο αυτό λαμβάνει το νιτρικό. Εξαίρεση αποτελεί το *A. anaerobius* το οποίο είναι μεν αυστηρά αναερόβιο αλλά δεν αζωτοδεσμεύει. Τέλος, τα ενδοφυτικά *Azoarcus* δεν καταβολίζουν υδατάνθρακες για την ανάπτυξή τους σε αντίθεση με τα εδαφικά τα οποία καταβολίζουν μόρια όπως η γλυκόζη, η μαλτόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη (Reinhold-Hurek & Hurek, 2007). Το κεντρικό αγγείο των φυτών θεωρείτο ότι αποικίζεται μόνο από παθογόνους ή σαπροφυτικούς οργανισμούς. Αυτό δεν ισχύει για την περίπτωση του *Azoarcus*. Το στέλεχος BH72 εντοπίστηκε σε αγγεία της ρίζας του *L. fusca* και ρυζιού. Το στέλεχος αυτό αποικίζει αυτά τα φυτά με παρόμοιο τρόπο· τα εξωτερικά κυτταρικά στρώματα (εξωδερμίδα, σκληρέγχυμα) και ο φλοιός της ρίζας αποικίζονται ενδοφυτικά μέσα σε διάστημα 2-3 εβδομάδων. Εφόσον εγκατασταθούν εντός του φυτού, πολλαπλασιάζονται διασυστηματικά και φτάνουν και τα υπέργεια μέρη του φυτού πιθανώς μέσω ξυλωδών αγγείων (Εικ. Α.12). Παρόλο που τα βακτήρια αποικίζουν το φυτό ενδοκυτταρικά δεν φαίνεται να παραμένουν εντός του ζωντανού φυτικού κυτοπλάσματος. Εφόσον τα βακτήρια *Azoarcus* δεν φαίνεται να επιβιώνουν στο έδαφος απουσία ριζών προκύπτει το ερώτημα του πώς προσβάλλουν τα φυτά. Η επιβίωση των βακτηρίων απουσία φυτών πιθανώς να επιτυγχάνεται μέσω συσχέτισής τους με καρποφορίες μυκήτων στο έδαφος (Hurek & Reinhold-Hurek, 2003). Όσον αφορά τις θέσεις εισόδου του βακτηρίου προτείνονται δύο τρόποι· η αποίκιση της κορυφής του ριζικού τριχιδίου στη ζώνη επιμήκυνσης και διαφοροποίησης και ένας άλλος τρόπος, πιθανώς, να είναι η είσοδος από τα σημεία έκπτυξης των πλάγιων ριζικών τριχιδίων (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998). Η είσοδος των βακτηρίων στη ρίζα ίσως υποβοηθείται από τη δράση δύο κυτταρολυτικών ενζύμων τα οποία λύουν τα κυτταρικά τοιχώματα την στρωμάτων της ρίζας, μιας ενδογλυκανάσης και μιας εξωγλυκανάσης, τα οποία δεν έχουν τον ρόλο του μεταβολισμού

της κυτταρίνης ή της κελλοβιόζης (δισακχαρίτης) (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998, Ryan *et al*., 2008).



Εικ. Α.12 Πιθανές θέσεις προσβολής και αποίκισης σε ρίζα νεαρού ρυζιού (οριζόντια τομή) και σε ρίζα ώριμου ρυζιού (κάθετη τομή). Οι θέσεις αποίκισης είναι το χώμα της ριζόσφαιρας (περιβάλλει τις ρίζες και επηρεάζεται από τις εκκρίσεις τους) ή, για επιφυτικούς μικροοργανισμούς, το ριζοπλάνο (περιλαμβάνονται η επιδερμίδα και η εξωδερμίδα) ή οι εσωτερικοί ιστοί. Η ενδοδερμίδα αποτελεί το φράγμα που περιβάλλει το κεντρικό αγγείο (πράσινα βέλη), το οποίο περιέχει ξυλώδη αγγεία για την παροχή θρεπτικών στοιχείων της ρίζας και μέχρι πρότινος θεωρείτο ότι αποικίζεται από μικροοργανισμούς μη παθογόνους. Οι θέσεις αποίκισης των αζωτοδεσμευτικών ενδοφυτικών οργανισμών υποδεικνύονται από κόκκινα δισκία και τα μονοπάτια εισόδου από κόκκινα βέλη. Τα μπλε βέλη δείχνουν τα εξωτερικά στρώματα κυττάρων και τον φλοιό (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998).

Ένα άλλο ερώτημα είναι το πώς επικοινωνεί το βακτήριο με τον ξενιστή. Έπειτα από την ολοκλήρωση της αλληλούχησης του γονιδιώματος του *Azoarcus* BH72, φάνηκε ότι δεν υπάρχουν γονίδια που να εκφράζουν εκκριτικά μονοπάτια τύπου III και IV, παράγοντες σχηματισμού φυματίων, τοξίνες, κοινά υδρολυτικά ένζυμα και το σύστημα N-acyl

homoserine lactone-based quorum-sensing, τα οποία βρίσκονται στα περισσότερα παθογόνα ή συσχετιζόμενα με φυτά βακτήρια. Αντίθετα, εντοπίστηκαν γονίδια των οποίων τα προϊόντα σχετίζονται με αλληλεπίδραση με το φυτό. Τα προϊόντα αυτά περιλαμβάνουν τριχίδια τύπου IV (pili), πολυσακχαρίτες επιφάνειας, τύπου I και II πρωτεΐνες εκκριτικών μονοπατιών, μαστίγια και χημειοτακτικές πρωτεΐνες (Ryan *et al*., 2008). Τα τριχίδια τύπου IV είναι γνωστό ότι μεσολαβούν για την πρόσδεση στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή και είναι σημαντικός παράγοντας μολυσματικότητας ανθρώπινων και ζωικών παθογόνων και ίσως έχουν παρόμοια δράση στις αλληλεπιδράσεις φυτών-μικροοργανισμών (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998). Ο σχηματισμός του τριχιδίου τύπου IV εξαρτάται από το οπερόνιο *pilAB* του οποίου η έκφραση έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του βακτηρίου στη ρίζα και το τυπικό γονίδιο που μελετάται είναι το *pilA* (Hurek & Reinhold-Hurek, 2003, Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado, 2005).

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

Το μέγεθος του γονιδιώματος του *Azoarcus* BH72 υπολογίζεται σε 4,6Mb και το περιεχόμενο G+C 65%. Όπως και στα περισσότερα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια έτσι και στο *Azoarcus* τα δομικά γονίδια *nifHDK* εντοπίζονται σε ένα οπερόνιο. Επιπροσθέτως, στην ίδια ομάδα γονιδίων υπάρχει ένα γονίδιο φερρεδοξίνης (*fdxN*), ένα γονίδιο όμοιο με *nifY* και ένα *orf1*. Μια άλλη ομάδα γονιδίων περιλαμβάνει τα ρυθμιστικά γονίδια *nifLA* και *nifL* γεγονός το οποίο δεν ήταν αναμενόμενο μιας και τα γονίδια *nifL* έχουν εντοπιστεί ώς σήμερα μόνο σε γ-Πρωτεοβακτήρια και πρόσφατα σε *Pseudomonas stutzeri* (Hurek & Reinhold-Hurek, 2003, Pedrosa & Elmerich, 2007). Από μελέτες των γονιδίων *nifHDK* του *Azoarcus* έχει φανεί ότι τα γονίδια αυτά αποκτήθηκαν μέσω οριζόντιας μεταφοράς (Schmid & Hartmann, 2007). Ένα άλλο ασυνήθιστο γνώρισμα του *Azoarcus* BH72 είναι ο σχηματισμός εσωτερικών μεμβρανικών στοιβάδων οι οποίες καλούνται diazosomes. Κύτταρα τα οποία δεσμεύουν άζωτο υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν παρουσιάζουν τέτοιες μεμβράνες. Αυτές όμως εμφανίζονται κατά την υπερ-επαγωγή (hyper-induction) δηλαδή μία κατάσταση αυξημένης δραστηριότητας και απόδοσης αζωτοδέσμευσης σε κλειστές καλλιέργειες σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις O_2 (Hurek & Reinhold-Hurek, 2003). Σε αυτήν την κατάσταση, η αζωτοδέσμευση είναι πολύ αποδοτική και συγκεκριμένα μπορεί να φτάσει μία τάξη μεγέθους υψηλότερα από αυτήν που παρουσιάζουν τα βακτηριοειδή στα φυμάτια.

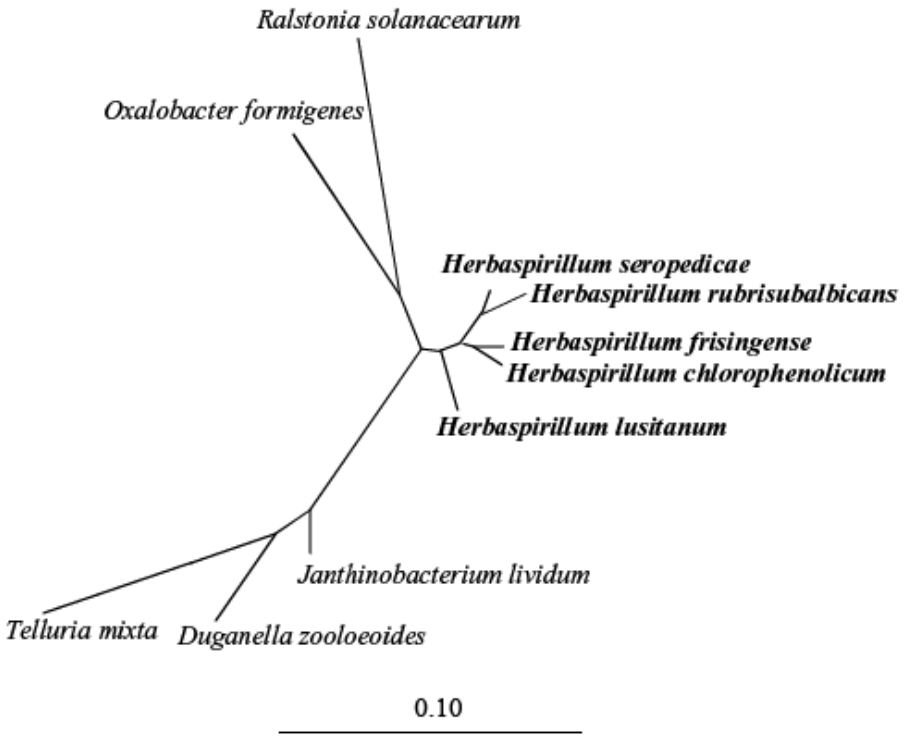
Αυτές οι κατασκευές θεωρούνται κεντρικής σημασίας για αζωτοδέσμευση υψηλής απόδοσης (Tilak *et al*., 2005). Επιπλέον, στο γονιδίωμα του *Azoarcus* EbN1 έχει διαπιστωθεί η παρουσία γονιδίων τα οποία έχουν ρόλο στη βιοσύνθεση αυξινών και, συγκεκριμένα, γονίδια των οποίων τα προϊόντα είναι μέρος του μονοπατιού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

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

A.3.2.4 *Herbaspirillum*

Βακτήρια του γένους *Herbaspirillum* απομονώθηκαν για πρώτη φορά από καλαμπόκι το 1986 και θεωρήθηκαν ως μέλη του γένους *Azospirillum* και τους δόθηκε το όνομα *Azospirillum seropedicae* (Elmerich, 2007). Όμως, μετά από DNA/DNA υβριδισμό έγινε γρήγορα αντιληπτό ότι η συγκεκριμένη απομόνωση ανήκει στην κλάση β-Πρωτεοβακτήρια και ότι πρόκειται για ένα νέο είδος (Baldani & Baldani, 2005). Τελικά, ονομάστηκε *Herbaspirillum seropedicae* και αποδείχτηκε ότι έχει στενή σχέση με ένα παθογόνο του σακχαροκάλαμου το οποίο αρχικά αναγνωρίστηκε ως *Pseudomonas rubrisubalbicans*. Έπειτα από περαιτέρω φυλογενετική ανάλυση, φάνηκε ότι το *H. seropedicae* και το *P. rubrisubalbicans* έχουν στενή συγγένεια και ότι προκαλούν τα ίδια συμπτώματα σε σόργο και το αγρωστώδες *Pennisetum* (Elmerich, 2007). Έτσι, μετονομάστηκε σε *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Schmid & Hartmann, 2007). Το *H. seropedicae* έχει απομονωθεί επίσης από ρίζες σόργου, σακχαροκάλαμου, ρυζιού και άλλων αγρωστωδών (Elmerich, 2007) και το *H. rubrisubalbicans* από *Miscanthus* και σακχαροκάλαμο (Reis *et al*., 2007). Τα στελέχη ενός είδους τα οποία προέρχονται κυρίως από κλινικές απομονώσεις και προσωρινά έχουν το όνομα '*Herbaspirillum* είδος 3' φαίνεται ότι ίσως πρέπει να οριστικοποιηθεί η ένταξή

τους στο γένος αν και δεν αζωτοδεσμεύουν όλα τα στελέχη του ούτε προέρχονται όλα από φυτικά είδη. Το είδος *H. frisingense* πρόσφατα απομονώθηκε από δύο C-4 φυτά, τα *Pennisetum purpureum* (στη Βραζιλία) και *Miscanthus sinensis* (στη Γερμανία). Επίσης, έχει προταθεί το όνομα *H. lusitanum* για στελέχη απομονωμένα από φυμάτια του *Phaseolus vulgaris* στην Πορτογαλία. Τέλος, έχει προταθεί και το είδος *H. chlorophenolicum* (πρώην *Commamonas testosterone*) το οποίο έχει την ικανότητα να αποδομεί χλωροφαινόλη. Η σχέση αυτών των ειδών σύμφωνα με μοριακές αναλύσεις του γονιδίου 16S rRNA φαίνεται στο παρακάτω φυλογενετικό δέντρο (Εικ. Α.13) (Schmid & Hartmann, 2007).



Εικ. Α.13 Φυλογενετικό δέντρο 16S rRNA του *Herbaspirillum* sp. (Schmid & Hartmann, 2007).

Τα βακτήρια του γένους *Herbaspirillum* (οικογένεια Oxalobacteraceae) είναι Gram αρνητικά ωοειδή ενδοφυτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και διαθέτουν πολικό μαστίγιο (Jung *et al*., 2007, Pedrosa & Elmerich, 2007, Vanbleu & Vanderleyden, 2007). Με εξαίρεση το *H. chlorophenolicum* και το 'είδος 3', τα υπόλοιπα μέλη του γένους έχουν όλα αζωτοδεσμευτικές ικανότητες και αποικίζουν ρίζες φυτών. Κατά τη μελέτη της αποίκισης αυτών των βακτηρίων διαπιστώθηκε η ενδοφυτική τους συμπεριφορά σε ορισμένα φυτά όπως το σόργο, το σακχαροκάλαμο, το ρύζι, ο ανανάς, η μπανάνα και *Miscanthus* (Schmid & Hartmann, 2007). Η ενδοφυτική φύση του *H. seropedicae* στέλεχος Z67 διαπιστώθηκε από μελέτες με συστήματα αναφοράς της β-γλουκουρονιδάσης (*gus*) σε ρύζι. Έτσι, φάνηκε

ότι η είσοδος των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε από τις θέσεις έκπτυξης των πλάγιων ριζικών τριχιδίων και ότι κατόπιν αποικίζονται οι ενδοκυτταρικοί χώροι της ρίζας, το αερέγχυμα, τα κύτταρα του φλοιού, ορισμένα διαφεύγουν μέσω του κεντρικού αγγείου στους αγγειώδεις ιστούς. Επίσης, αποικίζονται τα ξυλώδη αγγεία των φύλλων και των βλαστών (Reis *et al*., 2007).

Τα βακτήρια *Herbaspirillum* έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και να αζωτοδεσμεύουν παρουσία σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων O_2 (3%) σε σχέση με *Azospirillum* spp. (2%). Το *H. seropedicae* εκφράζει την αναγωγάση του νιτρικού και μπορεί να αναπτύσσεται αλλά όχι να δεσμεύει άζωτο παρουσία νιτρικών, ωστόσο η δραστηριότητα της νιτρογενάσης αναστέλλεται μόνο μερικώς μέχρι η συγκέντρωση αμμωνίας να λάβει τη τιμή 20mM (Reis *et al*., 2007). Σε αντίθεση με το *G. diazotrpohicus*, τα γονίδια αζωτοδέσμευσης του *H. seropedicae* βρίσκονται διαχωρισμένα σε δύο ομάδες (*nifHDKENXorf1orf2orf3* και *nifQmodABCfixXC*) μέσα στο γονιδίωμά του αλλά η αποστάσεις τους δεν είναι ακόμα γνωστές. Όπως και σε άλλα μέλη των Πρωτεοβακτηρίων, έτσι και στο *H. seropedicae* η έκφραση των γονιδίων *nif* ρυθμίζεται από το γονίδιο *nifA* ενώ διαπιστώνεται η παρουσία των πρωτεϊνών GlnD και PII (Pedrosa & Elmerich, 2007, Reis *et al*., 2007). Η πρωτεΐνη NifA είναι ευαίσθητη στο οξυγόνο και επιπλέον απαιτεί σίδηρο για in vivo δραστηριότητα (Baldani & Baldani, 2005).

Η επίδραση εμβολιασμού με βακτήρια του γένους *Herbaspirillum* έχει μελετηθεί και αξιολογηθεί εκτενώς τα τελευταία 20 χρόνια. Κατά τα πρώτα έτη, δεν διαπιστώθηκε θετική αντίδραση σε σόργο και καλαμπόκι έπειτα από εμβολιασμό. Στην περίπτωση του ρυζιού όμως διαπιστώθηκε αύξηση της απόδοσης που ισοδυναμούσε με αντίστοιχη αύξηση έπειτα από προσθήκη 40 kg N/εκτάριο (Baldani & Baldani, 2005). Μπορεί να δεσμεύσει το 31-54% του συνολικού αζώτου που απαιτείται για φυτάρια ρυζιού 30 ημερών. Σε μελέτες σε θερμοκήπιο, ο εμβολιασμός με *Herbaspirillum* είχε ως αποτέλεσμα αύξηση του ρυζιού κατά 7,5g ανά φυτό ενώ ρόλο έχει και η ποικιλία του ρυζιού. Εμβολιασμός με *H. seropedicae* έχει θετική επίδραση σε βλαστούς και σπέρματα ρυζιού καθώς και στη βλαστικότητα των σπερμάτων. Παρόμοιες θετικές επιδράσεις έχει ο εμβολιασμός του *H. seropedicae* σε σιτάρι και σε σακχαροκάλαμο του οποίου ο πληθυσμός σε βακτήρια δεν επηρεάζεται από εφαρμογή αζωτούχων λιπασμάτων (Kennedy *et al*., 2004). Ρόλο στην έκταση του αποικισμού στο σακχαροκάλαμο έχει και η επιλογή της ποικιλίας. Σε ευπαθή ποικιλία τα ξυλώδη αγγεία, οι ενδοκυτταρικοί χώροι και οι υποστοματικές κοιλότητες φράσσονται πλήρως από την ανάπτυξη του *H. rubrisubalbicans* σε σύγκριση με ανθεκτική ποικιλία στην οποία ήταν περιορισμένο σε μικροαποικίες (Reis *et al*., 2007).

A.3.2.5 *Klebsiella*

Τα βακτήρια του γένους *Klebsiella* είναι παρόντα σε πολλά και ποικίλα περιβάλλοντα. Συνολικά, έχουν απομονωθεί από φυτικά προϊόντα, ύδατα προερχόμενα από βιομηχανίες,

υπόνομους, φρέσκα λαχανικά, τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και οξέα υπολείμματα σακχαροκάλαμου και ξύλου (Grimont & Grimont, 2005b). Επίσης έχει εντοπιστεί σε φυτά γλυκοπατάτας, ρυζιού, καλαμποκιού και μπανάνας (Fouts *et al*., 2008). Τα *Klebsiella* είναι επίσης γνωστά ως παθογόνα του ανθρώπου και ορισμένων ζώων. Βακτήρια του γένους *Klebsiella* συχνά συσχετίζονται με λοιμώξεις της εντερικής και της ουροφόρου οδού καθώς και με ενδονοσοκομιακές λοιμώξεις όπως η σηψαιμία και η πνευμονία και παρουσιάζει αναπτυγμένη ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Παρ' όλ' αυτά, το γένος εντεροβακτηρίων *Klebsiella* και πιο συγκεκριμένα το *Klebsiella pneumoniae* αποτελεί βακτήριο μοντέλο και αντικείμενο μελέτης της βιολογικής δέσμευσης αζώτου (Martínez *et al*., 2004). Άλλα είδη του γένους είναι τα *K. mobilis, K. oxytoca, K. planticola, K. granulomatis, K. terrigena, K. ornithinolytica* (είδος *incertae sedis*) ενώ το είδος *K. pneumoniae* περιλαμβάνει τρία υποείδη (Grimont & Grimont, 2005b).

Το γένος *Klebsiella* περιλαμβάνει μη κινητά (εκτός του *K. mobilis*) Gram αρνητικά ραβδία γ-Πρωτεοβακτήρια τα οποία δε διαθέτουν μαστίγια (Grimont & Grimont, 2005b). Είναι προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί οι οποίοι έχουν ενδοφυτική δράση δεσμεύοντας άζωτο το οποίο στη συνέχεια παρέχουν στα φυτά αυξάνοντας έτσι την ανάπτυξή τους υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις. (Fouts *et al*., 2008). Το ποσοστό του γένους G+C κυμαίνεται από 53 έως 58% (Grimont & Grimont, 2005b). Η μοριακή μελέτη των γονιδίων *nif* του *K. oxytoca* M5a1 (αρχικά αναγνωρισμένο ως *K. pneumoniae*) βοήθησε αρχικά στην αποσαφήνιση της γενετικής της αζωτοδέσμευσης και η οργάνωση των συγκεκριμένων γονιδίων αποτελεί την πιο συμπαγή οργάνωση γονιδίων *nif* που έχει περιγραφεί ως σήμερα (Franche *et al*., 2008). Επίσης, έχει εντοπιστεί δραστηριότητα γλυκανάσης (Bally & Elmerich, 2007) και πηκτινικής λυάσης (Triplett, 2007).

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

Α.3.2.6 Άλλα αζωτοδεσμευτικά μέλη της οικογένειας Enterobacteriaceae

Τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae είναι ευρέως διαδεδομένα και εντοπίζονται σε εδάφη, ύδατα, καρπούς, κρέας, αυγά, λαχανικά, σπέρματα, ανθοφόρα φυτά καθώς και ζώα περιλαμβάνοντας έντομα ως και τον άνθρωπο. Η οικογένεια Enterobacteriaceae ανήκει στην τάξη Enterobacteriales της κλάσης γ-Πρωτεοβακτήρια (Brenner & Farmer, 2005). Ορισμένα γένη της οικογένειας, των οποίων τα βακτήρια έχουν απομονωθεί από εδάφη, περιλαμβάνουν PGPR και αζωτοδεσμευτικά είδη. Μια πιθανή εξήγηση για την ύπαρξη εντερικών βακτηρίων στο έδαφος αποτελεί το ότι με την επί μακρόν χρήση οργανικών εδαφοβελτιωτικών (κοπριά) στη γεωργία αναπτύχθηκε μικροβιακή χλωρίδα η οποία προσαρμόστηκε στον διατροφικό κύκλο ζώο-έδαφος-ριζόσφαιρα (Kennedy *et al*., 2004).

Το γένος *Enterobacter* περιλαμβάνει τα αζωτοδεσμευτικά είδη *E. cloacae* (τυπικό είδος) (Grimont & Grimont, 2005a) και *E. gergoviae* (An *et al*., 2007). Πρόκειται για οπορτουνιστικά, ενδοφυτικά, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια τα οποία είναι κινητά και διαθέτουν πλευρικά μαστίγια. Στελέχη του *E. cloacae* τα οποία αζωτοδεσμεύουν έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες ρυζιού, καλαμποκιού και σακχαροκάλαμου (Grimont & Grimont, 2005a, Peng *et al*., 2006). Επιπροσθέτως, ταυτόχρονος εμβολιασμός *Enterobacter* με το ριζόβιο *Bradyrhizobium* είχε ως αποτέλεσμα αύξηση του ξηρού βάρους στελεχών και της απόδοσης σε καρπό ψυχανθών απ' ότι επέδειξε ο εμβολιασμός κάθε στελέχους ξεχωριστά (Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado, 2005). Εκτός της δέσμευσης αζώτου τα βακτήρια *Enterobacter* παρουσιάζουν και άλλες ιδιότητες προώθησης ανάπτυξης των φυτών. Το *E. cloacae* έχει την δυνατότητα να παράγει την αυξίνη ινδολοξικό οξύ μέσω του μονοπατιού του ινδολοπυρουβικού οξέος (IpyA) και έχει εντοπιστεί η παρουσία του γονιδίου *ipdC* στο γονιδίωμά του. Το γονίδιο *ipdC* εκφράζει την αποκαρβοξυλάση του ινδολοπυρουβικού οξέος, ένα ένζυμο-κλειδί για την παραγωγή της συγκεκριμένης αυξίνης (Koga *et al*., 1991, Koga *et al*., 1992). Επίσης, έχει εντοπιστεί το γονίδιο απαμινάση του ACC από στέλεχος του ίδιου είδους, το οποίο έχει ιδιότητες προώθησης της ανάπτυξης (Holguin & Glick, 2003). Το *E. cloacae* ανήκει στην κατηγορία των ειδών βακτηρίων τα οποία περιέχουν παραπάνω από ένα genomovar (7 genomovar τουλάχιστον) (DNA group) οι οποίοι δεν μπορούν να διαχωριστούν φαινοτυπικά. Ακόμα, τα στελέχη *E. cloacae* παρουσιάζουν δυσκολίες στην αναγνώρισή τους με χρησιμοποίηση του γονιδίου 16S rRNA (Janda & Abbott, 2007). Ωστόσο, η αλληλούχηση του *Enterobacter* sp.638 που πρόκειται να δημοσιευτεί σύντομα ίσως δώσει απαντήσεις στα αίτια των παραπάνω προβλημάτων (Ryan *et al*., 2008).

Ένα άλλο σημαντικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο της οικογένειας Enterobacteriaceae είναι το *Pantoea agglomerans*. Μέχρι πρότινος, το είδος αυτό ήταν γνωστό ως *Enterobacter agglomerans*. Άλλα συνώνυμα του είδους είναι τα *Erwninia herbicola* και *Erwinia millietiae*. Πρόκειται, επίσης, για οπορτουνιστικά, ενδοφυτικά, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια τα οποία είναι κινητά και διαθέτουν πλευρικά μαστίγια. Στελέχη που έχουν την ικανότητα να

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

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

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

Α.3.2.7 *Burkholderia*

Το γένος *Burkholderia* είναι ένα εξαιρετικά ετερογενές γένος που περιλαμβάνει εδαφικά βακτήρια, PGP ριζοβακτήρια και παθογόνα φυτών και ανθρώπων (Van Dommelen & Vanderleyden, 2007). Ο αριθμός των ειδών του (και των genomovar) ανέρχεται σε 39 και αυξάνεται ραγδαία μιας και το 2004 το γένος απαριθμούσε 29 (Kennedy *et al*., 2004, Elmerich, 2007). Επιπροσθέτως, το γένος περιλαμβάνει στελέχη τα οποία αποδομούν οργανικές ύλες προερχόμενες από ανθρώπινη δραστηριότητα ενώ στελέχη του *Burkholderia cepacia* έχουν απομονωθεί από αμοιβάδα ελεύθερης διαβίωσης (Schmid & Hartmann, 2007, Van Dommelen & Vanderleyden, 2007). Ένα στέλεχος *Burkholderia*, στο οποίο ανιχνεύθηκε το γονίδιο *nifH*, διαπιστώθηκε ότι είναι ενδοσυμβιωτικό του ενδοτροφικού μυκορριζικού μύκητα *Gigaspora margarita* αλλά δεν αποτελεί καλλιεργήσιμο οργανισμό (Schmid & Hartmann, 2007). Το είδος *B. vietnamiensis* ήταν το πρώτο του γένους το οποίο διαπιστώθηκε ότι δεσμεύει άζωτο σε ρίζες ρυζιού και προωθεί την ανάπτυξη του φυτού. Αργότερα εντοπίστηκε σε ρίζα καλαμποκιού καθώς και σε ριζόσφαιρα και ριζοπλάνο καλαμποκιού και φυτών καφέ (Van Dommelen & Vanderleyden, 2007). Άλλα αζωτοδεσμευτικά είδη του γένους είναι τα *Burkholderia tropica* (πρώην *B. tropicalis*), *Burkholderia kururiensis*, *Burkholderia unamae*, *Burkholderia tuberum*, *Burkholderia brasilensis*, *Burkholderia silvatlantica* και *Burkholderia phynatum*. Τα *B. brasilensis* και *B. tropica* έχουν απομονωθεί από μπανάνα (*Musa* spp.) και ανανά (*Ananas comosus*), αντίστοιχα, ενώ και τα δύο είναι ενδοφυτικά είδη του σακχαροκάλαμου (Kennedy *et al*., 2004, Van Dommelen & Vanderleyden, 2007). Επίσης, τα στελέχη *B. brasilensis* M130 και *B. kururiensis* KP23 πιθανώς να αποτελούν ένα είδος βάσει μοριακών αναλύσεων (Baldani & Baldani, 2005). Τέλος, στελέχη των ειδών *B. tuberum*, *B. phymatum* and *B. caribensis* έχει διαπιστωθεί ότι έχουν την ικανότητα να επάγουν τον σχηματισμό φυματίων στα ψυχανθή *Aspalanthus carnosa* και *Machaerium lunatum* και να δεσμεύουν άζωτο. Αυτή η ικανότητα οφείλεται σε γονίδια σχηματισμού φυματίων τα οποία έχουν αποκτηθεί μέσω οριζόντιας μεταφοράς. Η ιδιότητα αυτή θεωρείτο μέχρι τότε αποκλειστικό προνόμιο βακτηρίων που ανήκαν μόνο στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων (Tilak *et al*, 2005, Van Dommelen & Vanderleyden, 2007).

Η διαδικασία εισόδου του βακτηρίου έχει μελετηθεί για τα είδη *B. brasilensis* και *B. tropica*. Τα βακτήρια *B. brasilensis* M209 σε φυτά ρυζιού πρώτα πολλαπλασιάζονται στην επιφάνεια της ρίζας και έπειτα διεισδύουν σε ενδοκυτταρικούς χώρους μέσω τραυματισμένων μεμβρανών. Μπορούν επίσης να εισχωρήσουν μέσω πληγών περιοχών των επιδερμικών κυττάρων και σε θέσεις έκπτυξης πλάγιων ριζίδιων. Το είδος αυτό μπορεί επίσης να αποικίσει στομάτια φυταρίων ρυζιού. Η μετάδοση και ο αποικισμός ριζών σακχαροκάλαμου εμβολιασμένων με *B. tropica* Ppe8 μοιάζουν αρκετά με τις διαδικασίες που παρατηρούνται και σε άλλα ενδοφυτικά βακτήρια. Μεγάλοι πληθυσμοί του συγκεκριμένου στελέχους εντοπίζονται κυρίως στην επιφάνεια ρίζας σακχαροκάλαμου όταν γίνει ταυτόχρονος εμβολιασμός του με άλλα ενδοφυτικά βακτήρια. Σε μελέτες σε αμπέλι

διαπιστώθηκε η δράση ενδογλυκανάσης και πολυγαλακτουρονάσης που βοηθούν τη μετάδοση των *Burkholderia* εντός του φυτού (Bhattacharjee & Singh, 2008).

Τα είδη του γένους *Burkholderia* έχουν ευεργετικές επιδράσεις σε καλλιεργούμενα φυτά όχι μόνο μέσω δέσμευσης αζώτου από την ατμόσφαιρα αλλά και με την παραγωγή ενώσεων που έχουν ιδιότητες βιολογικού ελέγχου παθογόνων και νηματωδών. Έχει βρεθεί ότι εμβολιασμός σε ρύζι μπορεί να αυξήσει την παραγωγή σπέρματος μέχρι και 0,8 τόνους ανά εκτάριο και να εξοικονομήσει 25-30 kg αζώτου ανά εκτάριο από τη χρήση λιπασμάτων. Στο *B. vietnamiensis* διαπιστώθηκε ότι η παρουσία του στην επιφάνεια της ρίζας δεσμεύει το 19% του αζώτου για φυτό ρυζιού σε ελεγχόμενες συνθήκες ενώ η ίδια τιμή για ενδοφυτικό *Burkholderia* spp. είναι πολύ μεγαλύτερη (Kennedy *et al*., 2004). Στα *B. vietnamiensis, B. unamae, B. phymatum, B. xenovorans* και *B. caribiensis* έχει διαπιστωθεί η έκφραση της απαμινάσης του ACC. Η αποδόμηση του ACC έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών (Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado, 2005). Βακτήρια του γένους *Burkholderia* έχει βρεθεί ότι συνθέτουν σαλικυλικό οξύ και πυρρολνιτρίνη. Η πυρρολνιτρίνη έχει ευρεία δράση έναντι ορισμένων μυκητιακών φυτοπαθογόνων όπως οι *Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea, Verticillium dahliae* και *Sclerotinia sclerotiorum* (Bally & Elmerich, 2007). Το *Burkholderia phytofirmans* PsJN επάγει τη διασυστηματική αντοχή σε αμπέλι έναντι του *Botrytis cinerea* και σε τομάτα έναντι του *Verticllium dahliae* (Compant *et al*., 2005).

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

A.3.2.8 *Aquaspirillum*

Τα μέλη του γένους *Aquaspirillum* είναι αερόβια, ελικοειδή ραβδία τα οποία κατατάσσονται στα β-Πρωτεοβακτήρια. Απομονώνονται, κυρίως, από τρεχούμενα ύδατα όπως κανάλια, χαντάκια και βόθροι (Pot *et al*., 2006). Πρόσφατα, απομονώθηκε και ένα στέλεχος το οποίο είχε ενδοφυτική δράση στο φυτό *Bambusa blumeana* (μπαμπού) και το οποίο επιδεικνύει αζωτοδεσμευτική δράση (Wei *et al*., 2007). Αζωτοδεσμευτικά είναι, επίσης, τα *Aquaspirillum peregrinum* subsp. *peregrinum, A. peregrinum* subsp. *integrum, A. fasciculus* καθώς και ορισμένα στελέχη των *A. itersonii* subsp. *itersonii* και *A. itersonii* subsp. *nipponicum*. Το γένος *Aquaspirillum* είναι ιδιαίτερα ετερογενές και παρουσιάζει δυσκολίες στην ταξινόμησή του (Pot *et al*., 2006). Σύμφωνα με πρόσφατη ταξινόμηση, τα αζωτοδεσμευτικά είδη του γένους έχουν μεταφερθεί σε άλλα γένη. Συγκεκριμένα, το *Aquaspirillum peregrinum* μεταφέρθηκε στο γένος *Insolitispirillum*, το *Aquaspirillum*

itersonii στο γένος *Novispirillum* και το *Aquaspirillum fasciculus* στο γένος *Prolinoborus* (Neisseriaceae). Αξίζει να αναφερθεί ότι τα γένη *Insolitispirillum* και *Novispirillum* είναι νεοσύστατα (2007) και ότι ανήκουν στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων αν και το *Aquaspirillum* ανήκει στα β-Πρωτεοβακτήρια (Yoon *et al*., 2007).

A.3.2.9 *Alcaligenes*

Το γένος *Alcaligenes* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1919 και από τότε έως σήμερα έχει υποστεί πολλές ανακατατάξεις. Πλέον, περιλαμβάνει δύο είδη, το *Alcaligenes faecalis* (με δύο υποείδη *A. faecalis* subsp. *faecalis* και *A. faecalis* subsp. *parafaecalis*) και το *Alcaligenes defragrans* (Busse & Stolz, 2006). Ένα τρίτο είδος, το [*Alcaligenes*] *latus*, για το οποίο είχε ανιχνευθεί αζωτοδέσμευση, κατά τους Xie & Yokota (2005b) μεταφέρεται στο είδος *Azohydromonas lata* ενώ κατά τους Busse & Stolz (2006) έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τα *Rubrivivax gelatinosus* και *Leptothrix discophora*. Ανακατάταξη έχει πραγματοποιηθεί και στο στέλεχος *Alcaligenes faecalis* A15 το οποίο αναγνωρίστηκε ως *Pseudomonas stutzeri* (Vermeiren *et al*., 1999).

Τα βακτήρια του γένους *Alcaligenes* είναι Gram αρνητικά αυστηρώς αερόβια ραβδία (ή κόκκοι) τα οποία είναι κινητά μέσω 1-9 πλευρικών μαστίγιων και ανήκουν στα β-Πρωτεοβακτήρια (Busse & Stolz, 2006). Το είδος *Alcaligenes faecalis* παρουσιάζει αζωτοδεσμευτικές ιδιότητες και πιθανώς να προωθεί την ανάπτυξη του ρυζιού και άλλων φυτών μέσω παραγωγής ινδολοξικού ή/και απαμινάσης του ACC (Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado, 2005, Elmerich, 2007, Spaepen *et al*., 2007).

Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Β.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη απομονώθηκαν από το Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Κεφαλογιάννη Η. (2008). Για τα στελέχη αυτά πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της αζωτοδεσμευτικής τους ικανότητας βάσει της δραστηριότητας της νιτρογενάσης με τη μέθοδο αναγωγής ακετυλενίου σε αιθυλένιο με αέριο χρωματογράφο Perkin-Elmer F-11 (> 10nmoles αιθυλένιο).

Α/Α	Στέλεχος	Αρχική αρίθμηση στελέχους	Τοποθεσία	Είδος φυτού	Ποικιλία	Παρατηρήσεις
1	**1**	LMG 1231	Σκούρτα, Βοιωτίας	*Triticum durum*	Vitron	ριζόσφαιρα
2	**2**	LMG 1232	Σκούρτα, Βοιωτίας	*Triticum durum*	Vitron	επιφάνεια ρίζας
3	**3**	LMG 2211	Κωπαΐδα, Βοιωτίας	*Triticum durum*	mexicalli	ριζόσφαιρα
4	**4**	LMG 2212	Κωπαΐδα, Βοιωτίας	*Triticum durum*	mexicalli	επιφάνεια ρίζας
5	**6**	LMG 2213.1	Κωπαΐδα, Βοιωτίας	*Triticum durum*	mexicalli	ενδοφυτικό
6	**16**	LMG 1221.1	Σκούρτα, Βοιωτίας	*Triticum durum*	capeiti	έδαφος ρίζας
7	**17**	LMG 1221	Σκούρτα, Βοιωτίας	*Triticum durum*	capeiti	έδαφος ρίζας
8	**18**	LMG 1221.2	Σκούρτα, Βοιωτίας	*Triticum durum*	capeiti	έδαφος ρίζας
9	**19**	LMG 1221.3	Σκούρτα, Βοιωτίας	*Triticum durum*	capeiti	έδαφος ρίζας
10	**20**	LMG 1221.3u	Σκούρτα, Βοιωτίας	*Triticum durum*	capeiti	έδαφος ρίζας
11	**21**	LMG 1221.3r	Σκούρτα, Βοιωτίας	*Triticum durum*	capeiti	έδαφος ρίζας
12	**25**	LMG 3211	Δομοκός, Φθιώτιδος	*Triticum durum*	mexicalli	έδαφος ρίζας
13	**26**	LMG 3212	Δομοκός, Φθιώτιδος	*Triticum durum*	mexicali	επιφάνεια ρίζας
14	**27**	LMG 4221	Θεσ/νίκη	*Triticum durum*	capeiti	έδαφος ρίζας
15	**28**	LMG 4222	Θεσ/νίκη	*Triticum durum*	capeiti	επιφάνεια ρίζας
16	**31**	LMG 6211	Κιλελέρ, Λάρισας	*Triticum durum*	mexicalli	έδαφος ρίζας
17	**32**	LMG 6212	Κιλελέρ, Λάρισας	*Triticum durum*	mexicalli	επιφάνεια ρίζας

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν επίσης ορισμένα βακτηριακά στελέχη, τα οποία αποτελούν μοντέλα έρευνας, προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση με τα υπό μελέτη στελέχη της εργασίας. Συγκεκριμένα, παρελήφθησαν από την εταιρεία BCCM™/LMG σε λιοφιλιωμένη μορφή τα εξής στελέχη:

Azospirillum brasilense LMG 13127^{T} = ATCC29145 = CECT 590 = DSM 1690 = JCM 1224 = NCIB 11860 = Döbereiner Sp7 = Vlassak 002 = LMG 1263.

Azospirillum lipoferum LMG 13128^{T} = ATCC 29707 = Döbereiner Sp 59b = Krieg VPI Sp59b.

Pseudomonas stutzeri LMG 10652 = You A15

Pseudomonas stutzeri DSMZ 4166 (εταιρεία DSMZ)

Η εταιρεία παροχής των στελεχών πρότεινε τα **θρεπτικά μέσα** Oxoid CM3 (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β') για το *A. brasilense*, Oxoid CM131 (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β') για το *A. lipoferum* και μία παραλλαγή του Oxoid CM3 για το *Pseudomonas stutzeri* (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β').

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

Β.2 Απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων

Β.2.1 Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από Gram (-) βακτήρια

Μία μεμονωμένη αποικία του κάθε στελέχους χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 20 ml θρεπτικού υλικού Oxoid CM3 και ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση στους 30°C για 24 ώρες.

1. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές ανά λεπτό (στρ./λεπτό) για 10 λεπτά και επαναδιαλύθηκαν σε 5 ml διαλύματος **TE**[3]. Ακολούθησε καλή ανάμειξη.
2. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και πάλι με φυγοκέντρηση, επαναδιαλύθηκαν σε 3 ml διαλύματος TE και προστέθηκαν 0,3 ml διάλυμα **λυσοζύμης**[6].
3. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 20 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκε 0,5 ml από το διάλυμα LauroSarkosyl/Proteinase K (10% LauroSarkosyl με 5mg/ml Proteinase K σε TE). Το μίγμα αναδεύτηκε καλά και επωάστηκε στους 37°C για μία ώρα λαμβάνοντας ιξώδη μορφή.
4. Στη συνέχεια έγινε καθαρισμός με **φαινόλη/χλωροφόρμιο**[1] και το τελικό υπερκείμενο μίγμα διαμοιράστηκε ανά 500 μl σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες.
5. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 50 μl **3M οξικού νατρίου**[2] **pH: 4,8** και 1 ml, περίπου, ισοπροπανόλης και τοποθετήθηκαν στους –20°C για 18 ώρες.

6. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ./λεπτό για 20 λεπτά στους 4°C και το ίζημα που συλλέχθηκε από όλα τους δοκιμαστικούς σωλήνες επαναδιαλύθηκε σε 500 μl TE. Προστέθηκαν 50 μl 3M οξικού νατρίου pH: 4,8 και 1 ml ισοπροπανόλης και τοποθετήθηκε στους -20°C για τουλάχιστον 1 ώρα.
7. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε όπως και πριν και το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% αιθανόλη.
8. Μετά από φυγοκέντρηση το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 500 μl TE και προστέθηκαν 3 μl πυκνού διαλύματος RNάσης συγκέντρωσης 20 mg/ml. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 20 λεπτά και στη συνέχεια καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο.
9. Στο τελικό υπερκείμενο που περιείχε το χρωμοσωμικό DNA προστέθηκε και πάλι οξικό νάτριο σε όγκο ίσο με το 1/10 του όγκου του υπερκείμενου και διπλάσιος όγκος αυτού ισοπροπανόλη.
10. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 4°C, ξέπλυμα με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση του τελικού ιζήματος (χρωμοσωμικό DNA) σε διάλυμα TE.

Β.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli*

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* γίνεται με δύο μεθόδους:

i) Μέθοδος του βρασμού (Holmes & Quigley, 1981)

1. 5 ml θρεπτικού υλικού LB**,** που περιέχουν το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ Β΄, Γ΄), εμβολιάζονται με μεμονωμένη αποικία μετασχηματισμένων, με το προς απομόνωση πλασμίδιο, κυττάρων *E. coli*. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 37°C για περίπου 16 ώρες.
2. Από την καλλιέργεια αυτήν 1,5 ml μεταφέρεται σε σωλήνα eppendorf και φυγοκεντρείται στις 6.000 στρ./λεπτό για 5 λεπτά.
3. Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά αφήνοντας το ίζημα των κυττάρων όσο το δυνατόν πιο στεγνό.
4. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 150 μl διαλύματος **STET**[4] παρουσία λυσοζύμης (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml.
5. Ακολουθεί βρασμός του δείγματος για 45 δευτερόλεπτα και μετά φυγοκέντρησή του στις 13.000 στρ./λεπτό για 20 λεπτά.
6. Μετά τη φυγοκέντρηση, το ίζημα που αποτελείται από τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνεται. Για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA προστίθενται στο υπερκείμενο 180 μl ισοπροπανόλης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ. /λεπτό για 5 λεπτά.
7. Αφού το ίζημα ξεπλυθεί με 70% αιθανόλη και στεγνώσει στον αέρα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος TE.

ii) με QIAprep Miniprep (QIAGEN)

1. 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχουν αμπικιλίνη εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E. coli,* τα οποία έχουν μετασχηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Ακολουθεί επώαση με συνεχή ανακίνηση στους 37°C για περίπου 16 ώρες.
2. 2-5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα eppendorf και φυγοκεντρούνται στις 13.000 στρ./λεπτό για 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 250 μl διαλύματος P1 (περιέχει RNAse A).
4. Προστίθενται 250 μl διαλύματος P2 (περιέχει NaOH), το δείγμα αναδεύεται απαλά και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα λιγότερο από 5 λεπτά.
5. Προστίθενται 350 μl διαλύματος εξουδετέρωσης N3 (περιέχει οξικό οξύ και γουανιδίνη-HCl), ακολουθεί ανάμιξη και φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ./λεπτό για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και μεταφέρεται στην στήλη QIAprep.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ./λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη πετάγεται, σε αυτό το στάδιο το πλασμιδιακό DNA έχει προσδεθεί στην στήλη.
9. Προστίθενται 350 μl διαλύματος PE (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ./λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, το διάλυμα που διαπερνά την στήλη απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση, ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα PE καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
10. Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε σωλήνα eppendorf. Για την έκλουση του DNA προστίθεται ddH_2O ή διάλυμα 30 μl EB (10 mM Tris-HCl, pH: 8.5).
11. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό στις 13.000 στρ./λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

Β.3 Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων

Β.3.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα τους γίνεται φωτομετρικά με τη χρήση σπεκτροφωτόμετρου nanodrop (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer). Πριν από τη μέτρηση επιλέγεται στο λογισμικό της συσκευής από τον χειριστή η ένδειξη DNA.

- Για τον μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται ποσότητα 1 μl του εκάστοτε διαλύτη (H_2O ή TE).

- Φωτομετρείται ποσότητα δείγματος 1 μl και λαμβάνονται οι λόγοι OD_{260}/OD_{280} και OD_{260}/OD_{230} βάσει των οποίων γίνεται η εκτίμηση της καθαρότητας των δειγμάτων των νουκλεϊνικών οξέων.
- Ικανοποιητικής καθαρότητας θεωρείται ένα δείγμα DNA όταν ο λόγος OD_{260}/OD_{280} είναι περίπου 1,8. Μικρότερες τιμές της τιμής αυτής αποτελούν ένδειξη μόλυνσης, π.χ. από την παρουσία πρωτεϊνών, φαινόλης ή άλλων ουσιών που απορροφούν στα 280nm.
- Ο λόγος OD_{260}/OD_{230} αποτελεί ένα δεύτερο μέτρο της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων. Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας ο λόγος αυτός είναι συνήθως υψηλότερος από τις αντίστοιχες τιμές του OD_{260}/OD_{280} και κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,2. Μικρότερες τιμές αποτελούν συνήθως ένδειξη μόλυνσης.

Β.3.2 Πέψη DNA με χρήση ένζυμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού

Οι πέψεις των δειγμάτων DNA γίνονται σε τελικό όγκο ο οποίος εξασφαλίζει την πραγματοποίηση των αντιδράσεων. Ο όγκος αυτός καθορίζεται τόσο από την ποσότητα και καθαρότητα του DNA όσο και από τη ποσότητα του ένζυμου περιορισμού το οποίο χρησιμοποιείται κάθε φορά. Συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 20–100 μl.

1. Σε σωλήνα eppendorf τοποθετείται το δείγμα του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για τη δράση του ένζυμου και η ενδονουκλεάση περιορισμού. Συνήθως, χρησιμοποιείται μια μονάδα ένζυμου (1 unit) ανά μικρογραμμάριο δείγματος DNA. Εάν το δείγμα του DNA περιέχει υπολείμματα RNA προστίθεται επιπλέον και RNAse A. Τέλος, προστίθεται ddH_2O μέχρι τον επιθυμητό όγκο.

   Σε μία τυπική αντίδραση πέψης τελικού όγκου 30 μl αναμιγνύονται:

   - Διάλυμα DNA 1μg (σε νερό ή TE) έως 10 μl
   - **10x ρυθμιστικό διάλυμα ένζυμου** 3 μl
   - Ένζυμο περιορισμού (1 unit/μl) 1 μl
   - **RNAse A[7] (1 mg/ml)** 0,5 μl
   - ddH_2O έως τελικό όγκο 30 μl

2. Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται στην κατάλληλη θερμοκρασία για 3-4 ώρες. Στον πίνακα Β.1 αναφέρονται, ενδεικτικά, κάποιες ενδονουκλεάσες περιορισμού, οι θέσεις αναγνώρισης της νουκλεοτιδικής ακολουθίας καθώς και η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ένζυμου.
3. Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

Πίνακας Β.1: Ενδονουκλεάσες περιορισμού

Ενδονουκλεάση Περιορισμού	Αλληλουχία αναγνώρισης	Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης (°C)
BamHI	G/GATCC	37
EcoRI	G/AATTC	37
EcoRV	GAT/ATC	37
HindIII	A/AGCTT	37
SacI	GAGCT/C	37
SalI	G/TCGAC	37
PstI	CTGCA/G	37
XhoI	C/TCGAG	37

/ : ορισμός σημείου πέψεως στην αλληλουχία

Β.3.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση 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 έως 100Kb. Στον πίνακα Β.2 αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Πίν. Β.2 Συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού

Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων (kb)
0.3	1.7-70
0.5	0.7-45
0.8	0.4-20
1.0	0.3-10
1.2	0.2-8
1.5	0.2-6
2.0	0.1-5

Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη **βρωμιούχου αιθιδίου**[9], το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης γίνεται ως εξής:

1. Ποσότητα αγαρόζης αναμειγνύεται, σε κωνική φιάλη Erlenmeyer, με ορισμένο όγκο διαλύματος ηλεκτροφόρησης **1xTAE**[8]. Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε είναι 1%, η οποία έχει εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων από 0,3 έως 10 kb.
2. Η φιάλη με την αγαρόζη και το διάλυμα TAE θερμαίνεται σταδιακά σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου η αγαρόζη διαλυθεί εντελώς.
3. Η θερμοκρασία του διαλύματος αφήνεται να πέσει έως τους 60°C και αφού προστεθεί διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη συσκευή προσαρμόζεται η κατάλληλη ″χτένα″ έτσι ώστε να σχηματιστούν, στην πηκτή, τα βοθρία φόρτωσης.
4. Η ″χτένα″ απομακρύνεται από την πηκτή. Η συσκευή συμπληρώνεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE έτσι ώστε η πηκτή να παραμένει βυθισμένη 1-2 mm από την επιφάνειά του.
5. Τα δείγματα των νουκλεοξέων, αφού αναμιχθούν σε ρυθμιστικό **διάλυμα φόρτωσης**[10], τοποθετούνται στις εγκοπές της πηκτής. Στη συνέχεια εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής κατάλληλη τάση .

Β.3.4 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης

Η ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης γίνεται με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) σύμφωνα με την εξής διαδικασία:

1. Από την πηκτή αγαρόζης απομονώνεται, με την χρήση καθαρού νυστεριού, το τμήμα εκείνο το οποίο περιέχει την επιθυμητή ζώνη DNA. Το κομμάτι αυτό τοποθετείται σε σωλήνα eppendorf ζυγίζεται και προστίθενται τρεις όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος QG (για παράδειγμα για 100 mg πηκτής αγαρόζης απαιτούνται 300 μl διαλύματος QG).
2. Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 10 λεπτά έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη.
3. Στο διάλυμα προστίθεται ένας όγκος ισοπροπανόλης, το μίγμα ανακινείται ήπια, μεταφέρεται σε φορτισμένη στήλη QIAquick και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 13.000 στρ./λεπτό.
4. Το υγρό αδειάζεται και η στήλη ξεπλένεται με 0,75 ml ρυθμιστικού διαλύματος PE και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.
5. Πραγματοποιείται μια επιπλέον φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.

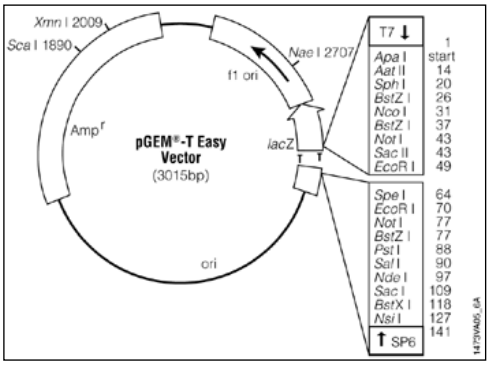
6. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf και το DNA εκλούεται με την προσθήκη στη στήλη 50 μl διαλύματος EB ή ddH_2O και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.

Β.4 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα

Β.4.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα

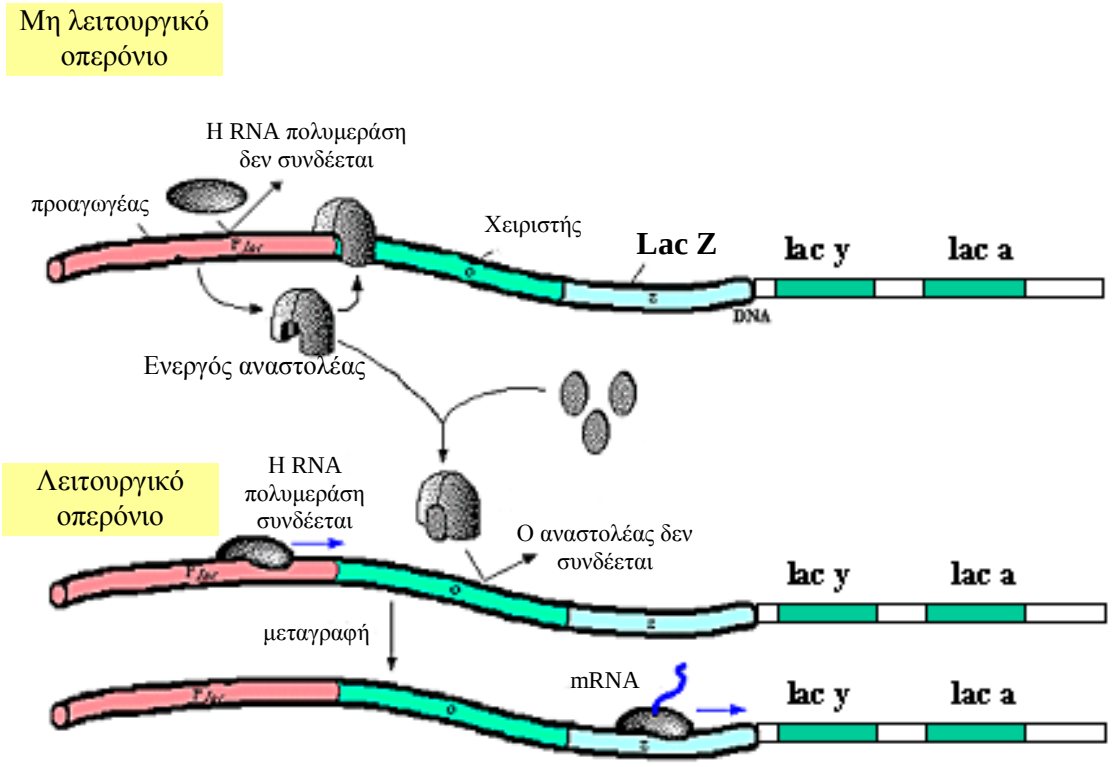
Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι ο **pGEM-T (Promega)** (Εικ. Β.1). Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε ο συγκεκριμένος φορέας είναι η υποκλωνοποίηση DNA τμημάτων προκειμένου να γίνει ευκολότερος ο χειρισμός τους και να επιτραπεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεών τους και γενικότερα ο χαρακτηρισμός τους.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά του φορέα είναι τα εξής: οι πλασμιδιακοί φορείς pGEM-T διαθέτουν μια αρχή αντιγραφής (ori), τμήμα του γονιδίου *lacZ* του *E. coli* , που κωδικοποιεί για το α-πεπτίδιο του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Επιπλέον, φέρουν μια πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (πολυσύνδεσμος) εντός του γονιδίου αυτού *lacZ* καθώς και



Εικ. Β.1 Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα **pGEM-T easy (Promega)**

τους προαγωγείς της RNA πολυμεράσης, T7 και SP6, οι οποίοι βρίσκονται ένθεν και ένθεν του πολυσυνδέσμου. Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο των παραπάνω προαγωγέων ενώ η μεταγραφή μπορεί και επάγεται παρουσία του χημικού ανάλογου της λακτόζης IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοσίδιο) (Εικ. Β.2). Η β-γαλακτοσιδάση μεταβολίζει την οργανική ένωση X-gal, παράγοντας μια αδρανή μπλε ουσία. Η ένθεση ξένου DNA στην περιοχή του πολυσυνδέσμου, ωστόσο, διακόπτει τη μεταγραφή του γονιδίου *lacZ* με αποτέλεσμα την αδυναμία μεταβολισμού της X-gal και, κατά συνέπεια, την απουσία ανάπτυξης μπλε χρώματος στις βακτηριακές καλλιέργειες. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τον εντοπισμό των ανασυνδυασμένων κλώνων με βάση το χρώμα των αποικιών όταν σε αυτές προστεθεί X-gal και IPTG. Επίσης, οι συγκεκριμένοι φορείς φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, γεγονός που επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων με αυτούς βακτηριακών κυττάρων.



Εικόνα Β.2 Επαγωγή του οπερονίου της λακτόζης

Β.4.2 Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Τμήματα DNA τα οποία προκύπτουν από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης φέρουν κολλώδη άκρα, οπότε για την κλωνοποίησή τους χρησιμοποιείται ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy (Promega). Ο φορέας έχει υποστεί πέψη με ένζυμο περιορισμού EcoRV και στα τυφλά άκρα που δημιουργήθηκαν προστέθηκαν βάσεις θυμίνης, ώστε να αποφευχθεί η επανασυγκόλλησή τους και να βελτιωθεί η ενσωμάτωση του ένθετου τμήματος στον πλασμιδιακό φορέα.

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

Η αντίδραση ενσωμάτωσης περιλαμβάνει:

- DNA πλασμιδιακός φορέας 1 μl
- DNA ένθεσης 1 μl
- **10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης**[11] 1 μl

- Ένζυμο λιγάση T4 (1 unit/μl) 1 μl
- ddH_2O έως 10 μl

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες ή στους 4°C για 16 ώρες.

Β.5 Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli*

Β.5.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων *E. coli*

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E. coli* XL-blue, το οποίο καλλιεργήθηκε σε υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ Β΄, Γ΄). Η ανάπτυξή του πραγματοποιήθηκε στους 37°C σε επωαστικούς θαλάμους για περίπου 16 ώρες. Για τις υγρές καλλιέργειες η επώαση πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση.

Β.5.2 Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασχηματισμό (Competent cells)

1. 10 ml LB θρεπτικού υλικού εμβολιάζονται με μια αποικία *E. coli* (XL-blue) και επωάζονται, με ανακίνηση, για περίπου 18 ώρες στους 37°C.
2. 2 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 37°C για 2 περίπου ώρες ($O.D._{600}$=0,3-0,4).
3. Οι χειρισμοί οι οποίοι ακολουθούν παρακάτω γίνονται ή στον πάγο ή στους 4°C. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6.000 στρ./λεπτό για 10 λεπτά.
4. Το ίζημα των κυττάρων αφού επαναδιαλύεται με ήπια ανάδευση σε 25 ml 0,1 M $MgCl_2$, φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 6.000 στρ./λεπτό.
5. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 25 ml 0,1 M $CaCl_2$ και διατηρείται σε πάγο για 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 6.000 στρ./λεπτό.
6. Τα ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 ml 0,1 M $CaCl_2$ και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v). Τα κύτταρα αφού τοποθετηθούν σε σωλήνες eppendorf φυλάσσονται στους -80°C.

Β.5.3 Μετασχηματισμός ικανών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδια

1. Σε σωλήνα eppendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 100 μl ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων από το κατάλληλο στέλεχος *E. coli*.
2. Προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακού DNA σε όγκο που δε πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των προς μετασχηματισμό κυττάρων.
3. Το μίγμα κυττάρων-πλασμιδιακού DNA επωάζεται στον πάγο για περίπου μισή ώρα.

4. Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα επιτυγχάνεται με την υποβολή τους σε θερμικό σοκ στους 42°C για 1-2 λεπτά και την απ' ευθείας μεταφορά τους στη συνέχεια στον πάγο για 1 λεπτό.
5. Προστίθενται 200 μl LB θρεπτικού διαλύματος (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄) και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 1 ώρα.
6. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη για τον φορέα pGEM-T Easy) (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ Β΄, Γ΄) για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.
7. Στην περίπτωση όπου σκοπός είναι η επιλογή των αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, προστίθενται στα κύτταρα 10 μl **IPTG 100 mM**[12] και 50 μl **X-Gal 2%**[13] (w/v). Οι αποικίες που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, λόγω της διακοπής του γονιδίου που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση από το ένθεμα, εμφανίζονται λευκές. Αντίθετα, οι αποικίες με τα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια, λόγω της δράσης του ένζυμου, αναπτύσσουν μπλε χρώμα.

Β.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Β.6.1 Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική αυτή (Mullis *et al*., 1986, Mullis & Faloona, 1987) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης ακολουθιών DNA και RNA, in vitro ή και in situ. Η βασική αρχή της PCR βασίζεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA. Το εκμαγείο του DNA αρχικά αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία 94°C σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Δύο μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), τα οποία καθορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής, υβριδίζονται με το εκμαγείο, ένα με κάθε αλυσίδα. Κατά το σχεδιασμό των εκκινητών θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη τα εξής:

1. Το μέγεθος των εκκινητών πρέπει να είναι τέτοιο (15-30 νουκλεοτίδια) ώστε η θερμοκρασία για τον υβριδισμό τους στο DNA να είναι λογική.

2. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή να είναι μοναδική και να υβριδίζεται σε μια μόνο περιοχή του DNA.

3. Οι εκκινητές δε θα πρέπει να έχουν δευτεροταγή δομή. Στην αντίδραση PCR, όπου χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών, δε θα πρέπει τα 3΄-άκρα τους να είναι συμπληρωματικά.

4. Η σύνθεση των βάσεων των εκκινητών θα πρέπει να είναι περίπου 50% σε GC και 50% σε AT.

5. Ο κάθε εκκινητής θα πρέπει να περιέχει στα άκρα του G ή C.

6. Στην περίπτωση που οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες των εκκινητών δεν είναι πλήρως συμπληρωματικές με το DNA η μετάλλαξη ή οι μεταλλάξεις είναι συνήθως στο μέσο του εκκινητή ή τουλάχιστον 12 νουκλεοτίδια από το 3΄-άκρο.

Ακολούθως, μια 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 που είναι δίκλωνο. Για τη σύνθεση αυτή απαραίτητη είναι η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων και ιόντων Mg^{+2}. Αρχικά για την PCR χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση του *E. coli* αλλά το ένζυμο αυτό είναι θερμοευαίσθητο και καταστρέφεται στις θερμοκρασίες εκείνες που απαιτούνται για την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA. Συνήθως χρησιμοποιείται η DNA πολυμεράση, που έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, και έχει άριστη θερμοκρασία δραστηριότητας στους 72°C. Η δραστηριότητα της αναφερόμενης ως *Taq* πολυμεράσης παραμένει σε υψηλά επίπεδα μετά από επανειλημμένη αύξηση της θερμοκρασίας στους 94°C. Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες μπορεί να επεκτείνονται πέρα από την αλληλουχία βάσεων που ορίζεται από τον άλλο εκκινητή και, ως εκ τούτου, δημιουργούνται καινούριες θέσεις υβριδισμού των εκκινητών. Στη συνέχεια, οι αρχικές αλυσίδες, καθώς και οι νεοσυντιθέμενες, αφού πρώτα αποδιαταχθούν με θέρμανση στους 94°C, μπορούν να χρησιμεύσουν ξανά ως μήτρες αντιγραφής όπου θα υβριδιστούν οι εκκινητές. Εάν αυτός ο κύκλος επαναληφθεί ν φορές, τότε το τελικό αποτέλεσμα θα είναι η σύνθεση 2^{ν} δίκλωνων μορίων DNA που αποτελούν αντίγραφα της αλληλουχίες ανάμεσα από τους εκκινητές και περιέχουν 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 παρεμποδιστών της πολυμεράσης. Η εξειδίκευση του προϊόντος εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία υβριδισμού και από την εξειδίκευση των θέσεων υβριδισμού των συγκεκριμένων εκκινητών στη μήτρα του DNA.

Β.6.2 Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμημάτων DNA απευθείας από το DNA των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών. Η νουκλεοτιδική ακολουθία των εκκινητών αναφέρεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων.

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποιήσεως μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Συγκεκριμένα, η ποσότητα της μήτρας DNA, που προστίθεται κάθε φορά, εξαρτάται από το είδος του και συγκεκριμένα στην περίπτωση γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιείται ποσότητα ίση περίπου με 1μg. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεώς τους (Tm).

Μία τυπική αντίδραση PCR πραγματοποιείται ως εξής:
Σε ειδικό σωλήνα eppendorf προστίθενται:

- γονιδιωματικό DNA 1 μg
- εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward**)** (10 μM) 1 μl
- εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης Reverse (10 μM) 1 μl
- μίγμα dNTPs (10 mM το καθένα) 1 μl
- **10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα**[14] 5 μl
- DMSO 2μl
- DyNAzyme II DNA πολυμεράση (FINNZYMES)(2 U/μl)[2] 0,5 μl
- ddH_2O έως τελικό όγκο 50 μl

Γενικά, οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι:

Αρχική αποδιάταξη	94°C για 2-4 λεπτά	
Αποδιάταξη	94°C για 1 λεπτό	35 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών	45-65°C για 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72°C για 1 λεπτό/1.3-15kb αναμενόμενου προϊόντος	
Τελική επιμήκυνση	72°C για 5-10 λεπτά	

Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών και είναι, συνήθως, 5°C κάτω από αυτήν. Οι εξειδικευμένες συνθήκες PCR, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε γονίδιο που μελετήθηκε, αναφέρονται στο κεφάλαιο *Αποτελέσματα.*

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

Β.7 Προετοιμασία δειγμάτων πρωτεϊνών για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης-SDS

1. Πρωτεΐνες, ανεξάρτητα του τύπου ιστού από τον οποίο εξάχθηκαν, αναμιγνύονται με ίσο όγκο (2X) **διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών**[15]. Στην περίπτωση ολικών βακτηριακών πρωτεϊνών το διάλυμα φόρτωσης αναμιγνύεται με ανέπαφα βακτηριακά κύτταρα, τα οποία έχουν συλλεχθεί με φυγοκέντρηση 5 λεπτά στις 6000στρ./λεπτό, αφού βέβαια αυτά έχουν πρώτα επανααιωρηθεί σε νερό. Το μίγμα αναδεύεται καλά.

[2] Στην περίπτωση ενίσχυσης μεγάλων τμημάτων DNA (>1000bp) στην παραπάνω αντίδραση χρησιμοποιείται 1 μL DNA πολυμεράσης DyNAzymes EXT (FINNZYMES) (1 U/μL).

2. Ο σωλήνας με το μίγμα τοποθετείται για 5 λεπτά σε νερό το οποίο βράζει. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στρ./λεπτό. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το δείγμα μπορεί να φυλαχτεί στους –20°C.

Β.8 Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος με κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, που επιβάλλει η παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS) (Laemmli, 1970). Οι πρωτεΐνες, κατά την έκθεσή τους στο αρνητικά φορτισμένο απορρυπαντικό SDS αποκτούν αρνητικό φορτίο, καθώς σε κάθε αμινοξύ δεσμεύεται ένα περίπου μόριο SDS. Συνεπώς, κατά την ηλεκτροφόρηση μετακινούνται προς τον θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους.

Κατά τη μέθοδο της κάθετη ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά σε πηκτή χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδη (πηκτή επιστοίβαξης) και στη συνέχεια διαχωρίζονται αφού περάσουν σε πηκτή υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδη (πηκτή διαχωρισμού).

Β.8.1 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Στον πίνακα Β.3 εμφανίζονται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής επιστοίβαξης και της πηκτής διαχωρισμού.

		Πηκτή διαχωρισμού							**Πηκτή επιστοίβαξης**
		7,5%	**10%**	**12,5%**	**15%**	**17,5%**	**20%**	**25%**	
1	**Ακρυλαμίδη[16] 30%**	7,5	10	12,5	15	17,5	20	25	1.3
2	**1% Bis-ακρυλαμίδη[17]**	5,2	3,9	3,1	2.6	2,2	1.9	1.5	1
3	**3 M Tris pH 8,8**	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	-
4	**1 M Tris pH 6,8**	-	-	-	-	-	-	-	1.25
5	**10% SDS**	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1
6	**dH_2O**	13,04	11,85	10,14	8,14	6,04	3.84	-	6.24
7	**TEMED**	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
8	**10% APS[18]**	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15

Πίνακας Β.3 Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης ανάλογα με την τελική συγκέντρωση σε ακρυλαμίδη.

Για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού αναμιγνύονται τα διαλύματα 1, 2, 3, 5 και 6 και στη συνέχεια προστίθενται τα διαλύματα 7 και 8. Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και εισάγεται αμέσως στο γυάλινο κάθετο καλούπι όπου αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, εισάγεται η πηκτή επιστοίβαξης, η οποία παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο με τη διαφορά ότι περιέχει το διάλυμα 4 αντί το 5. Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και εισάγεται στο γυάλινο κάθετο

καλούπι. Πριν ξεκινήσει ο πολυμερισμός, στην κορυφή της πηκτής εισάγεται κατάλληλος υποδοχέας (χτένα) ώστε να δημιουργηθούν τα κανάλια-θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε περίπου 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά τον πολυμερισμό και της πηκτής επιστοίβαξης η πηκτή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Β.8.2 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα αναμιγνύονται με **ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης**[19] που περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη και θερμαίνονται στους 100°C για 5 λεπτά. Οι συνθήκες αυτές είναι αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες, αφού ο βρασμός παρουσία SDS έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των ασθενών δεσμών (υδρογόνου, ιοντικών, υδρόφοβων και Van der Waals αλληλεπιδράσεων) ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη, ως αναγωγικό μέσο, προκαλεί αναγωγή των ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών. Το ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης περιέχει και τη χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας της εξέλιξης της ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα, ακολούθως, φυγοκεντρούνται στις 13.000 στρ./λεπτό για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος φορτώνονται στα βοθρία της πηκτής.

Β.8.3 Ηλεκτροφόρηση και ανίχνευση ζωνών μέσω βαφής με Coomassie Brilliant Blue R-250.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται αρχικά στα 90Volts για όσο διατρέχουν την πηκτή επιστοίβαξης και αμέσως μετά στα 140 Volts, σε **1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης**[20] πρωτεϊνών. Οι ζώνες των πρωτεϊνών εμφανίζονται μετά από χρώση της πηκτής σε **διάλυμα χρώσης**[21] για 30 λεπτά, στους 60°C, με ελαφρά ανακίνηση ή ολονυκτίως σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί αποχρωματισμός της πηκτής με εμβάπτισή της σε **διάλυμα αποχρωματισμού**[22] σε θερμοκρασία δωματίου, με ελαφρά ανακίνηση. Το διάλυμα αποχρωματισμού αντικαθίσταται με νέο ανά 1 ώρα, ωσότου απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής και φανούν καθαρά οι πρωτεϊνικές ζώνες.

Β.9 Σύγκριση ακολουθιών, φυλογενετική ανάλυση

Η αναζήτηση της ταυτότητας των υπό μελέτη ακολουθιών πραγματοποιήθηκε με σύγκριση αυτών με τις διαθέσιμες ακολουθίες της βάσης δεδομένων GenBank χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Aligment Tool, Altschul *et al*., 1990) του NCBI (National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Η μετάφραση των ακολουθιών σε αμινοξικές και η ανάλυσή τους έγινε με το πρόγραμμα ExPASy (**Ex**pert **P**rotein **A**nalysis **Sy**stem) (Gasteiger *et al*., 2003).

Οι ακολουθίες ευθυγραμμίστηκαν με τον αλγόριθμο CLUSTALW (Thompson *et al*., 1994) με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA4 (Tamura *et al*., 2007). Τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) έπειτα από υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al*., 2004) για την περίπτωση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και μέσω κατανομής Poisson (Zuckerkandl & Pauling, 1965β) για την περίπτωση των αμινοξικών αλληλουχιών. Η αξιοπιστία και η σταθερότητα των σχέσεων του δενδρογράμματος εκτιμήθηκε μέσω 1000 bootstrap δειγμάτων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

Σύνθεση Διαλυμάτων

Α. Διαλύματα απομόνωσης DNA

1. Φαινόλη και χλωροφόρμιο αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1. Το μίγμα εξισορροπείται με 100 mM Tris-HCl pH 8,3. ***Φαινόλη:*** η φαινόλη θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 65-68°C έως ότου υγροποιηθεί. Σε 200 ml υγρή φαινόλης προστίθενται 50 ml 500 mM Tris-HCl pH 8,3. Ακολουθεί καλή ανάδευση και οι δύο φάσεις αφήνονται να διαχωριστούν. Η άνω φάση αφαιρείται και προστίθενται 50 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,3. Ακολουθεί καλή ανάδευση και διαχωρισμός των δύο φάσεων. Το τελευταίο αυτό βήμα επαναλαμβάνεται έως ότου το pH φθάσει στο 8. Η φαινόλη φυλάσσεται στους 4°C.

2. 3M οξικό νάτριο pH 4,8:

Σε τελικό όγκο 1 lt H_2O διαλύονται 246,09 g άνυδρο οξικό νάτριο (BDH). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 4,8 με την προσθήκη πυκνού οξικού οξέος (BDH). Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Δ. Διαλύματα απομόνωσης DNA

3. TES:

Tris 10mM pH:8, EDTA 25mM, NaCl 150mM

4. STET:

8% σακχαρόζη, 5% Triton x 100 (BDH), 50 mM Tris- HCl pH 8,0, 50 mM EDTA.

5. TE:

10 mM Tris- HCl pH 8,0, 1 mM EDTA.

6. Λυσοζύμη:

50 mg λυσοζύμης (Boehringer-Mannheim) διαλύονται σε 1 ml dH_2O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

Ε. Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων

7. RNAse A:

10 mg RNase A διαλύονται σε 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5/15 mM NaCl. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100°C για 15 λεπτά, με σκοπό την αδρανοποίηση τυχόν δράσης DNase, αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσεται στους -20°C.

8. 1x TAE:

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 50x TAE το οποίο αραιώνεται 50 φορές. ***50x TAE:*** διαλύονται 242 g Tris base, 57,1 ml οξικού οξέος και 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 σε ddH_2O, μέχρι τελικό όγκο 1 lt.

9. Βρωμιούχο αιθίδιο:

Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε dH_2O και φυλάσσεται στους 4°C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0,5 μg/ml.

10. Διάλυμα φόρτωσης:

0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου και 30% γλυκερόλη.

ΣΤ. Διαλύματα υποκλωνοποίησης τμημάτων DNA

11. 10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης:

0,66 M Tris-HCl pH 7,6, 50 mM $MgCl_2$, 50 mM DTT, 10 mM ATP. Το πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης φυλάσσεται σε μικρές ποσότητες στους -20°C.

Ζ. Διαλύματα μετασχηματισμού κυττάρων *E.coli*

12. 100 mM IPTG:

23,8g IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, SIGMA) διαλύονται σε 1 ml ddH_2O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0,22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20°C.

13. 2% X-Gal:

0,02 g X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactosidase, SIGMA) προστίθενται σε 1 ml διμεθυλ-φορμαμίδιο (Sigma).

Η. Διαλύματα αντίδρασης PCR

14. 10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα:

100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 0,1% (w/v) gelatin (BDH).

ΙΑ. Διαλύματα απομόνωσης ολικών πρωτεϊνών από βακτήρια

15. Διάλυμα φορτώσεως πρωτεϊνών (2Χ):

4% SDS, 10% Μερκαπτοαιθανόλη, 20% γλυκερόλη, 0,1 M Tris pH: 6,8

ΙΒ. Διαλύματα ανάλυσης πρωτεϊνών

16. 30% Ακρυλαμίδη:

60 g ακρυλαμίδης (Boehringer-Mannheim) διαλύονται σε 200 ml dH_2O. Το διάλυμα αναδεύεται παρουσία ιοντοανταλλακτικής ρητίνης για 30 λεπτά, φιλτράρεται και φυλάσσεται στους 4°C.

17. 1%-BIS ακρυλαμίδη:

0,5 g BIS-ακρυλαμίδης (Boehringer-Mannheim) διαλύονται σε 50 ml dH_2O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

18. 10% APS

1 gr APS (Amonium Persulfate, BDH) διαλύεται σε 10 ml dH_2O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

19. Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης:

4% SDS, 10% β-μερκαπτοαιθανόλη, 20% γλυκερόλη, 0,1 M Tris pH 6,8 και 0,0005% χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης

20. 1x Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης:

Αρχικά παρασκευάζεται 10x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, το οποίο αραιώνεται 10 φορές. ***10x Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης:*** 144 g/lt γλυκίνη, 30,25 g/lt Tris και 10 g/lt SDS.

21. Διάλυμα χρώσης:

450 g/lt μεθανόλη (BDH), 100 ml/lt οξικό οξύ (BDH), 0,25 g/lt Coomasie Brilliant Blue R250 (USB).

22. Διάλυμα αποχρωματισμού:

30% Μεθανόλη (BDH), 10% οξικό οξύ (BDH).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄

Σύνθεση Θρεπτικών Μέσων

LB: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων *E.coli*

Για την παρασκευή 1 lt θρεπτικού διαλύματος LB, σε τελικό όγκο 1 lt dH_2O προστίθενται 10 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton (Casein) και 5 g Yeast extract. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5% άγαρ. Ακολουθεί αποστείρωση. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε φιαλίδια MacCartney σε θερμοκρασία δωματίου ενώ τα τρυβλία με το στερεό μέσο φυλάσσονται στους 4°C.

Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων του γένους *Azospirillum*

I. Oxoid CM3

'Lab-Lemco' beef extract	1g
Εκχύλισμα ζύμης	2g
Πεπτόνη	5g
NaCl	5g
Αποσταγμένο νερό	1lt
pH	7,4

II. Oxoid CM131

Τρυπτόνη	15g
Πεπτόνη σόγιας	5g
NaCl	5g
Αποσταγμένο νερό	1lt
pH	7,3

Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίου *Pseudomonas stutzeri*

III. Oxoid CM3

Θρεπτικό μέσο I	1lt
KH_2PO_4	0,45g
Na_2HPO_4 x $12H_2O$	2,39g
pH	6,8

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5% άγαρ. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 121°C. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε φιαλίδια MacCartney σε θερμοκρασία δωματίου ενώ τα τρυβλία με το στερεό μέσο φυλάσσονται στους 4°C.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ΄

Μητρικά Διαλύματα Αντιβιοτικών

Αμπικιλίνη:

Μητρικό διάλυμα: 100 mg/ml σε ddH_2O

Τελική συγκέντρωση: 100 μg/ml θρεπτικού διαλύματος

Τετρακυκλίνη:

Μητρικό διάλυμα: 15 mg/ml σε αιθανόλη (BDH)

Τελική συγκέντρωση: 15 μg/ml για τρυβλία, 7,5 μg/ml για τις υγρές καλλιέργειες

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 Μοριακή ανάλυση γονιδίου 16S rRNA

Το 1965 οι Zuckerkandl και Pauling διατύπωσαν για πρώτη φορά την άποψη ότι τα μόρια ενδεχομένως να αποτελούν 'αποδείξεις της εξελικτικής ιστορίας' ή 'μοριακά χρονόμετρα' (Zuckerkandl & Pauling, 1965a). Σχεδόν μία δεκαετία αργότερα, οι Woese και συνεργάτες αναγνώρισαν το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 16S rRNA ως ένα δυναμικό φυλογενετικό εργαλείο και σύντομα δημιουργήθηκαν τα πρώτα φυλογενετικά δέντρα προκαρυωτικών οργανισμών βάσει του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος (Fox *et al*., 1980). Από εκείνη την εποχή ως σήμερα, οι πρόοδοι στην νουκλεοτιδική αλληλούχηση και, κυρίως, η ανάπτυξη της τεχνικής ενίσχυσης PCR έχουν βοηθήσει στην αναγνώριση νέων ειδών βακτηρίων και στην ταξινόμηση εκ νέου ορισμένων παλιότερων ενώ έχουν δημιουργηθεί και βάσεις δεδομένων γονιδίων. Συγκεκριμένα, από το 1980, οπότε τα αναγνωρισμένα είδη ήταν 1.792 (Approved Lists of Bacterial Names) έως σήμερα ο αριθμός των προκαρυωτικών ειδών ανέρχεται σε 9.297, δηλαδή υπήρχε αύξηση της τάξης του 518% (Skerman *et al*., 1980, Euzéby, 1997).

Τα πρώτα μόρια που εξετάστηκαν για τις δυνατότητές τους ως φυλογενετικοί δείκτες ήταν τα κυτοχρώματα και οι φερεδοξίνες. Γρήγορα όμως, έγινε αντιληπτό ότι το γονίδιο 16S rRNA διαθέτει ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι άλλων συντηρημένων γονιδίων (Ludwig & Klenk, 2005). Τα γονίδια του ριβοσωμικού RNA, τα οποία κωδικοποιούν για τις υπομονάδες 16S, 23S και 5S RNA, ενώνονται μεταξύ τους μέσω tRNA και είναι οργανωμένα σε οπερόνια. Τα οπερόνια αυτά μεταγράφονται συντονισμένα ώστε να παράγουν ισομοριακές ποσότητες κάθε γονιδιακού προϊόντος. Κατά την εκθετική ανάπτυξη του βακτηρίου *Escherichia coli* ο αριθμός των αντιγράφων των rRNA οπερονίων μπορεί να φτάσει τα 36. Συχνά παρατηρείται ετερογένεια στις αλληλουχίες πολλαπλών γονιδίων rRNA ενός γονιδιώματος χωρίς όμως να υπάρχουν αρκετά στοιχεία τα οποία να υποδεικνύουν ανεξάρτητη λειτουργία. Τόσο η αφθονία των οπερονίων rRNA όσο και η ετερογένειά τους εντός ενός γονιδιώματος έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην έρευνα αναγνώρισης και ταξινόμησης βακτηρίων βάσει δεδομένων αλληλουχιών rRNA (Klabbenbach *et al*., 2001).

Πλέον, το γονίδιο 16S rRNA αποτελεί το πιο αποδεκτό και ευρέως χρησιμοποιούμενο συντηρημένο γονίδιο που χρησιμοποιείται στην βακτηριακή ταξινόμηση και φυλογένεια. Οι πιο σημαντικοί λόγοι για τους οποίους συμβαίνει αυτό είναι: α) η παρουσία του, σχεδόν, σε όλα τα βακτήρια, συχνά ως πολλαπλά γονίδια ή ως οπερόνια, β) η λειτουργία του γονιδίου 16S rRNA δεν έχει αλλάξει με το πέρασμα του χρόνου, υποδηλώνοντας ότι οι τυχαίες αλλαγές στην αλληλουχία είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικές της εξέλιξης, και γ) το γονίδιο 16S rRNA έχει μέγεθος ~1500bp, το οποίο εξυπηρετεί σε έρευνες βιοπληροφορικής

(Janda & Abbott, 2007). Σύμφωνα με την ad-hoc επιτροπή για την επανεκτίμηση του προσδιορισμού ειδών στη βακτηριολογία, κατά την περιγραφή ενός νέου είδους η ακολουθία 16S rRNA προκειμένου να είναι αντιπροσωπευτική πρέπει να είναι μεγαλύτερη των 1.300 βάσεων (<0,5% αμφιβολία) (Stackebrandt *et al*., 2002). Εκτός από τα παραπάνω χαρακτηριστικά, το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 16S rRNA περιέχει τόσο εξελικτικά συντηρημένες περιοχές όσο και εξαιρετικά διαφοροποιημένες δομικές περιοχές. Αυτό οφείλεται σε διαφορετικές λειτουργικές πιέσεις επιλογής οι οποίες δρουν επί ανεξάρτητων δομικών στοιχείων. Αυτές οι διακυμάνσεις στη συντήρηση των ακολουθιών επιτρέπουν την αναπαράσταση τα φυλογένειας για ένα ευρύ φάσμα συγγενειών από το επίπεδο της επικράτειας ως το επίπεδο του είδους. Πλέον, η βάση δεδομένων που περιλαμβάνει ακολουθίες του γονιδίου 16S rRNA διαθέτει πάνω από 16.000 ακολουθίες και ο αριθμός αυτός συνέχεια ανεβαίνει. Ένα μεγάλο ποσοστό προκαρυωτικών ειδών αντιπροσωπεύεται από ακολουθίες 16S rRNA που προέρχονται από τυπικά στελέχη ή από στενά συγγενικά στελέχη (Ludwig & Klenk, 2005).

Παρά την ευρεία αποδοχή που απολαμβάνει το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 16S rRNA ως φυλογενετικός δείκτης παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Ανάλογα με τη λειτουργική σημασία, τα δομικά στοιχεία των rRNA δεν μπορούν να διαφοροποιούνται ελεύθερα και οι αλλαγές στην ακολουθία τους δε φαίνεται να αποτελούν μια συνεχή διαδικασία. Έτσι, η απόκλιση των σύγχρονων ακολουθιών rRNA μπορεί να αποδεικνύει την επιτυχία των κοινών προγόνων και των σύγχρονων απογόνων τους αλλά δεν πρέπει να θεωρείται δεδομένο ότι υπάρχει άμεση αλληλεξάρτηση με μία χρονική κλίμακα. Ένα άλλο πρόβλημα αποτελεί η ύπαρξη πολλαπλών γονιδίων σε έναν οργανισμό. Μέχρι πρότινος, υπήρχε η άποψη ότι δεν υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ πολλαπλών ακολουθιών rRNA για έναν οργανισμό (Ludwig & Klenk, 2005). Αν και για τα περισσότερα είδη οι ομολογία μεταξύ ακολουθιών rRNA είναι 99%, για ορισμένα είδη αυτό δεν ισχύει. Υπάρχουν ορισμένες εξαιρέσεις, όπως τα *Thermomonospora chromogena*, *Thermobispora bispora* και *Haloarcula marismortui* των οποίων τα γονίδια 16S και 23S παρουσιάζουν διαφορές ως και 10% (Hashimoto *et al*., 2003). Τέλος, ένα άλλο πρόβλημα που προκύπτει είναι το γεγονός ότι οργανισμοί οι οποίοι έχουν ακολουθίες rRNA με υψηλή ομολογία μπορεί να έχουν σημαντικές διαφορές στο επίπεδο του συνολικού γονιδιώματος. Γι' αυτόν τον λόγο, πρέπει κατά την ερμηνεία των φυλογενετικών δέντρων να δίδεται προσοχή στα πρότυπα διακλάδωσης στην περιφέρεια του δέντρου διότι, πιθανώς, να μην αντιπροσωπεύουν την πραγματική φυλογένεια. Δεδομένης της χαμηλής φυλογενετικής αναλυτικής δύναμης σε τέτοια επίπεδα σχετικότητας (άνω του 70% ομολογίας) προτείνεται η υποστήριξη των αποτελεσμάτων με έρευνες DNA-DNA υβριδισμού (Ludwig & Klenk, 2005).

Γ.1.1 Ενίσχυση τμήματος γονιδίου 16S rRNA

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μοριακή ανάλυση του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16S rRNA πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος ~1450 βάσεων (97% του συνολικού 16S rRNA γονιδίου) με χρήση της τεχνικής PCR.

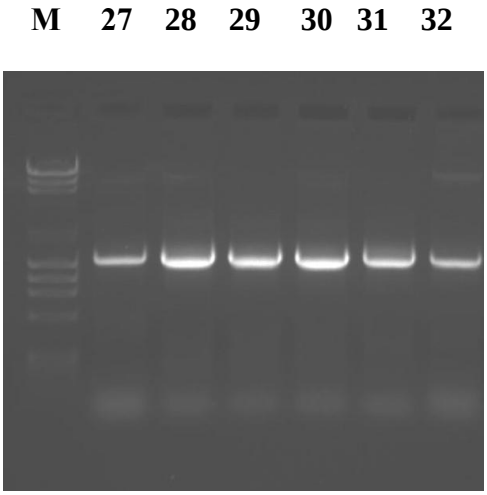
Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR του τμήματος 16S rRNA (Weisburg *et al*., 1991):

Forward
16S-F: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'

Reverse
16S-R: 5'- CAAGTCGTAAAAGGTAGCCGT -3'

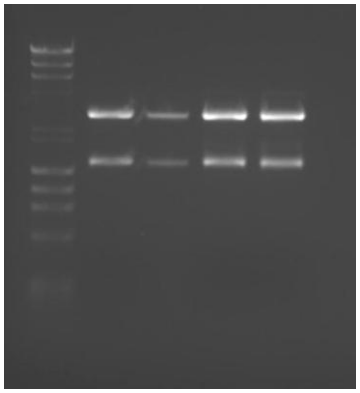
Για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA, οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν:

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



Εικ. Γ.1 Ενίσχυση PCR τμήματος του γονιδίου 16S rRNA μεγέθους 1450bp στο ολικό γονιδιωματικό DNA των δειγμάτων 27, 28, 29, 30, 31, 32 (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III)

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



Εικ. Γ.2 Πέψεις με το ένζυμο *Eco*RI των πλασμιδίων από τους PGEM-T κλώνους 16S rRNA 16, 17, 18, 21 (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III)

Γ.1.2 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST του National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Από τη σύγκριση με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST των 17 υποκλώνων 16S rRNA προέκυψαν τα εξής:

Στέλεχος	Αρχική ονομασία στελέχους	Υποκλώνος	Αποτέλεσμα BLAST	Max identity	Query Coverage
1	LMG 1231	pGemT.16S.1	*Azospirillum* sp. Arm2-2 / *Azospirillum oryzae* N7	98%	100%
2	LMG 1232	pGemT.16S.2	*Azospirillum* sp. Arm2-2 / *Azospirillum oryzae* N7	98%	100%
3	LMG 2211	pGemT.16S.3	*Azospirillum brasilense* ISSDS-855	99%	99%
4	LMG 2212	pGemT.16S.4	*Azospirillum brasilense* ISSDS-855	99%	99%
6	LMG 2213.1	pGemT.16S.6	*Azospirillum brasilense* ISSDS-855	99%	100%
16	LMG 1221.1	pGemT.16S.16	*Uncultured Pseudomonas* sp. clone 1-C/ *Pseudomonas stutzeri* A1501	99%	100%
17	LMG 1221	pGemT.16S.17	*Uncultured Pseudomonas* sp. clone 1-C/ *Pseudomonas* sp. me-13/ 5th result: *Pseudomonas stutzeri* A1501	99%	100%
18	LMG 1221.2	pGemT.16S.18	*Uncultured Pseudomonas* sp. clone 1-C/ *Pseudomonas* sp. me-13/ 5th result: *Pseudomonas stutzeri* A1501	99%	100%
19	LMG 1221.3	pGemT.16S.19	*Pseudomonas* sp. BRW3/ *Pseudomonas* sp. BRW1/ 4th result: *Pseudomonas stutzeri* A1501	99%	100%
20	LMG 1221.3u	pGemT.16S.20	*Uncultured Pseudomonas* sp. clone 1-C/ *Pseudomonas* sp. me-13/ *Pseudomonas stutzeri* A1501	99%	100%
21	LMG 1221.3r	pGemT.16S.21	*Pseudomonas* sp. BRW3/ *Pseudomonas* sp. BRW1/ 4th result: *Pseudomonas stutzeri* A1501	99%	100%
25	LMG 3211	pGemT.16S.1	*Azospirillum brasilense* ISSDS-855	99%	99%
26	LMG 3212	pGemT.16S.26	*Azospirillum brasilense* ISSDS-855	99%	98%
27	LMG 4221	pGemT.16S.27	*Azospirillum brasilense* ISSDS-855	99%	99%
28	LMG 4222	pGemT.16S.28	1. *Azospirillum* sp. DA10-2	99%	100%
			2. *Azospirillum brasilense* MTCC 4035	98%	100%
31	LMG 6211	pGemT.16S.31	*Azospirillum oryzae* N7	98%	100%
32	LMG 6212	pGemT.16S.32	*Azospirillum brasilense* ISSDS-855	99%	99%

Πίν. Γ.1 Αποτελέσματα σύγκρισης με τη βάση δεδομένων BLAST των 17 υποκλώνων 16S rRNA

Από τη μοριακή ανάλυση των 17 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών 16S rRNA προέκυψαν τα εξής στατιστικά στοιχεία για τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων:

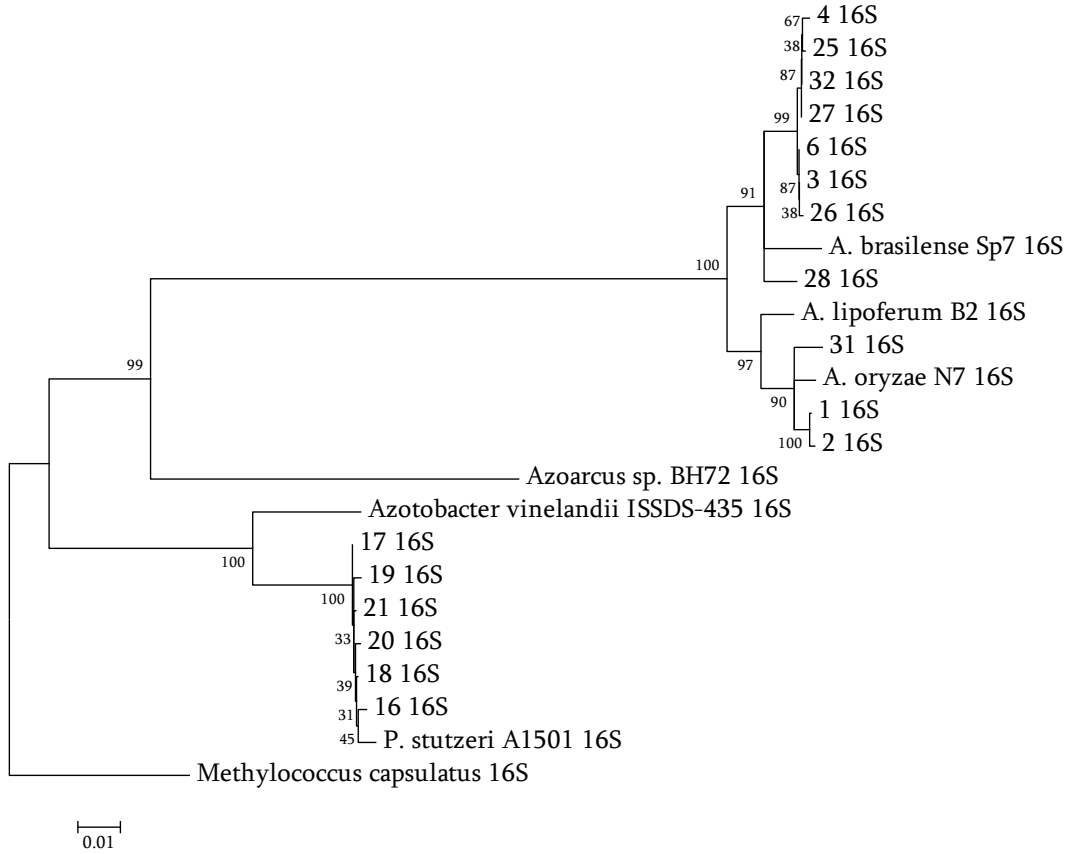
Στέλεχος	Αρχική ονομασία στελέχους	T(U)	C	A	G	G+C	Σύνολο
1	LMG 1231	18,9	24,7	23,5	32,9	57,6	1447
2	LMG 1232	19,1	24,5	23,4	33	57,5	1443
3	LMG 2211	19	24,8	23,4	32,8	57,6	1446
4	LMG 2212	19	24,7	23,4	32,9	57,6	1441
6	LMG 2213.1	19	24,8	23,4	32,8	57,6	1446
16	LMG 1221.1	20,9	22,3	25,4	31,4	53,7	1499
17	LMG 1221	20,8	22,3	25,4	31,5	53,8	1497
18	LMG 1221.2	20,9	22,4	25,4	31,4	53,8	1494
19	LMG 1221.3	20,8	22,4	25,4	31,4	53,8	1498
20	LMG 1221.3u	20,8	22,4	25,4	31,5	53,9	1497
21	LMG 1221.3r	20,8	22,3	25,3	31,5	53,8	1497
25	LMG 3211	19	24,8	23,4	32,8	57,6	1446
26	LMG 3212	19	24,8	23,4	32,8	57,6	1434
27	LMG 4221	19,1	24,7	23,4	32,8	57,5	1448
28	LMG 4222	19,2	24,6	23,2	33	57,6	1447
31	LMG 6211	19,1	24,5	23,5	32,9	57,4	1449
32	LMG 6212	19,1	24,7	23,4	32,8	57,5	1446
Μέσος Όρος		19,2	24,5	23,6	32,8	56,23	-

Πίν. Γ.2 Συχνότητα νουκλεοτιδίων και του αθροίσματος G+C στην κάθε μία αλληλουχία 16S rRNA καθώς και ο μέσος όρος τους. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al*., 2007).

Γ.1.3 Φυλογενετικά δέντρα

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση των υποκλώνων και ακολουθιών διαθέσιμων στο διαδίκτυο (βλ. Παράρτημα Accession Numbers) με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al*., 2007). Η ευθυγράμμιση και ο πίνακας αποστάσεων των 24 ακολουθιών παρατίθενται στο αντίστοιχο παράρτημα.

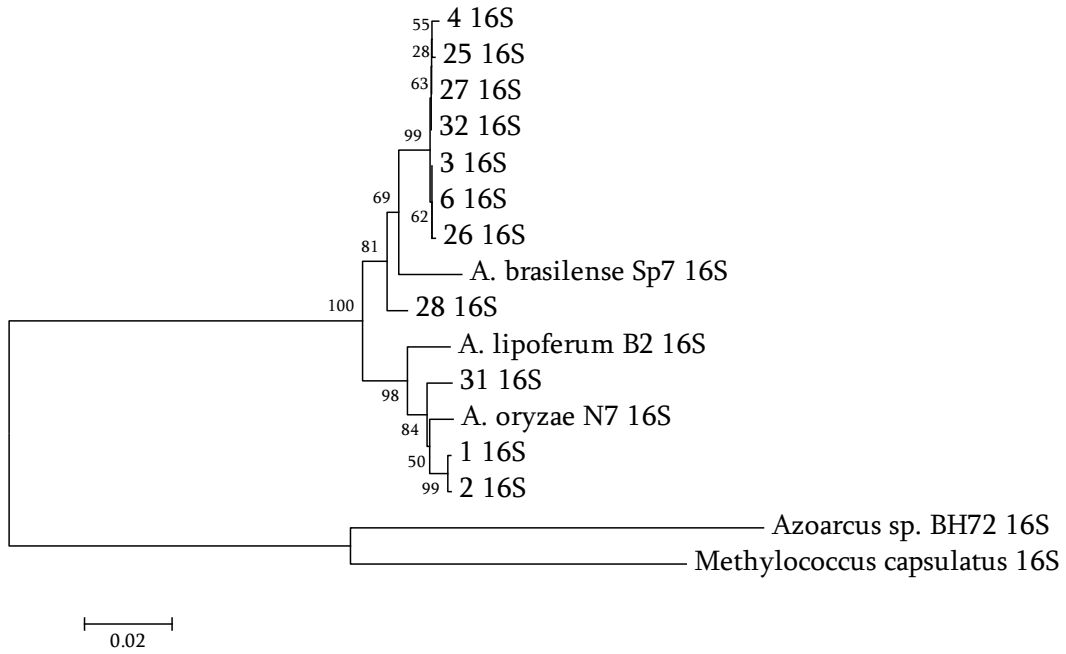
Το δενδρόγραμμα των αλληλουχιών 16S rRNA έχει ως εξής:



Εικ. Γ.3 Εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει τμήματος του γονιδίου 16S rRNA. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al*., 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκε το αρχαιοβακτήριο *Methylococcus capsulatus*. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τυπικά στελέχη *Azospirillum*, το *Pseudomonas stutzeri* A1501, το *Azoarcus* sp. BH72 και το *Azotobacter vinelandii* ISSDS-435 (Παράρτημα Accession Numbers). Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 1340 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al*., 2007).

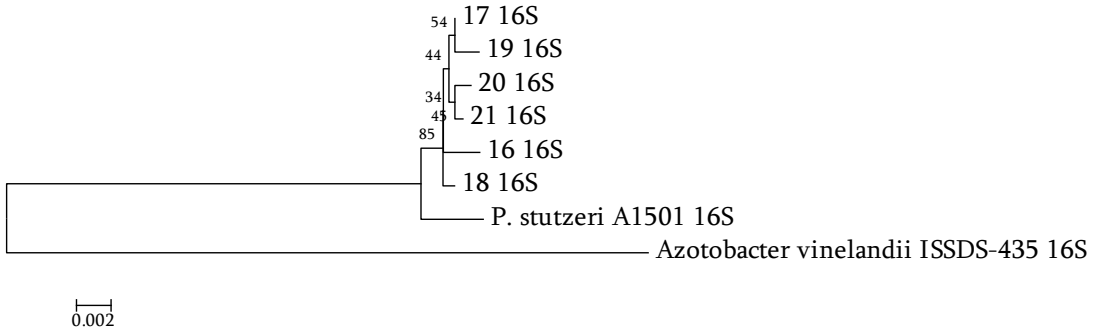
Βάσει των αποτελεσμάτων της σύγκρισης με τη βάση δεδομένων BLAST οι 17 υποκλώνοι ταξινομούνται σε δύο γένη, 11 στο γένος *Azospirillum* και 6 στο γένος *Pseudomonas*. Τα φυλογενετικά δέντρα των υποκλώνων κάθε γένους είναι τα εξής:

Φυλογενετικό δέντρο 11 υποκλώνων αναγνωρισμένων ως *Azospirillum* και στελεχών αναφοράς:



Εικ. Γ.4 Εξελικτικές σχέσεις 11 υποκλώνων αναγνωρισμένων ως *Azospirillum* και στελεχών αναφοράς βάσει τμήματος του γονιδίου 16S rRNA. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al*., 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκαν το στέλεχος *Azoarcus* sp. BH72 και το αρχαιοβακτήριο *Methylococcus capsulatus*. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τυπικά στελέχη *Azospirillum* (Παράρτημα Accession Numbers). Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 1345 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al*., 2007).

Φυλογενετικό δέντρο 6 υποκλώνων αναγνωρισμένων ως *Pseudomonas* και στελεχών αναφοράς:



Εικ. Γ.5 Εξελικτικές σχέσεις υποκλώνων αναγνωρισμένων ως *Pseudomonas* και στελεχών αναφοράς βάσει τμήματος του γονιδίου 16S rRNA. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al*., 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκε το *Azotobacter vinelandii* ISSDS-435 και ως ακολουθία αναφοράς το *Pseudomonas stutzeri* A1501 (Παράρτημα Accession Numbers). Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 1453 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al*., 2007).

Γ.2 Μοριακή ανάλυση γονιδίου *nifH*

Όλοι οι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί είναι προκαρυωτικοί και περιέχουν το ίδιο οπερόνιο (*nifHDK*) στο οποίο το γονίδιο *nifH* κωδικοποιεί για την αναγωγάση της νιτρογενάσης. Το οπερόνιο αυτό είναι ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ των αζωτοδεσμευτικών οργανισμών και προκύπτει το ερώτημα κατά πόσο η φυλογένεια των γονιδίων *nif* απεικονίζει την καταγωγή των βακτηρίων που το κατέχουν (Young, 1992).

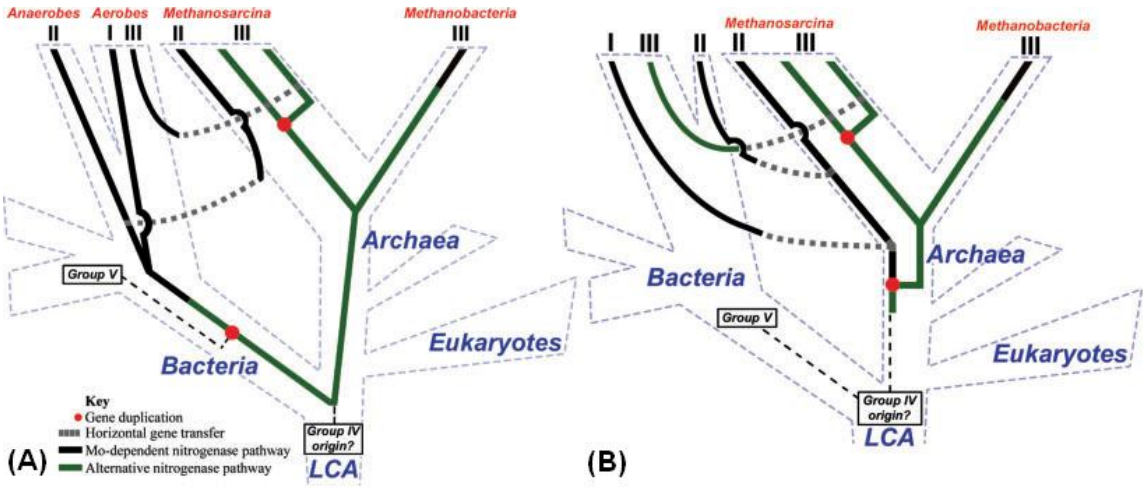
Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες σύγκρισης των γονιδίων 16S rRNA και *nifH* προκειμένου να διαπιστωθεί αν το φυλογενετικό δέντρο που προκύπτει από το 16S rRNA συμφωνεί με το αντίστοιχο του *nifH*. Αυτό είναι χρήσιμο διότι παρά την αναμφισβήτητη αποδοχή του γονιδίου 16S rRNA προτείνεται η μοριακή ανάλυση περισσότερων του ενός γονιδίων. Οι περισσότερες έρευνες επιβεβαιώνουν ότι πολλά χαρακτηριστικά του φυλογενετικού δέντρου του *nifH* συμφωνούν απόλυτα με τη φυλογένεια του 16S rRNA. Για παράδειγμα, όλοι οι κλάδοι στις κλάσεις α- και γ-Πρωτεοβακτήρια αλλά και η σχέση μεταξύ των κλάσεων είναι σε συμφωνία, με μόνη ίσως εξαίρεση το *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Young, 1992). Γι' αυτόν τον λόγο, η ποικιλότητα των γονιδίων *nifH* επιτρέπει την 'χονδρική' εκτίμηση της ταξινόμησης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διερεύνηση της ποικιλότητας των βακτηρίων που δεσμεύουν άζωτο (Poly *et al*., 2001). Αντίστοιχα αποτελέσματα προκύπτουν και από τη μοριακή ανάλυση των γονιδίων *nifD* και *nifK* και πιθανώς να αποτελούν αξιόπιστους φυλογενετικούς δείκτες παρόλο που δεν προκύπτει απόλυτη συμφωνία μεταξύ της φυλογένειας των γονιδίων *nifH*, *nifD* και *nifK* (Zehr *et al*., 2003, Schmid & Hartmann, 2007).

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

Το πρώτο σενάριο αφορά την παρουσία της αζωτοδέσμευσης στον τελευταίο κοινό πρόγονο όλων των μορφών ζωής (Εικ. Γ.6.Α). Αυτή η υπόθεση προϋποθέτει ως κυρίαρχο γεγονός την απώλεια γονιδίων ώστε να δικαιολογείται η απουσία των γονιδίων *nif* από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και από ολόκληρα φύλα προκαρυωτικών. Συμμετοχή σε αυτήν τη διαδικασία έχει και η οριζόντια μεταφορά γονιδίων η οποία έχει πραγματοποιηθεί για να μεταφερθεί νιτρογενάση ακόμα και σε οργανισμούς που ήδη είχαν ένα αντίγραφο νιτρογενάσης. Σε αυτήν την περίπτωση, οι εναλλακτικές νιτρογενάσες προήλθαν από τα αρχαία (methanosarcina) και κατόπιν με οριζόντια μεταφορά διαδόθηκαν σε άλλα γένη ευβακτηρίων (Raymond *et al*., 2004, Kechris *et al*., 2006).

Το δεύτερο σενάριο προέλευσης της ιδιότητας της αζωτοδέσμευσης αφορά στην εμφάνισή της για πρώτη φορά στα μεθανογόνα βακτήρια (αρχαία) (Εικ. Γ.6.Β). Μετά από αυτό, μεταφέρθηκε σε άλλες βακτηριακές συγγενικές σειρές μέσω τριών ξεχωριστών εξελικτικών γεγονότων. Σε αυτήν την περίπτωση, το κυρίαρχο φαινόμενο θα ήταν η

οριζόντια μεταφορά γονιδίων και όχι η απώλεια γονιδίων όπως στο πρώτο σενάριο. Η υπόθεση αυτή δικαιολογεί την απουσία αζωτοδέσμευσης από τους ευκαρυώτες, τα crenarchaea και από πρώιμα διακλαδιζόμενες βακτηριακές συγγενικές σειρές. Ταυτόχρονα, το σενάριο εναρμονίζεται με την επικρατούσα άποψη ότι κάποια στιγμή της ιστορίας τα μεθανογόνα βακτήρια είχαν κυρίαρχο ρόλο στη βιόσφαιρα (Raymond *et al*., 2004). Ένα τρίτο σενάριο που υποστηρίζει την ανεξάρτητη εμφάνιση της ιδιότητας της αζωτοδέσμευσης σε ορισμένες συγγενικές σειρές δε φαίνεται πιθανό. Σημειώνεται ότι τα παραπάνω αποτελούν τα κυρίαρχα σενάρια μεταξύ πολλών που έχουν διατυπωθεί και τα οποία απεικονίζουν με τον καλύτερο τρόπο τις διαθέσιμες φυλογενετικές και βιοχημικές πληροφορίες (Kechris *et al*., 2006).



Εικ. Γ.6 Προτεινόμενα σενάρια και η αντίστοιχη απεικόνιση δενδρογράμματος γονιδίου και δενδρογράμματος είδους. **(Α)** Σενάριο του τελευταίου κοινού πρόγονου. Παρουσιάζονται οι τρεις επικράτειες και η απόκλισή τους από τον τελευταίο κοινό πρόγονο (LCA) με μπλε γράμματα και διακεκομμένες μπλε γραμμές. Οι ενιαίες γραμμές (μαύρες και πράσινες, ανάλογα με το αν είναι τυπική ή εναλλακτική νιτρογενάση) υποδεικνύουν την εξέλιξη της νιτρογενάσης από πρόγονο της ομάδας IV στη βάση του δέντρου (οι Raymond και συνεργάτες (2004) διαχωρίζουν τους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς σε πέντε ομάδες βάσει φυλογένειας του γονιδίου 16S rRNA). Επίσης, υποδεικνύονται με κόκκινη τελεία τα σημεία διπλασιασμού γονιδίου και με γκρι διακεκομμένη γραμμή οριζόντια μεταφορά γονιδίου. Σύμφωνα με το σενάριο του τελευταίου κοινού πρόγονου, η απώλεια γονιδίων ήταν το κυρίαρχο γεγονός στις συγγενικές σειρές οι οποίες δεν έχουν πλέον την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν. **(Β)** Σενάριο αρχικής εμφάνισης στα μεθανογόνα βακτήρια. Σύμφωνα με αυτό το σενάριο η αζωτοδέσμευση εμφανίστηκε ως ιδιότητα πρώτα στα μεθανογόνα αρχαιοβακτήρια και έπειτα μεταφέρθηκε σε ένα πρωτόγονο βακτήριο, παρακάμπτοντας την αναγκαιότητα για εκτεταμένες απώλειες γονιδίων προκειμένου να εξηγηθεί η απουσία αζωτοδεσμευτικών συγγενικών σειρών. Σε αυτήν την περίπτωση, πρέπει να έχει συμβεί εκτεταμένη και σχετικά πρόσφατη οριζόντια μεταφορά γονιδίων ώστε να εξηγηθούν η κατανομή και η ομοιότητα των νιτρογενασών των ομάδων II και III (Raymond *et al*., 2004).

Γ.2.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *nifH*

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μοριακή ανάλυση του γονιδίου *nifH* πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος ~360 βάσεων (41% του συνολικού *nifH* γονιδίου) με χρήση της τεχνικής PCR.

Για την ενίσχυση του τμήματος *nifH* χρησιμοποιήθηκαν εκφυλισμένοι εκκινητές σύμφωνα με τους Poly και συνεργάτες (2001) και είναι οι εξής:

Forward
PolF: 5'- TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC -3'

Reverse
PolR: 5'- ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA -3'

Y = C/T,
S = G/C,
R = A/G,
B = C/G/T

(Ονοματολογία από International Union of Pure and Applied Chemistry Conventions)

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν:

Αρχική αποδιάταξη	94°C για 4 λεπτά	
Αποδιάταξη	94°C για 1 λεπτό	35 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών	55°C για 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72°C για 2 λεπτά	
Τελική επιμήκυνση	72°C για 5-10 λεπτά	

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

Γ.2.2 Ανάλυση 11 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *nifH* των στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum* βάσει της μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA

Γ.2.2.1 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων (*Azospirillum*)

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των 11 υποκλώνων *nifH*, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas*, με τα στοιχεία της βάσης δεδομένων του National Center of Biotechnology Information (NCBI) μέσω του διαδικτυακού προγράμματος BLAST (Πίν. Γ.3).

Στέλεχος	Αρχική ονομασία στελέχους	Αποτέλεσμα BLAST	Max identity	Query Coverage
1	LMG 1231	*Azospirillum oryzae* N7*nifH*	99%	100%
2	LMG 1232	*Azospirillum oryzae* N7 *nifH*	99%	100%
3	LMG 2211	*Azospirillum brasilense nifH*	99%	100%
4	LMG 2212	*Azospirillum brasilense nifH*	100%	100%
6	LMG 2213.1	*Azospirillum brasilense nifH*	99%	100%
25	LMG 3211	*Azospirillum brasilense nifH*	99%	100%
26	LMG 3212	*Azospirillum brasilense nifH*	98%	100%
27	LMG 4221	*Azospirillum brasilense nifH*	98%	100%
28	LMG 4222	*Azospirillum brasilense nifH*	100%	100%
31	LMG 6211	*Azospirillum oryzae* N7 *nifH*	99%	100%
32	LMG 6212	*Azospirillum brasilense* strain GP19 *nifH*	99%	100%

Πίν. Γ.3 Αποτελέσματα σύγκρισης με τη βάση δεδομένων BLAST των 11 υποκλώνων οι οποίοι βάσει της μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum*.

Από τη μοριακή ανάλυση των 11 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *nifH* των στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum* βάσει της μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA, προέκυψαν τα εξής στατιστικά στοιχεία για τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων:

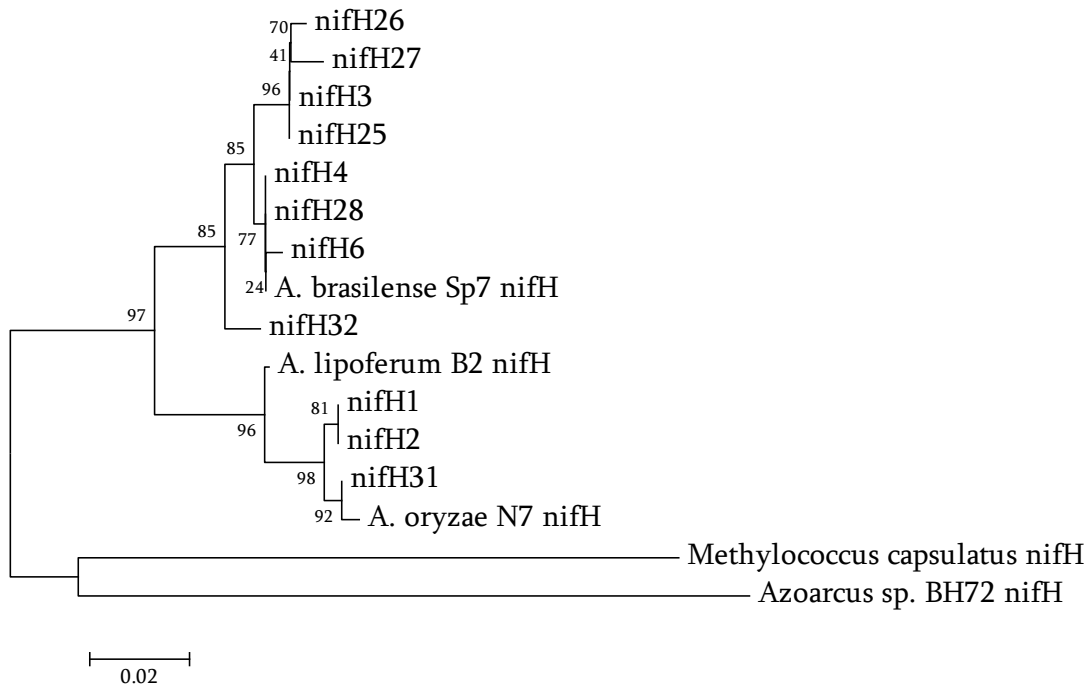
Στέλεχος	Αρχική ονομασία στελέχους	T(U)	C	A	G	G+C	Σύνολο
1	LMG 1231	16,6	32	19,7	31,7	63,7	319
2	LMG 1232	16,6	32	19,7	31,7	63,7	319
3	LMG 2211	16,3	31,3	18,5	33,9	65,2	319
4	LMG 2212	16	32,3	18,5	33,2	65,5	319
6	LMG 2213.1	15,7	32,6	18,5	33,2	65,8	319
25	LMG 3211	16,3	31,3	18,5	33,9	65,2	319
26	LMG 3212	16,6	31	18,5	33,9	64,9	319
27	LMG 4221	16,9	30,7	18,5	33,9	64,6	319
28	LMG 4222	16	32,3	18,5	33,2	65,5	319
31	LMG 6211	16,3	32,3	19,4	32	64,3	319
32	LMG 6212	15,7	32,3	18,5	33,5	64,3	319
Μέσος Όρος		16,3	31,8	18,8	33,1	64,84	-

Πίν. Γ.4 Συχνότητα νουκλεοτιδίων και του αθροίσματος G+C στην κάθε μία αλληλουχία καθώς και ο μέσος όρος τους. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al*., 2007).

Γ.2.2.2 Φυλογενετικά δέντρα (*Azospirillum*)

Πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση των υποκλώνων και ακολουθιών διαθέσιμων στο διαδίκτυο (βλ. Παράρτημα Accession Numbers) με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al*., 2007). Η ευθυγράμμιση και ο πίνακας αποστάσεων παρατίθενται στο αντίστοιχο παράρτημα.

Το φυλογενετικό δέντρο των 11 αλληλουχιών *nifH* και των ακολουθιών αναφοράς έχει ως εξής:



Εικ. Γ.7 Εξελικτικές σχέσεις στελεχών *Azospirillum* και στελεχών αναφοράς βάσει νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *nifH*. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al*., 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκαν το στέλεχος *Azoarcus* sp. BH72 και το αρχαιοβακτήριο *Methylococcus capsulatus*. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τυπικά στελέχη *Azospirillum* (Παράρτημα Accession Numbers). Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 319 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al*., 2007).

Γ.2.3 Ανάλυση 6 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *nifH* των στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas* βάσει της μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA

Γ.2.3.1 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων (*Pseudomonas*)

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των 6 υποκλώνων *nifH*, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas*, με τα στοιχεία της βάσης δεδομένων του National Center of Biotechnology Information (NCBI) μέσω του διαδικτυακού προγράμματος BLAST (Πίν. Γ.5).

Στέλεχος	Αρχική ονομασία στελέχους	Αποτέλεσμα BLAST	Max identity	Query Coverage
16	LMG 1221.1	*Pseudomonas stutzeri*	99%	100%
17	LMG 1221	*Pseudomonas stutzeri*	100%	100%
18	LMG 1221.2	*Pseudomonas stutzeri*	99%	100%
19	LMG 1221.3	*Pseudomonas stutzeri*	100%	100%
20	LMG 1221.3u	*Pseudomonas stutzeri*	100%	100%
21	LMG 1221.3r	*Pseudomonas stutzeri*	100%	100%

Πίν. Γ.5 Αποτελέσματα σύγκρισης με τη βάση δεδομένων BLAST των 6 υποκλώνων οι οποίοι βάσει της μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas*.

Από τη μοριακή ανάλυση των 6 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *nifH* των στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas*, βάσει της μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA, προέκυψαν τα εξής στατιστικά στοιχεία για τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων:

Στέλεχος	Αρχική ονομασία στελέχους	T(U)	C	A	G	G+C	Σύνολο
16	LMG 1221.1	16,1	31,4	19,3	33,2	64,6	322
17	LMG 1221	16,5	31,1	19,3	33,2	64,3	322
18	LMG 1221.2	16,5	31,1	18,9	33,5	64,6	322
19	LMG 1221.3	16,5	31,1	19,3	33,2	64,3	322
20	LMG 1221.3u	16,5	31,1	19,3	33,2	64,3	322
21	LMG 1221.3r	16,5	31,1	19,3	33,2	64,3	322
Μέσος Όρος		16,4	31,1	19,2	33,3	64,4	322

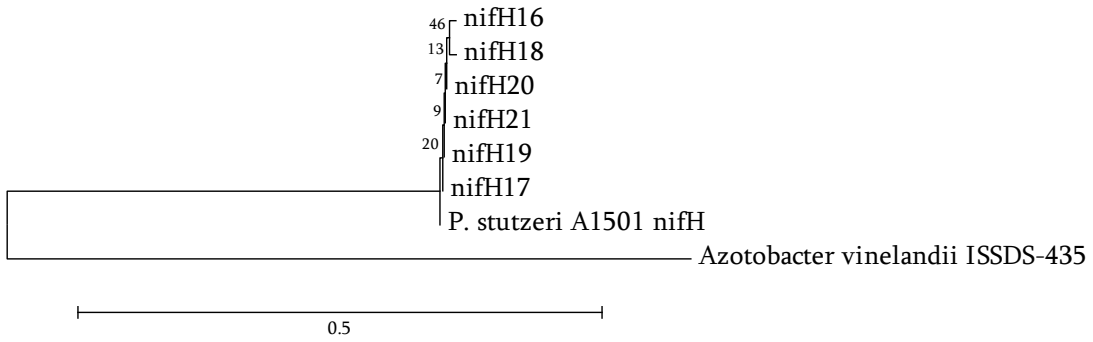
Πίν. Γ.6 Συχνότητα νουκλεοτιδίων και του αθροίσματος G+C στην κάθε μία αλληλουχία καθώς και ο μέσος όρος τους. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al*., 2007).

Γ.2.3.2 Φυλογενετικό δέντρο (*Pseudomonas*)

Πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση των υποκλώνων και ακολουθιών διαθέσιμων στο διαδίκτυο (βλ. Παράρτημα Accession Numbers) με το πρόγραμμα πολλαπλής

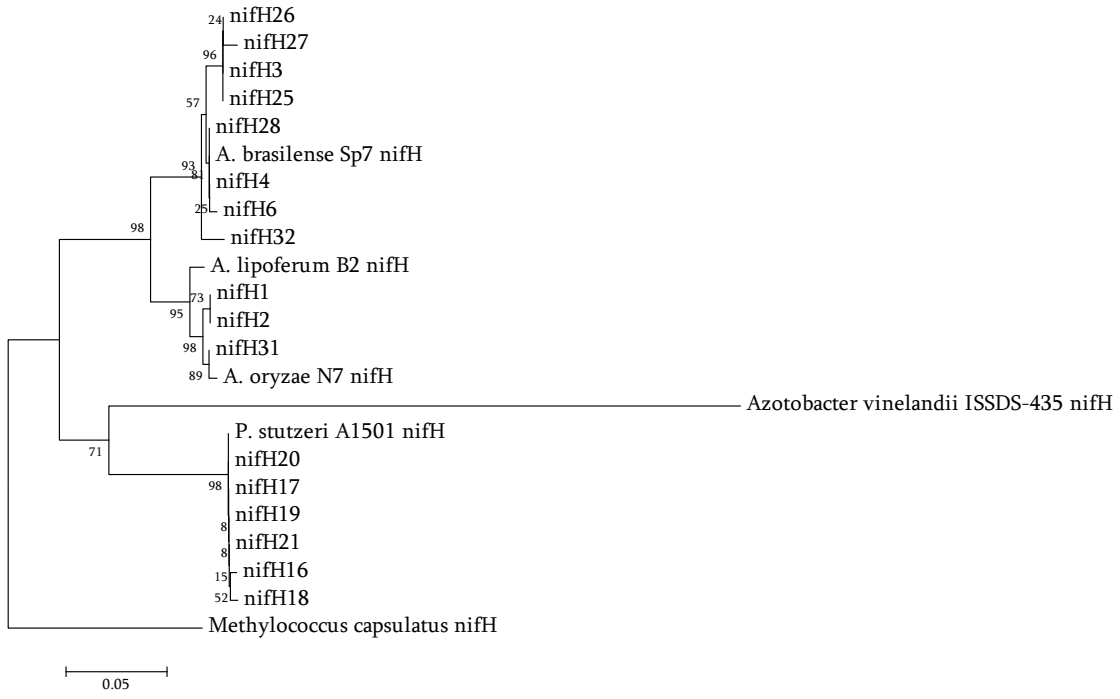
ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al*., 2007) Η ευθυγράμμιση και ο πίνακας αποστάσεων παρατίθενται στα αντίστοιχα παραρτήματα .

Το φυλογενετικό δέντρο των 6 αλληλουχιών *nifH* και των ακολουθιών αναφοράς έχει ως εξής:



Εικ. Γ.8 Εξελικτικές σχέσεις στελεχών *Pseudomonas* βάσει νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *nifH*. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al*., 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκε το *Azotobacter vinelandii* ISSDS-435 και ως ακολουθία αναφοράς το *Pseudomonas stutzeri* A1501 (Παράρτημα Accession Numbers). Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 309 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al*., 2007).

Παρακάτω παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο όλων των υπό μελέτη υποκλώνων και ορισμένων ακολουθιών αναφοράς βάσει του γονιδίου *nifH*:



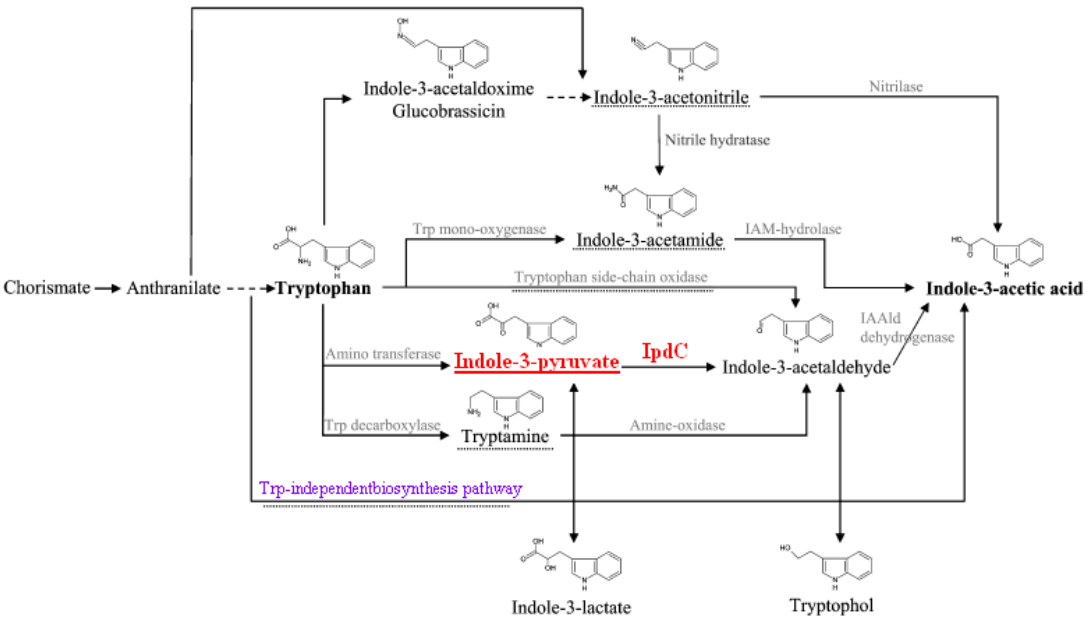
Εικ. Γ.9 Εξελικτικές σχέσεις όλων των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *nifH*. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al*., 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκε το αρχαιοβακτήριο *Methylococcus capsulatus*. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τυπικά στελέχη *Azospirillum*, το *Pseudomonas stutzeri* A1501 και το *Azotobacter vinelandii* ISSDS-435 (Παράρτημα Accession Numbers). Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 306 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al*., 2007).

Γ.3 Μοριακή ανάλυση γονιδίου *ipdC*

Οι αυξίνες έχουν ρυθμιστικό ρόλο σε βασικές λειτουργίες των φυτών όπως η κυτταρική διαίρεση, ο τροπισμός, η διαφοροποίηση, η επιμήκυνση κ.ά. Είναι διαπιστωμένο ότι οι αυξίνες παράγονται και από τα PGPR ριζοβακτήρια και μάλιστα η ευεργετική τους επίδραση φαίνεται να είναι πιο σημαντική από αυτήν της αζωτοδέσμευσης -όσο αφορά τα PGPR ριζοβακτήρια που διαθέτουν την ικανότητα της αζωτοδέσμευσης (Malhotra & Srivastava, 2008). Έχουν ανιχνευθεί πολλές φυτοορμόνες όπως γιβερελίνες και κυτοκυνίνες

αλλά η αυξίνη ινδολοξικό οξύ (IAA) είναι ποσοτικά η πιο σημαντική (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Έχει παρατηρηθεί μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των βιοσυνθετικών μονοπατιών ινδολοξικού οξέος σε φυτά και βακτήρια. Στα βακτήρια η κύρια πρόδρομος ένωση για την παραγωγή IAA είναι η τρυπτοφάνη. Στην παρακάτω εικόνα (Γ.10) παρουσιάζονται όλα τα γνωστά ως σήμερα μονοπάτια βιοσύνθεσης IAA μέσω τρυπτοφάνης καθώς και ένα μονοπάτι ανεξάρτητο αυτής. Το πιο σημαντικό από αυτά είναι το μονοπάτι του ινδολοπυρουβικού οξέος (IPyA) το οποίο έχει εντοπιστεί και σε ορισμένα παθογόνα βακτήρια αλλά του οποίου τα γονίδια/ένζυμα κλειδιά δεν είναι ακόμα όλα γνωστά. Σε αυτό το μονοπάτι το ινδολοπυρουβικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται δίνοντας ινδολο-ακεταλδεΰδη, η οποία αποτελεί την πρόδρομο ένωση του IAA. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την αποκαρβοξυλάση του IPyA είναι το *ipdC*. Το *ipdC* έχει απομονωθεί από πολλά βακτήρια όπως το *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas putida* κ.ά. Η σημασία του γονιδίου αυτού στην παραγωγή IAA υποδεικνύεται από το γεγονός ότι σε έρευνες απενεργοποίησης του γονιδίου *ipdC* σε στελέχη *A. brasilense* η παραγωγή IAA μειώθηκε ώς και 90%. Η συνεισφορά του IAA στην προώθηση της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος των φυτών είναι ευρέως διαπιστωμένη και, πιθανώς, είναι σημαντικότερη από αυτήν της αζωτοδέσμευσης (Spaepen *et al.*, 2007). Έτσι, η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των γονιδίων που εμπλέκονται στα μονοπάτια βιοσύνθεσης του IAA κρίνονται αναγκαία.



Εικ. Γ.10 Μονοπάτια βιοσύνθεσης IAA στα βακτήρια. Οι ενδιάμεσες ενώσεις από τις οποίες προκύπτει το όνομα του μονοπατιού είναι υπογραμμισμένες. IAAld: ινδολο-ακτελδεΰδη, IAM: ινδολο-ακεταμίδη, IpdC: αποκαρβοξυλάση του ινδολο-πυρουβικού, Trp: τρυπτοφάνη (Spaepen *et al.*, 2007).

Γ.3.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ipdC*

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μοριακή ανάλυση του γονιδίου *ipdC* πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος ~1280 βάσεων (78% του συνολικού *ipdC* γονιδίου) με χρήση της τεχνικής PCR.

Για την ενίσχυση του τμήματος *ipdC* χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές σύμφωνα με τους Zimmer και συνεργάτες (1998):

Forward
2a: 5’ GGC TTC GCG GGG GAC GCG GCG GCG CGT TAC 3’

Reverse
2b: 3’ CTT AGC CGG AAG TTG CTG GAC CTG CTG ACC 5’

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν:

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

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

Γ.3.2 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων στελεχών

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των 9 υποκλώνων *ipdC*, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas*, με τα στοιχεία της βάσης δεδομένων του National Center of Biotechnology Information (NCBI) μέσω του διαδικτυακού προγράμματος BLAST (Πίν. Γ.7).

Στέλεχος	Αρχική ονομασία στελέχους	Αποτέλεσμα BLAST	Max identity	Query Coverage
2	LMG 1232	*Azospirillum brasilense ipdC*	97%	99%
3	LMG 2211	*Azospirillum brasilense ipdC*	97%	100%
6	LMG 2213.1	*Azospirillum brasilense ipdC*	97%	100%
25	LMG 3211	*Azospirillum brasilense ipdC*	96%	100%
26	LMG 3212	*Azospirillum brasilense ipdC*	95%	100%
27	LMG 4221	*Azospirillum brasilense ipdC*	97%	100%
28	LMG 4222	*Azospirillum brasilense ipdC*	98%	100%
31	LMG 6211	*Azospirillum brasilense ipdC*	97%	100%
32	LMG 6212	*Azospirillum brasilense ipdC*	96%	100%

Πίν. Γ.7 Αποτελέσματα σύγκρισης με τη βάση δεδομένων BLAST των 9 υποκλώνων οι οποίοι βάσει της μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum*.

Από τη μοριακή ανάλυση των 9 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *ipdC* των στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum* βάσει της μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA, προέκυψαν τα εξής στατιστικά στοιχεία για τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων:

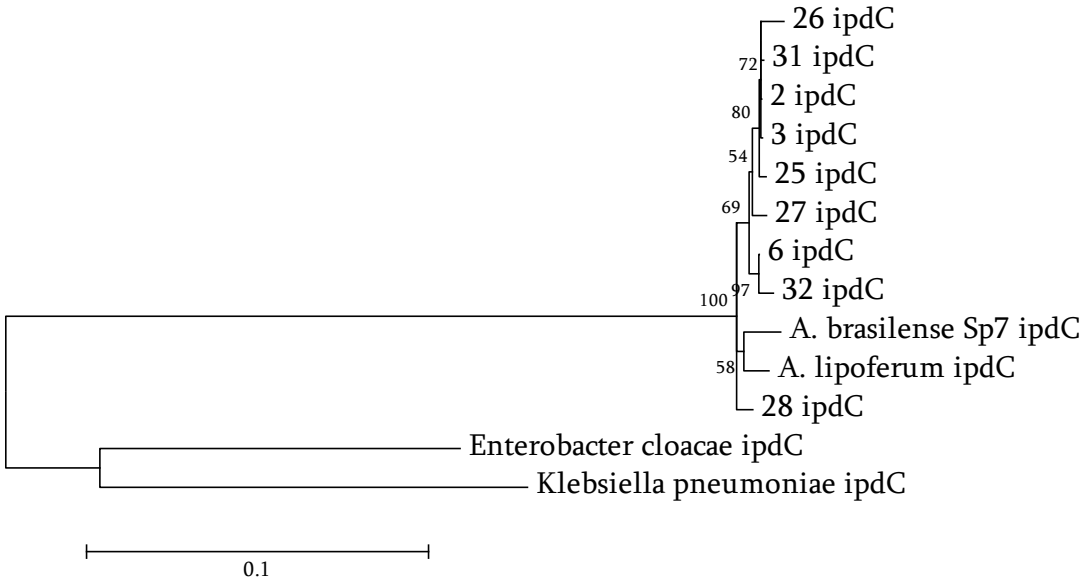
Στέλεχος	Αρχική ονομασία στελέχους	T(U)	C	A	G	G+C	Σύνολο
2	LMG 1232	14,2	35,2	14,6	36,1	71,8	1270
3	LMG 2211	14,3	35,2	14,5	36	71,2	1277
6	LMG 2213.1	14,1	35,3	14,3	35,3	70,6	1278
25	LMG 3211	14,2	35	14,5	36,4	71,4	1279
26	LMG 3212	14,2	35,2	14,9	35,7	70,9	1262
27	LMG 4221	14,2	34,9	14,6	36,4	71,3	1276
28	LMG 4222	14	35,4	14,1	36,5	71,9	1278
31	LMG 6211	14,2	35,2	14,5	36,1	71,3	1277
32	LMG 6212	14,5	35,4	14,4	35,7	71,1	1278
Μέσος Όρος		14,2	35,2	14,48	36	71,2	-

Πίν. Γ.8 Συχνότητα νουκλεοτιδίων και του αθροίσματος G+C στην κάθε μία αλληλουχία καθώς και ο μέσος όρος τους. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al*., 2007).

Γ.3.3 Φυλογενετικά δέντρα

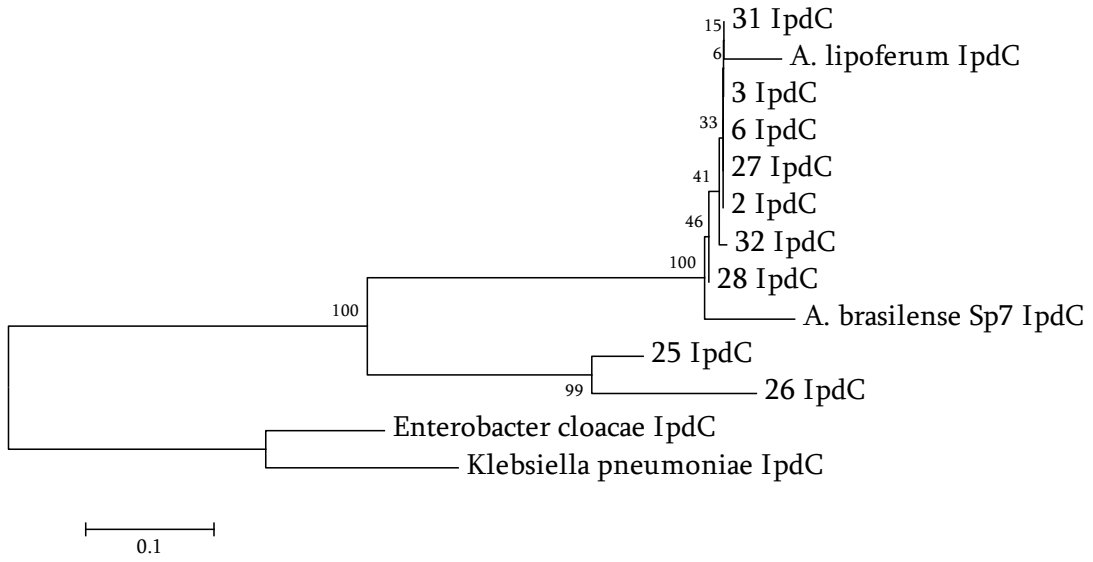
Πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση των υποκλώνων και ακολουθιών διαθέσιμων στο διαδίκτυο (βλ. Παράρτημα Accession Numbers) με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al*., 2007). Για το γονίδιο *ipdC* κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα για τις νουκλεοτιδικές και τις αμινοξικές ακολουθίες. Οι ευθυγραμμίσεις τους και οι πίνακες αποστάσεων παρατίθενται στο αντίστοιχο παράρτημα.

Το φυλογενετικό δέντρο των 9 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *ipdC* και των ακολουθιών αναφοράς έχει ως εξής:



Εικ. Γ.11 Εξελικτικές σχέσεις 9 στελεχών *Azospirillum* και στελεχών αναφοράς βάσει νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *ipdC*. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al*., 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκαν τα εντεροβακτήρια *Enterobacter cloacae* και *Klebsiella pneumoniae*. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τυπικά στελέχη του γένους *Azospirillum* (Παράρτημα Accession Numbers). Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 1219 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al*., 2007).

Για την περίπτωση των αμινοξικών αλληλουχιών *ipdC* και των ακολουθιών αναφοράς το φυλογενετικό δέντρο που προκύπτει έχει ως εξής:

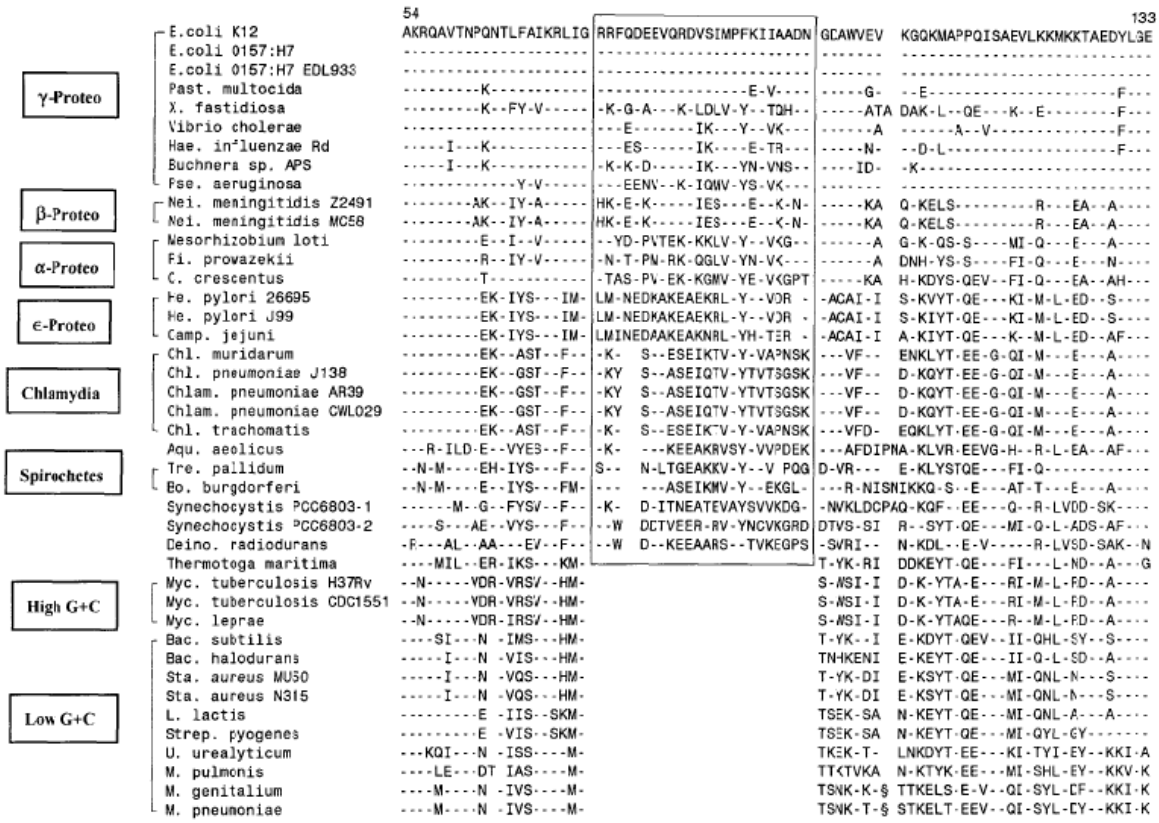


Εικ. Γ.12 Εξελικτικές σχέσεις 9 στελεχών *Azospirillum* και στελεχών αναφοράς βάσει αμινοξικής αλληλουχίας του γονιδίου *ipdC*. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν μέσω κατανομής Poisson (Zuckerkandl & Pauling, 1965β) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό αμινοξικών υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκαν τα εντεροβακτήρια *Enterobacter cloacae* και *Klebsiella pneumoniae*. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τυπικά στελέχη του γένους *Azospirillum* (Παράρτημα Accession Numbers). Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 116 θέσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al*., 2007).

Γ.4 Μοριακή ανάλυση γονιδίου *dnaK*

Η οικογένεια πρωτεϊνών Hsp70/DnaK εντοπίζεται σε όλα τα γονιδιώματα βακτηρίων που έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχησή τους. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν βασικό ρόλο ως μόρια σαπερόνης (chaperone) σε λειτουργίες δίπλωσης πρωτεϊνών και άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Το γονίδιο, που κωδικοποιεί για αυτήν την πρωτεΐνη (*dnaK*), είναι ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ των οργανισμών που το διαθέτουν. Μεταξύ Gram αρνητικών και Gram θετικών βακτηρίων παρατηρείται μία εμφανής διαφορά στην αλληλουχία του *dnaK*. Μία

ομόλογη περιοχή 21-23 αμινοξέων είναι παρούσα σε όλα τα Gram αρνητικά βακτήρια αλλά δεν υπάρχει σε κανένα Gram θετικό (Εικ. Γ.13). Σύμφωνα με ισχυρές ενδείξεις, κατά την εξέλιξη η περιοχή αυτή είναι περισσότερο πιθανό να προστέθηκε στα Gram αρνητικά βακτήρια παρά να απαλείφθηκε από τα Gram θετικά (Gupta, 2001).



Εικ. Γ.13 Ευθυγράμμιση ομόλογων Hsp70 από ολοκληρωμένα βακτηριακά γονιδιώματα. Εντός του παραλληλόγραμμου διακρίνεται η περιοχή η οποία είναι χαρακτηριστική των Gram αρνητικών βακτηρίων (Gupta, 2001).

Επιπλέον, εντός της ίδιας περιοχής διακρίνεται μία μικρή περιοχή δύο αμινοξέων η οποία εντοπίζεται μόνο στα Πρωτεοβακτήρια και η οποία πιθανώς να μπορεί να αποτελέσει ένα εργαλείο για την μοριακή ταυτοποίηση βακτηρίων ως Πρωτεοβακτήρια. Τέλος, έχει εντοπιστεί και μία τρίτη ακολουθία αποτελούμενη από τέσσερα αμινοξέα και η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαφοροποιητικό εργαλείο στη μοριακή ταξινόμηση Πρωτεοβακτηρίων. Συγκεκριμένα, η περιοχή αυτή υπάρχει μόνο σε β- και γ-Πρωτεοβακτήρια. Και οι δύο αυτές περιοχές υποδηλώνουν εξελικτικά φαινόμενα πρόσθεσης των συγκεκριμένων ακολουθιών σε κοινό πρόγονο των Πρωτεοβακτηρίων –για την πρώτη περίπτωση- και κοινό πρόγονο των β- και γ-Πρωτεοβακτηρίων –για τη δεύτερη περίπτωση (Gupta, 2000).

Γ.4.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *dnaK*

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μοριακή ανάλυση του γονιδίου *dnaK* πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος ~327 βάσεων με χρήση της τεχνικής PCR 7 υπό μελέτη υποκλώνων καθώς και των δύο στελεχών αναφοράς: *A. brasilense* LMG 13127^{T} και *A. lipoferum* LMG 13128^{T} της εταιρείας BCCM™/LMG.

Για την ενίσχυση του τμήματος *dnaK* χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές σύμφωνα με τους (Stepkowski *et al*, 2003):

Forward
TSdnaK3: 5'-AAGGAGCAGCAGATCCGCATCCA-3'

Reverse
TSdnaK2: 5´-GTACATGGCCTCGCCGAGCTTCA-3´

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν:

Αρχική αποδιάταξη	94°C για 4 λεπτά	
Αποδιάταξη	94°C για 1 λεπτό	35 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών	54°C για 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72°C για 1 λεπτό	
Τελική επιμήκυνση	72°C για 5-10 λεπτά	

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

Γ.4.2 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των 7 υποκλώνων *dnaK* και των 2 στελεχών *Azospirillum*, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν ως *Pseudomonas*, με τα στοιχεία της βάσης δεδομένων του National Center of Biotechnology Information (NCBI) μέσω του διαδικτυακού προγράμματος BLAST (Πίν. Γ.9).

Στέλεχος	Αρχική ονομασία στελέχους	Αποτέλεσμα BLAST	Max identity	Query Coverage
1	LMG 2213.1	*Rhodospirillum centenum* SW	81%	98%
3	LMG 2211	*Xanthobacter autotrophicus* Py2	78%	99%
4	LMG 2212	*Xanthobacter autotrophicus* Py2	78%	99%
6	LMG 1231	*Xanthobacter autotrophicus* Py2	76%	97%
25	LMG 3211	*Xanthobacter autotrophicus* Py2	78%	99%
26	LMG 3212	*Xanthobacter autotrophicus* Py2	78%	99%
28	LMG 4222	*Methylobacterium extorquens* AM1	78%	100%
***A. brasilense* LMG 13127^T**	-	*Xanthobacter autotrophicus* Py2	80%	99%
***A. lipoferum* LMG 13128^T**	-	*Rhodospirillum centenum* SW	81%	98%

Πίν. Γ.9 Αποτελέσματα σύγκρισης με τη βάση δεδομένων BLAST των 7 υποκλώνων οι οποίοι βάσει της μοριακής ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum* καθώς και των 2 τυπικών στελεχών *Azospirillum*.

Από τη μοριακή ανάλυση των 9 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *dnaK* προέκυψαν τα εξής στατιστικά στοιχεία για τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων:

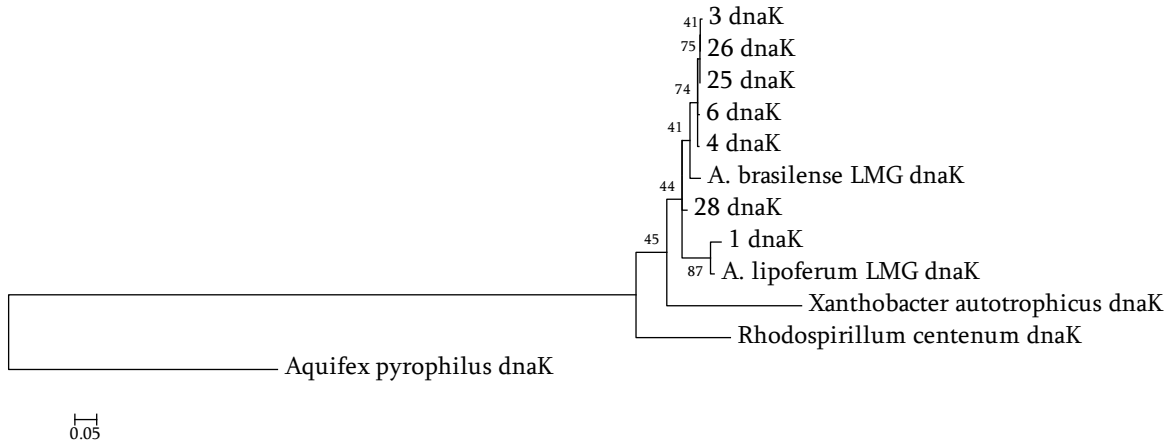
Στέλεχος	Αρχική ονομασία στελέχους	T(U)	C	A	G	G+C	Σύνολο
1	LMG 2213.1	11	32,7	22,9	33,3	66	327
3	LMG 2211	10,1	30,3	22,9	36,7	66,7	327
4	LMG 2212	10,1	30,5	22,6	36,9	67,5	328
6	LMG 1231	10,1	30,5	22,6	36,9	67,4	328
25	LMG 3211	10,1	30,3	23,2	36,4	66,7	327
26	LMG 3212	10,1	30,3	23,2	36,4	66,7	327
28	LMG 4222	9,2	32,4	23,2	35,2	67,6	327
***A. brasilense* LMG 13127^T**	-	9,2	32,2	23	35,6	67,8	326
***A. lipoferum* LMG 13127^T**	-	10,7	32,4	23,9	33	65,4	327
Μέσος Όρος		10	31,2	23,1	35,6	66,8	-

Πίν. Γ.10 Συχνότητα νουκλεοτιδίων και του αθροίσματος G+C στην κάθε μία αλληλουχία καθώς και ο μέσος όρος τους. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al*., 2007).

Γ.4.3 Φυλογενετικά δέντρα

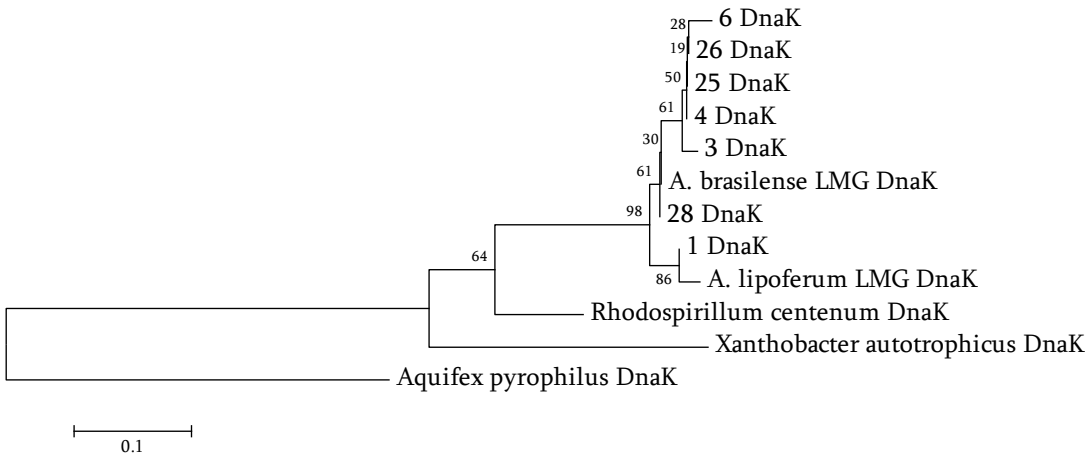
Πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση των υποκλώνων και ακολουθιών διαθέσιμων στο διαδίκτυο (βλ. Παράρτημα Accession Numbers) με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al*., 2007). Όπως για το γονίδιο *ipdC*, έτσι και για το γονίδιο *dnaK* κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα για τις νουκλεοτιδικές και τις αμινοξικές ακολουθίες. Οι ευθυγραμμίσεις τους και οι πίνακες αποστάσεων παρατίθενται στο αντίστοιχο παράρτημα.

Το φυλογενετικό δέντρο των 9 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *dnaK* και των ακολουθιών αναφοράς έχει ως εξής:



Εικ. Γ.14 Εξελικτικές σχέσεις 9 στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *dnaK*. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al*., 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκε το *Aquifex pyrophilus*. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τα *Rhodospirillum centenum* SW και *Xanthobacter autotrophicus* Py2 (Παράρτημα Accession Numbers). Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 324 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al*., 2007).

Για την περίπτωση των αμινοξικών αλληλουχιών *dnaK* και των αμινοξικών ακολουθιών αναφοράς το φυλογενετικό δέντρο που προκύπτει έχει ως εξής:



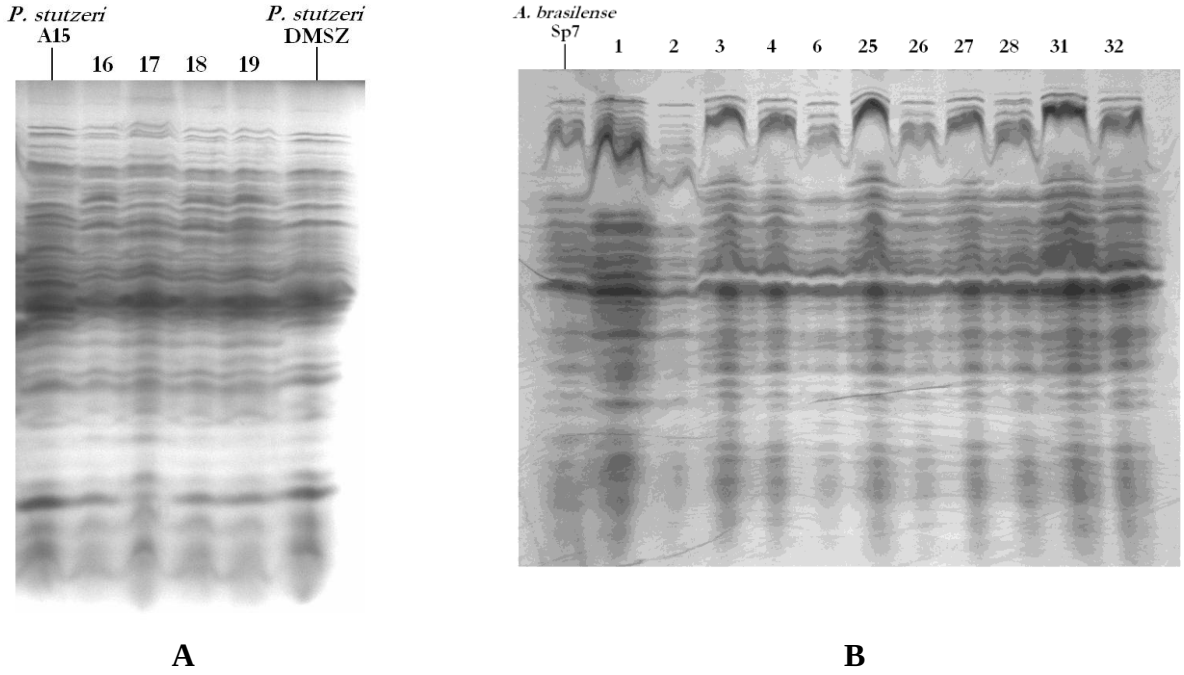
Εικ. Γ.15 Εξελικτικές σχέσεις 9 στελεχών *Azospirillum* και στελεχών αναφοράς βάσει αμινοξικής αλληλουχίας του γονιδίου *dnaK*. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν μέσω κατανομής Poisson (Zuckerkandl & Pauling, 1965β) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό αμινοξικών υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκε το *Aquifex pyrophilus*. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τα *Rhodospirillum centenum* SW και *Xanthobacter autotrophicus* Py2 (Παράρτημα Accession Numbers). Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 58 θέσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al*., 2007).

Γ.5 Σύγκριση των πρωτεϊνικών προτύπων των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών μετά από ανάλυση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης

Τα βακτηριακά στελέχη *Azospirillum* αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο Oxoid CM131 για 24 ώρες. Τα βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas* αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο Oxoid CM3 για 24 ώρες. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για τη συλλογή βακτηριακών κυττάρων από την κάθε καλλιέργεια.

Τα βακτηριακά κύτταρα λύθηκαν με βρασμό παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης και SDS και οι ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων αναλύθηκαν σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης.

Σκοπός της διαδικασίας αυτής ήταν να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές στις πρωτεΐνες των εν λόγω βακτηρίων, να συγκριθούν μεταξύ τους και πιθανόν να διεξαχθούν συμπεράσματα που αφορούν στον τρόπο δράσης τους.



Εικ. Γ.16 Ανάλυση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης πρωτεϊνών των βακτηριακών στελεχών:
(A) *Pseudomonas stutzeri* A15, 16, 17, 18, 19, *Pseudomonas stutzeri* DSMZ και
(B) *A. brasilense* στέλεχος Sp7, 1,2,3,4,6,25,26,27,28,31,32

- Τα βακτηριακά κύτταρα αναμίχθηκαν με ίσο όγκο διαλύματος φορτώσεως πρωτεϊνών
- Η ποσότητα ολικών πρωτεϊνών που αναλύθηκε στην πηκτή σε κάθε περίπτωση ήταν της τάξεως των 20μg
- Η πηκτή χρωματίστηκε με Coomassie Brilliant Blue

Σύμφωνα με την ανάλυση που έγινε παρατηρείται παρόμοιο πρωτεϊνικό προφίλ μεταξύ του τυπικού στελέχους *A. brasilense* Sp7 και των στελεχών 1, 2, 3, 4, 6, 25, 26, 27, 28, 31, 32 (*Azospirillum*) καθώς και μεταξύ των *Pseudomonas stutzeri* A15, 16, 17, 18, 19, *Pseudomonas stutzeri* DSMZ. Σαφής είναι η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δύο αυτών ομάδων στελεχών τα γεγονός που επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για διαφορετικά γένη βακτηρίων.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μοριακή ταυτοποίηση στελεχών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από ριζόσφαιρα και ιστούς φυτών σκληρού σιταριού (*Triticum turgidum durum*). Τα στελέχη αυτά έχουν ήδη απομονωθεί από το Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του ΓΠΑ και έχουν χαρακτηριστεί βάσει κλασικών μικροβιολογικών μεθόδων (Κεφαλογιάννη, 2008). Οι απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν δειγματοληπτικά από τα γεωγραφικά διαμερίσματα όπου αποτελούν τους σιτοβολώνες της Ελλάδας και αντιπροσωπεύουν το 75% της συνολικής παραγωγής σιτηρών στη χώρα. Οι περιοχές είναι οι εξής: Μακεδονία (Θεσσαλονίκη), Θεσσαλία (Κιλελέρ και Γόννοι, Λάρισας), Στερεά Ελλάδα (Κωπαΐδα και Σκούρτα Βοιωτίας, Δομοκός Φθιώτιδας).

Πριν χρησιμοποιηθούν τα βακτηριακά στελέχη στη μελέτη αυτή, έγινε επανεκτίμηση της αζωτοδεσμευτικής τους ικανότητας με τη μέθοδο αναγωγής του ακετυλενίου σε αιθυλένιο, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η ενεργή δράση της χαρακτηριστικής ιδιότητας των εν λόγω στελεχών.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μοριακή προσέγγιση της ταυτοποίησής τους. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν 4 γονίδια προκειμένου να αναλυθεί τμήμα της νουκλεοτιδικής τους ακολουθίας. Πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση και στη συνέχεια αλληλούχηση τμημάτων που κωδικοποιούν για τα συντηρημένα (housekeeping) γονίδια 16S rRNA και *dnaK* (chaperone protein DnaK) καθώς και τμημάτων δύο γονίδιων υπεύθυνων για τις σημαντικότερες ιδιότητες των αυξητικών βακτηρίων PGPR: το *nifH* (αζωτοδέσμευση) και το *ipdC* (παραγωγή φυτοορμόνης).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 16S rRNA αποτελεί ένα δυναμικό φυλογενετικό εργαλείο και βάσει αυτού έχουν δημιουργηθεί τα περισσότερα φυλογενετικά δέντρα προκαρυωτικών οργανισμών. Το γονίδιο 16S rRNA αποτελεί το πιο αποδεκτό και ευρέως χρησιμοποιούμενο συντηρημένο γονίδιο που χρησιμοποιείται στην βακτηριακή ταξινόμηση και φυλογένεια. Έχει μέγεθος ~1500bp, το οποίο εξυπηρετεί σε έρευνες βιοπληροφορικής (Janda & Abbott, 2007). Σύμφωνα με την ad-hoc επιτροπή για την επανεκτίμηση του προσδιορισμού ειδών στη βακτηριολογία, κατά την περιγραφή ενός νέου είδους η ακολουθία 16S rRNA, προκειμένου να είναι αντιπροσωπευτική, πρέπει να είναι μεγαλύτερη των 1300 βάσεων (Stackebrandt *et al*., 2002). Για τον λόγο αυτό ενισχύθηκε τμήμα 1450 βάσεων του 16S rRNA -επί συνόλου περίπου 1500bp (96,6-100%). Παρά την αναμφισβήτητη αποδοχή του γονιδίου 16S rRNA ως μοριακό εργαλείο, προτείνεται η μοριακή ανάλυση περισσότερων του ενός γονιδίων προκειμένου να υποστηρίζονται τα αποτελέσματα των φυλογενετικών αναλύσεων.

Το *dnaK* (Hsp70) κωδικοποιεί για μόρια σαπερόνης (chaperone protein) τα οποία επιτελούν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως το δίπλωμα των πρωτεϊνών και η προστασία έναντι υψηλών θερμοκρασιών. Αποτελεί συντηρημένο γονίδιο μεταξύ προκαρυωτικών οργανισμών και χρησιμοποιείται ως φυλογενετικό εργαλείο κυρίως μεταξύ Πρωτεοβακτηρίων αλλά και Gram αρνητικών - Gram θετικών βακτηρίων. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση τμήματος νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεγέθους 327bp.

Το *nifH* αποτελεί δομικό γονίδιο που κωδικοποιεί για την Fe-πρωτεΐνη της νιτρογενάσης (αναγωγάση νιτρογενάσης). Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ανάλυση τμήματος νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεγέθους 359bp – επί συνόλου 882bp (40,7%). Οι περισσότερες έρευνες επιβεβαιώνουν ότι η φυλογένεια του γονιδίου *nifH* συμφωνεί σε πολύ μεγάλο βαθμό με τη φυλογένεια του 16S rRNA. Βάσει αυτού, οι εξελικτικές σχέσεις στελεχών όπως προκύπτουν από μοριακές αναλύσεις του γονιδίου *nifH* είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται για να υποστηρίζουν φυλογενετικές αναλύσεις άλλων γονιδίων σε αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς.

Η αυξίνη ινδολοξικό οξύ παράγεται από τα PGPR βακτήρια, κυρίως, μέσω ενός μονοπατιού της τρυπτοφάνης, του μονοπατιού του ινδολοπυρουβικού οξέος (IPyA). Η αποκαρβοξυλάση του ινδολοπυρουβικού οξέος συμμετέχει στο μονοπάτι αυτό και κωδικοποιείται από το γονίδιο *ipdC*. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση τμήματος νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεγέθους 1278bp –επί συνόλου 1638bp (78%).

Μετά την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έκαστου γονιδίου, έγινε σύγκριση με τη βάση δεδομένων του προγράμματος BLAST του διαδικτυακού τόπου NCBI (National Center for Biotechnology Information). Τα αποτελέσματα της αναζήτησης στο BLAST για το τμήμα του γονιδίου 16S rRNA χρησιμοποιήθηκαν ως αναφορά για την ταξινόμηση και ταυτοποίηση των στελεχών. Οι συγκρίσεις που ακολούθησαν για τα άλλα υπό μελέτη γονίδια συμφωνούν με τα δεδομένα που προέκυψαν για το 16S rRNA. Εξαίρεση αποτελεί το τμήμα του γονιδίου *dnaK*, για το οποίο όμως δεν υπάρχουν διαθέσιμες ακολουθίες όσον αφορά στο γένος *Azospirillum*.

Βάσει των αποτελεσμάτων δύο από τα στελέχη που μελετήθηκαν παρουσιάζουν 98% ομολογία με στελέχη *Azospirillum* sp. αλλά και με το στέλεχος μοντέλο *Azospirillum oryzae* N7. Τα είδη αυτά είναι τα 1 και 2, και σύμφωνα με την ονοματολογία που εδόθη από το Εργαστήριο Γεωργικής Μικροβιολογίας του ΓΠΑ πρόκειται για τα 1231 και 1232, αντιστοίχως. Τα συγκεκριμένα στελέχη απομονώθηκαν από φυτά σκληρού σιταριού από την περιοχή Σκούρτα Βοιωτίας. Το στέλεχος 1 (1231) έχει απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα ενώ το στέλεχος 2 (1232) απευθείας από την επιφάνεια της ρίζας. Επίσης, το στέλεχος 28 (4222) έχει ομοιότητα 99% με στέλεχος *Azospirillum* sp. και 98% με το *Azospirillum brasilense*. Το 28 (4222) έχει απομονωθεί από την επιφάνεια της ρίζας στην περιοχή της Θεσσαλονίκης.

Εφτά από τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *Azospirillum brasilense* με ομολογία 99% με το τυπικό στέλεχος. Πρόκειται για τα στελέχη 3 (2211), 4 (2212), 6 (2213.1) απομονωμένα από την Κωπαΐδα, Βοιωτίας, 25 (3211) και 26 (3212) από το Δομοκό,

Φθιώτιδας, 27 (4221) από περιοχή Θεσσαλονίκης και το 32 (6212) από το Κιλελέρ, Λάρισας. Τα στελέχη 3 (2211), 4 (2212), 6 (2213.1) είναι απομονωμένα από διαφορετικά φυτά από την ίδια γεωγραφική περιοχή και από διαφορετικό σημείο του φυτού. Το 3 (2211) έχει απομονωθεί από την ριζόσφαιρα και το 4 (2212) από την επιφάνεια της ρίζας. Το 25 (3211) έχει απομονωθεί από έδαφος κοντά στη ρίζα. Η απομόνωση του στελέχους 6 (2213.1) παρουσιάζει μεγαλύτερο ενδιαφέρον γιατί έχει απομονωθεί από το εσωτερικό του φυτού. Το γεγονός ότι το στέλεχος αυτό είναι ενδοφυτικό, δείχνει ότι το *Azospirillum brasilense* μπορεί να εγκατασταθεί στο εσωτερικό του φυτού και να λειτουργήσει ως πηγή αζώτου. Σε προηγούμενες έρευνες, αναφέρεται η ιδιότητα του στελέχους Sp245 να αποικίζει το εσωτερικό του φυτού σε κύτταρα της επιδερμίδας της ρίζας. Το είδος *A. brasilense* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο είδος που απαντά σε ποικίλες κλιματολογικές συνθήκες και γεωγραφικές περιοχές και είναι το πιο μελετημένο αζωτοδεσμευτικό βακτήριο ελεύθερης διαβίωσης. Όπως σε όλα τα είδη του γένους *Azospirillum* ο μηχανισμός της αζωτοδέσμευσης ίσως πρέπει να θεωρείται ότι έχει περισσότερο καταλυτικό ρόλο στην ανάπτυξη του φυτού παρά ότι αποτελεί την κύρια πηγή αζώτου.

Το στέλεχος 31 (6211) ταυτοποιήθηκε ως *Azospirillum oryzae* με ποσοστό ομοιότητας 98% με το στέλεχος μοντέλο *Azospirillum oryzae* N7. Το στέλεχος αυτό έχει απομονωθεί από έδαφος κοντά στη ρίζα σκληρού σιταριού από την περιοχή Κιλελέρ, Λάρισας. Το είδος *A. oryzae* σχηματίστηκε σχετικά πρόσφατα και αφορούσε απομονώσεις από ρίζες ρυζιού. Ωστόσο πλέον η ευεργετική του δράση έχει διαπιστωθεί και σε άλλα αγρωστώδη φυτά.

Όσον αφορά στα στελέχη 16 (1221.1), 17 (1221), 18 (1221.2), 19 (1221.3), 20 (1221.3u) και 21 (1221.3r) η σύγκριση των τμημάτων 16S rRNA με το πρόγραμμα BLAST φανέρωσε ότι πρόκειται για είδη του γένους *Pseudomonas*. Τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν 99% ομολογία με ορισμένα καλλιεργήσιμα και μη καλλιεργήσιμα στελέχη *Pseudomonas* αλλά και με το στέλεχος μοντέλο *Pseudomonas stutzeri* A1501. Και τα έξι στελέχη έχουν απομονωθεί από έδαφος ρίζας σκληρού σίτου στα Σκούρτα Βοιωτίας. Το *P. stutzeri* είναι το μοναδικό είδος του γένους *Pseudomonas* το οποίο δεσμεύει ατμοσφαιρικό άζωτο ενώ τα περισσότερα έχουν κλινική σημασία ως παθογόνα φυτών και ζώων. Το *P. stutzeri* προάγει την ανάπτυξη σε ορισμένα φυτά –αγρωστώδη και μη- ενώ έχει διαπιστωθεί ότι έχει και ενδοφυτική δράση σε φυτά ρυζιού. Το είδος αυτό είναι ιδιαίτερα ποικιλόμορφο από γενετική άποψη και χωρίζεται σε 18 genomovar. Ενδιαφέρον έχει να διαπιστωθεί σε μελλοντικές μελέτες αν τα υπό μελέτη στελέχη της εργασίας αποτελούν νέα genomovar ή ανήκουν σε κάποια από τα υπάρχοντα.

Από τα δεκαεπτά στελέχη που μελετήθηκαν διαπιστώθηκε ότι τα έντεκα ανήκουν στο γένος *Azospirillum*. Τα εφτά στελέχη ανήκουν στο *Azospirillum brasilense*, ένα στο *Azospirillum oryzae* και τρία αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum* sp. με μεγάλη ομολογία με *A. brasilense* (1 στέλεχος) και το *A. oryzae* (2 στελέχη). Τα υπόλοιπα έξι στελέχη ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* και, πιθανώς, πρόκειται για στελέχη του αζωτοδεσμευτικού είδους

Pseudomonas stutzeri. Οι απομονώσεις που πραγματοποιήθηκαν από τα Σκούρτα Βοιωτίας αφορούν τα *Pseudomonas stutzeri* καθώς και τα δύο στελέχη που, πιθανώς, ανήκουν στο είδος *A. oryzae*. Από το Κιλελέρ Λάρισας απομονώθηκαν ένα στέλεχος *A. brasilense* από την επιφάνεια της ρίζας και ένα στέλεχος *A. oryzae* από έδαφος ρίζας. Στις υπόλοιπες τοποθεσίες απομονώθηκαν μόνο *A. brasilense* είτε ενδοφυτικά είτε από ριζόσφαιρα είτε από επιφάνεια ρίζας είτε από έδαφος ρίζας, γεγονός που φανερώνει και τον κοσμοπολίτικο χαρακτήρα τους. Όσον αφορά στις ποικιλίες σιταριού δε φαίνεται να υπάρχει καμία εξειδίκευση ούτε σε επίπεδο γένους βακτηρίων ούτε σε επίπεδο είδους.

Από τη φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA προέκυψαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Τα στελέχη 1, 2 και 31, τα οποία βάσει των αποτελεσμάτων BLAST ανήκουν στο είδος *Azospirillum oryzae*, σχηματίζουν στο φυλογενετικό δέντρο μία ομάδα (cluster) μαζί με το στέλεχος μοντέλο *Azospirillum oryzae* N7. Τα υπόλοιπα στελέχη τα οποία αναγνωρίστηκαν ως *Azospirillum brasilense* σχηματίζουν μία ξεχωριστή ομάδα συγγένειας με τα στελέχη να παρουσιάζονται πολύ κοντινά μεταξύ τους. Στην ίδια ομάδα αλλά σε ξεχωριστό κλάδο ανήκει και το στέλεχος 28 (*Azospirillum* sp.) γεγονός που σημαίνει ότι πιθανώς ανήκει και αυτό στο είδος *Azospirillum brasilense*. Το στέλεχος μοντέλο *Azospirillum lipoferum* B2 παρουσιάζεται όπως αναμενόταν να μην έχει στενή συγγένεια με τα προηγούμενα και ανήκει σε κλάδο ο οποίος είναι πιο κοντινός στην ομάδα των *Azospirillum oryzae*. Τα στελέχη 16, 17, 18, 19, 20 και 21 σχηματίζουν μία ξεχωριστή ομάδα μαζί με το στέλεχος μοντέλο *Pseudomonas stutzeri* A1501 η οποία είναι σαφώς διαχωρισμένη από την ευρύτερη ομάδα των *Azospirillum*. Αξίζει να αναφερθεί ότι το *Azotobacter vinelandii* παρουσιάζει, σχετικά, στενή συγγένεια με την ομάδα των *Pseudomonas* και το οποίο έχει προταθεί η μεταφορά του στο γένος *Pseudomonas*.

Σημαντικά συμπεράσματα προκύπτουν από την σύγκριση των αποτελεσμάτων των φυλογενετικών αναλύσεων μεταξύ 16S rRNA και *nifH*. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το φυλογενετικό δέντρο του γονιδίου *nifH* συμφωνεί σε μεγάλο βαθμό με το αντίστοιχο του 16S rRNA και για τον λόγο αυτό άλλωστε έχει καθιερωθεί η ανάλυση του συγκεκριμένου γονιδίου. Πράγματι, και την παρούσα μελέτη, τα φυλογενετικά δέντρα του γονιδίου *nifH* παρουσιάζουν της ίδιες ομαδοποιήσεις με αυτές που παρατηρούνται στο δέντρο του 16S rRNA επιβεβαιώνοντας έτσι τη φυλογενετική δυναμική του γονιδίου αυτού. Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα του BLAST για το *nifH* ενισχύουν την διαπίστωση ότι τα στελέχη 1, 2 και 31 ανήκουν στο *Azospirillum oryzae*, τα στελέχη 3, 4, 6, 25, 26, 27, 28 και 32 στο *Azospirillum brasilense* και τα στελέχη 16-21 στο *Pseudomonas stutzeri*.

Η μελέτη τμήματος του συντηρημένου γονιδίου *dnaK* παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Αυτό διότι δεν έχει αλληλουχηθεί ολόκληρο το γονίδιο για στελέχη του γένους *Azospirillum*. Έτσι, εκτός από τα επτά υπό μελέτη στελέχη *Azospirillum* της παρούσας εργασίας αναλύθηκαν μοριακά και δύο στελέχη μοντέλα. Πρόκειται για τα *Azospirillum brasilense* Sp7 (LMG 13127^{T}) και *Azospirillum lipoferum* Sp 59b (LMG 13128^{T}). Κατά τη σύγκριση με το πρόγραμμα BLAST, διαπιστώθηκε ότι το στέλεχος 1 (πιθανώς, *Azospirillum*

oryzae) καθώς και το *A. lipoferum* Sp 59b έχουν υψηλότερη ομολογία (81%) με το *Rhodospirillum centenum* SW. Τα στελέχη 3, 4, 6, 25, 26 (*Azospirillum brasilense*) και το *Azospirillum brasilense* Sp7 έχουν ομολογία από 76-80% με το *Xanthobacter autotrophicus* Py2. Τέλος, το στέλεχος 28 (*Azospirillum* sp.) έχει 78% ομολογία με το *Methylobacter extorquens* AM1. Τα αποτελέσματα του BLAST απεικονίζονται και στο αντίστοιχο φυλογενετικό δέντρο του *dnaK*. Παρατηρούμε ότι παρόλο που το τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου που αλληλουχήθηκε ήταν σχετικά μικρό, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ιδιαίτερα αξιόπιστα και ικανά να απεικονίσουν ρεαλιστικά την φυλογένεια των παραπάνω στελεχών. Αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό και στο γεγονός ότι το γονίδιο *dnaK* είναι πολύ συντηρημένο ειδικά μεταξύ Πρωτεοβακτηρίων και ότι η περιοχή που έχει επιλεχθεί προς αλληλούχηση παρουσιάζει σημαντική ποικιλομορφία.

Η απομόνωση και μελέτη της φυσιολογίας και οικολογίας νέων στελεχών *Azospirillum* δίνουν τη δυνατότητα ευρείας μελλοντικής έρευνας. Τα στελέχη αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενδεχόμενα σκευάσματα εμβολιασμού των εδαφών καλλιεργειών. Τέτοιου είδους σκευάσματα χρησιμοποιούνται επιτυχώς στην εφαρμογή οργανικής γεωργίας μια και η παραγωγή βιολογικών προϊόντων προωθείται πολύ τα τελευταία χρόνια. Τα σκευάσματα αυτά είναι οικονομικά και εύχρηστα. Έχει αναπτυχθεί προσφάτως εμβόλιο (Thamizh Vendan & Thangaraju, 2007a, 2007b) που βασίζεται στην καλλιέργεια *Azospirillum* σε θρεπτικό μέσο αλάτων οπού επάγει την ανάπτυξη κυστών οι οποίες είναι βιώσιμες για 14 και πλέον μήνες. Τα εγκυστωμένα βακτηριακά κύτταρα είναι ανθεκτικά στην ξηρασία και υψηλή θερμοκρασία μέχρι 40°C και μετατρέπονται εύκολα σε βλαστικά κύτταρα με απλά θρεπτικά μέσα (όπως νερό βρύσης κ.ά.) και προσκολλώνται αποτελεσματικά σε σπόρους και ρίζες. Τα σκευάσματα αυτά μεγιστοποιούν τα οφέλη της αζωτοδέσμευσης και προωθούν τους μηχανισμούς ανάπτυξης του φυτού. Τα είδη του γένους *Azospirillum* μπορούν να ωφελήσουν το φυτό σε συνδυασμό ή όχι με άλλους μικροοργανισμούς όπως μυκόρριζες που ευνοούν την εγκατάσταση και ανάπτυξη των φυταρίων ενώ μειώνεται η διάβρωση του εδάφους.

Επίσης, εφαρμογή *Azospirillum* μπορεί να συμβάλλει στην επίλυση περιβαλλοντικών προβλημάτων όπως στην αποτοξίνωση υγρών αποβλήτων. Αναφέρεται ότι διασπούν κάτω από μικροαερόφιλες συνθήκες υδρογονάνθρακες όπως βενζόλιο, τολουόλιο κ.α. και αιθανόλη χημικά τα οποία ρυπαίνουν τα υπόγεια ύδατα (Cápiro *et al*., 2008). Στελέχη *Azospirillum* και *Pseudomonas* βιοαποικοδομούν το ισχυρό οργανοφωσφωρικό παρασιτοκτόνο Ethion (Foster *et al*., 2004). Βιοεξυγίανση των υπογείων υδάτων μεταξύ των οποίων και βακτήρια του γένους *Azospirillum* είναι διαδεδομένη στις Ηνωμένες Πολιτείες. Εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων έδειξε ότι τα *Azospirillum* είναι δραστικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπερχλωριωδών αλάτων συγκριτικά με άλλους μικροοργανισμούς (Waller *et al*. 2004).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ GENBANK ACCESSION NUMBERS

***Aquifex pyrophilus dnaK* gene, partial**
GenBank: AJ005800.1

***Azoarcus* sp. BH72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**
GenBank: AF011344.1

***Azoarcus* sp. BH72, complete genome (*nifH*)**
GenBank: AM406670.1

***Azospirillum brasilense* (Sp7) 16S rRNA gene**
GenBank: X79739.1

***Azospirillum brasilense nifH* gene**
GenBank: X51500.1

***Azospirillum brasilense ipdC* gene (partial)**
GenBank: X88853.1

***Azospirillum lipoferum* strain B2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**
GenBank: DQ787330.1

***Azospirillum lipoferum* strain B2 dinitrogenase reductase (*nifH*) gene, partial cds**
GenBank: DQ787331.1

***Azospirillum lipoferum ipdC* gene for indole-3-pyruvic acid decarboxylase, complete cds**
GenBank: AB052841.1

***Azospirillum oryzae* strain N7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**
GenBank: DQ682470.1

***Azospirillum oryzae* strain N7 NifH (*nifH*) gene, partial cds**
GenBank: DQ682472.1

***Azotobacter vinelandii* strain ISSDS-435 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**
GenBank: EF620451.1

***Azotobacter vinelandii* strain ISSDS-435 NifH-like gene, partial sequence**
GenBank: EF620500.1

***Enterobacter cloacae* indolepyruvate decarboxylase (*ipdC*) gene, partial cds**
GenBank: AF285632.2

***Klebsiella pneumoniae* 342, complete genome (*ipdC*)**
NCBI Reference Sequence: NC_011283.1

***Methylococcus capsulatus* partial 16S rRNA gene, strain Texas**
GenBank: AJ563935.1

***Methylococcus capsulatus* partial *nifH* gene for nitrogenase iron protein, strain Texas**
GenBank: AJ563958.1

***Pseudomonas stutzeri* 16S ribosomal RNA, complete sequence**
GenBank: AF143245.1

***Pseudomonas stutzeri* A1501, complete genome (*nifH*)**

GenBank: CP000304.1

***Rhodospirillum centenum* SW, complete genome (*dnaK*)**

GenBank: CP000613.1

***Xanthobacter autotrophicus* Py2, complete genome (*dnaK*)**

NCBI Reference Sequence: NC_009720.1

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΑΠΟΣΤΑΣΕΩΝ

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
[1]	#1_16S																							
[2]	#2_16S	0.001																						
[3]	#3_16S	0.040	0.039																					
[4]	#4_16S	0.040	0.039	0.003																				
[5]	#6_16S	0.040	0.039	0.000	0.003																			
[6]	#25_16S	0.039	0.038	0.002	0.002	0.002																		
[7]	#26_16S	0.041	0.040	0.001	0.004	0.001	0.003																	
[8]	#27_16S	0.038	0.037	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002																
[9]	#28_16S	0.030	0.029	0.016	0.016	0.016	0.015	0.017	0.014															
[10]	#32_16S	0.038	0.037	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.000	0.014														
[11]	#A._brasilense_Sp7_16S	0.039	0.041	0.023	0.023	0.023	0.022	0.024	0.021	0.022	0.021													
[12]	#A._lipoferum_B2_16S	0.017	0.017	0.037	0.037	0.037	0.036	0.037	0.035	0.029	0.035	0.041												
[13]	#A._oryzae_N7_16S	0.010	0.009	0.037	0.037	0.037	0.037	0.038	0.036	0.028	0.036	0.042	0.024											
[14]	#Azoarcus_sp._BH72_16S	0.239	0.242	0.237	0.242	0.237	0.241	0.239	0.240	0.237	0.240	0.248	0.239	0.245										
[15]	#Methylococcus_capsulatus	0.233	0.236	0.227	0.229	0.227	0.228	0.228	0.227	0.226	0.227	0.229	0.232	0.234	0.157									
[16]	#31_16S	0.012	0.011	0.037	0.037	0.037	0.036	0.037	0.035	0.029	0.035	0.049	0.025	0.010	0.244	0.240								
[17]	#16_16S	0.252	0.255	0.249	0.254	0.249	0.253	0.250	0.252	0.255	0.252	0.255	0.245	0.256	0.185	0.128	0.259							
[18]	#17_16S	0.249	0.251	0.245	0.250	0.245	0.249	0.247	0.248	0.252	0.248	0.252	0.242	0.252	0.184	0.125	0.255	0.003						
[19]	#18_16S	0.250	0.253	0.247	0.252	0.247	0.251	0.248	0.249	0.253	0.249	0.253	0.243	0.253	0.184	0.127	0.256	0.003	0.001					
[20]	#19_16S	0.251	0.254	0.248	0.253	0.248	0.251	0.249	0.250	0.254	0.250	0.254	0.244	0.254	0.186	0.127	0.257	0.004	0.001	0.003				
[21]	#20_16S	0.252	0.255	0.246	0.251	0.246	0.250	0.248	0.249	0.255	0.249	0.254	0.245	0.255	0.185	0.126	0.257	0.004	0.002	0.002	0.004			
[22]	#21_16S	0.250	0.252	0.247	0.251	0.247	0.250	0.248	0.249	0.253	0.249	0.252	0.243	0.253	0.185	0.124	0.256	0.004	0.001	0.002	0.002	0.001		
[23]	#P._stutzeri_A1501_16S	0.256	0.258	0.252	0.257	0.252	0.256	0.253	0.255	0.258	0.255	0.258	0.248	0.259	0.183	0.128	0.262	0.006	0.005	0.005	0.006	0.005	0.005	
[24]	#Azotobacter_vinelandii_16S	0.251	0.253	0.249	0.251	0.249	0.250	0.250	0.249	0.256	0.249	0.249	0.248	0.258	0.188	0.117	0.262	0.052	0.050	0.050	0.052	0.051	0.051	0.052

Εκτίμηση εξελικτικής απόκλισης μεταξύ όλων των ακολουθιών για το γονίδιο 16S
Παρουσιάζεται ο αριθμός υποκαταστάσεων βάσεων ανά θέση. Όλα τα αποτελέσματα βασίζονται στην ανάλυση ανά ζεύγη 24 ακολουθιών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Maximum Composite Likelihood με το πρόγραμμα MEGA4 (Tamura *et al*., 2004, Tamura *et al*., 2007). Όλες οι θέσεις που παρουσίαζαν κενά ή έλειπαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Συνολικός αριθμός θέσεων: 1340.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
[1]	#nifH1																						
[2]	#nifH2	0.000																					
[3]	#nifH3	0.067	0.067																				
[4]	#nifH4	0.063	0.063	0.010																			
[5]	#nifH6	0.067	0.067	0.013	0.003																		
[6]	#nifH25	0.067	0.067	0.000	0.010	0.013	0.000																
[7]	#nifH26	0.067	0.067	0.000	0.010	0.013	0.007	0.007															
[8]	#nifH27	0.074	0.074	0.007	0.017	0.020	0.007	0.010	0.017														
[9]	#nifH28	0.063	0.063	0.010	0.000	0.003	0.010	0.010	0.074	0.063													
[10]	#nifH31	0.007	0.007	0.067	0.063	0.067	0.067	0.067	0.030	0.013	0.064												
[11]	#nifH32	0.064	0.064	0.024	0.013	0.017	0.024	0.024	0.017	0.000	0.003	0.013											
[12]	#A._brasilense_Sp7_nifH	0.063	0.063	0.010	0.000	0.003	0.010	0.010	0.017	0.067	0.063	0.067	0.067										
[13]	#A._oryzae_N7_nifH	0.010	0.010	0.071	0.067	0.071	0.071	0.071	0.078	0.067	0.003	0.067	0.187	0.217									
[14]	#Methylococcus_capsulatus	0.206	0.206	0.194	0.187	0.192	0.194	0.194	0.203	0.187	0.211	0.197	0.187	0.020	0.208								
[15]	#A._lipoferum_B2_nifH	0.017	0.017	0.048	0.045	0.048	0.048	0.048	0.055	0.045	0.017	0.045	0.045	0.045	0.020	0.172							
[16]		0.157	0.157	0.171	0.161	0.166	0.171	0.171	0.180	0.161	0.153	0.172	0.161	0.158	0.209	0.167	0.003						
[17]		0.153	0.153	0.167	0.157	0.161	0.167	0.167	0.176	0.157	0.149	0.168	0.157	0.153	0.204	0.167	0.003	0.003					
[18]		0.158	0.158	0.172	0.162	0.166	0.172	0.172	0.181	0.162	0.153	0.173	0.162	0.158	0.209	0.172	0.007	0.003	0.003				
[19]		0.153	0.153	0.167	0.157	0.161	0.167	0.167	0.176	0.157	0.149	0.168	0.157	0.153	0.204	0.167	0.003	0.000	0.003	0.000			
[20]		0.153	0.153	0.167	0.157	0.161	0.167	0.167	0.176	0.157	0.149	0.168	0.157	0.153	0.204	0.167	0.003	0.000	0.003	0.000	0.000		
[21]		0.153	0.153	0.167	0.157	0.161	0.167	0.167	0.176	0.157	0.149	0.168	0.157	0.153	0.204	0.167	0.003	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	
[22]		0.153	0.153	0.167	0.157	0.161	0.167	0.167	0.176	0.157	0.149	0.168	0.157	0.153	0.204	0.167	0.003	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000
[23]	#Azotobacter_vinelandii_nifH	0.409	0.409	0.408	0.414	0.419	0.408	0.408	0.408	0.414	0.416	0.428	0.414	0.425	0.463	0.422	0.377	0.371	0.378	0.371	0.371	0.371	0.371

Εκτίμηση εξελικτικής απόκλισης μεταξύ όλων των ακολουθιών για το γονίδιο *nifH*

Παρουσιάζεται ο αριθμός υποκαταστάσεων βάσεων ανά θέση. Όλα τα αποτελέσματα βασίζονται στην ανάλυση ανά ζεύγη 23 ακολουθιών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Maximum Composite Likelihood με το πρόγραμμα MEGA4 (Tamura *et al*., 2004, Tamura *et al*., 2007). Όλες οι θέσεις που παρουσίαζαν κενά ή έλειπαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Συνολικός αριθμός θέσεων: 306.

```
[ 1]  #2_ipdC
[ 2]  #3_ipdC
[ 3]  #6_ipdC
[ 4]  #25_ipdC
[ 5]  #26_ipdC
[ 6]  #27_ipdC
[ 7]  #28_ipdC
[ 8]  #31_ipdC
[ 9]  #32_ipdC
[10]  #A._brasilense_Sp7_ipdC
[11]  #A._lipoferum_ipdC
[12]  #Enterobacter_cloacae_ipdC
[13]  #Klebsiella_pneumoniae_ipdC

          1      2      3      4      5      6      7      8      9     10     11     12
[ 1]
[ 2]   0.000
[ 3]   0.006 0.006
[ 4]   0.002 0.003 0.008
[ 5]   0.007 0.008 0.013 0.010
[ 6]   0.006 0.007 0.008 0.009 0.014
[ 7]   0.010 0.010 0.009 0.012 0.017 0.012
[ 8]   0.000 0.001 0.006 0.003 0.008 0.007 0.010
[ 9]   0.010 0.011 0.004 0.013 0.018 0.012 0.014 0.011
[10]   0.019 0.020 0.020 0.022 0.027 0.022 0.020 0.020 0.024
[11]   0.017 0.017 0.015 0.019 0.024 0.018 0.015 0.017 0.020 0.018
[12]   0.354 0.354 0.352 0.352 0.354 0.355 0.354 0.355 0.353 0.359 0.356
[13]   0.374 0.374 0.375 0.373 0.378 0.375 0.368 0.375 0.379 0.375 0.371 0.230
```

Εκτίμηση εξελικτικής απόκλισης μεταξύ νουκλεοτιδικών ακολουθιών για το γονίδιο *ipdC*
Παρουσιάζεται ο αριθμός υποκαταστάσεων βάσεων ανά θέση. Όλα τα αποτελέσματα βασίζονται στην ανάλυση ανά ζεύγη 13 ακολουθιών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Maximum Composite Likelihood με το πρόγραμμα MEGA4 (Tamura *et al*., 2004, Tamura *et al*., 2007). Όλες οι θέσεις που παρουσίαζαν κενά ή έλειπαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Συνολικός αριθμός θέσεων: 1219.

```
[ 1]  #2_IpdC
[ 2]  #3_IpdC
[ 3]  #6_IpdC
[ 4]  #25_IpdC
[ 5]  #26_IpdC
[ 6]  #27_IpdC
[ 7]  #28_IpdC
[ 8]  #31_IpdC
[ 9]  #32_IpdC
[10]  #A._brasilense_Sp7_IpdC
[11]  #A._lipoferum_IpdC
[12]  #Enterobacter_cloacae_IpdC
[13]  #Klebsiella_pneumoniae_IpdC

[          1      2      3      4      5      6      7      8      9     10     11     12
[ 1]
[ 2]   0.000
[ 3]   0.000 0.000
[ 4]   0.477 0.477 0.477
[ 5]   0.595 0.595 0.595 0.169
[ 6]   0.000 0.000 0.000 0.477 0.595
[ 7]   0.009 0.009 0.009 0.463 0.579 0.009
[ 8]   0.000 0.000 0.000 0.477 0.595 0.000 0.009
[ 9]   0.009 0.009 0.009 0.477 0.595 0.009 0.017 0.009
[10]   0.081 0.081 0.081 0.549 0.659 0.081 0.090 0.081 0.090
[11]   0.044 0.044 0.044 0.549 0.626 0.044 0.053 0.044 0.053 0.129
[12]   0.842 0.842 0.842 0.903 0.882 0.842 0.822 0.842 0.842 0.882 0.882
[13]   0.925 0.925 0.925 0.842 0.822 0.925 0.903 0.925 0.925 0.969 0.969 0.243
```

Εκτίμηση εξελικτικής απόκλισης μεταξύ αμινοξικών ακολουθιών για το γονίδιο *ipdC*
Παρουσιάζεται ο αριθμός υποκαταστάσεων αμινοξέων ανά θέση. Όλα τα αποτελέσματα βασίζονται στην ανάλυση ανά ζεύγη 13 ακολουθιών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου διόρθωσης κατά Poisson με το πρόγραμμα MEGA4 (Zuckerkandl & Pauling, 1965, Tamura *et al*., 2007). Όλες οι θέσεις που παρουσίαζαν κενά ή έλειπαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Συνολικός αριθμός θέσεων: 116.

```
[  1]  #1_dnaK
[  2]  #3_dnaK
[  3]  #4_dnaK
[  4]  #6 dnaK
[  5]  #25_dnaK
[  6]  #26_dnaK
[  7]  #28 dnaK
[  8]  #A._brasilense_LMG_dnaK
[  9]  #A._lipoferum_LMG_dnaK
[ 10]  #Rhodospirillum_centenum
[ 11]  #Xanthobacter autotrophicus
[ 12]  #Aquifex_pyrophilus_dnaK

           1      2      3      4      5      6      7      8      9     10     11
[  1]
[  2]   0.131
[  3]   0.122  0.013
[  4]   0.122  0.013  0.006
[  5]   0.127  0.003  0.009  0.009
[  6]   0.127  0.003  0.009  0.009  0.000
[  7]   0.117  0.058  0.051  0.051  0.054  0.054
[  8]   0.108  0.050  0.043  0.043  0.047  0.047  0.047
[  9]   0.033  0.120  0.112  0.112  0.116  0.116  0.098  0.090
[ 10]   0.325  0.401  0.374  0.382  0.393  0.393  0.336  0.370  0.317
[ 11]   0.414  0.400  0.389  0.389  0.392  0.392  0.379  0.337  0.387  0.583
[ 12]   2.349  2.138  2.154  2.154  2.131  2.131  2.087  2.267  2.319  2.259  2.432
```

Εκτίμηση εξελικτικής απόκλισης μεταξύ νουκλεοτιδικών ακολουθιών για το γονίδιο *dnaK*
Παρουσιάζεται ο αριθμός υποκαταστάσεων βάσεων ανά θέση. Όλα τα αποτελέσματα βασίζονται στην ανάλυση ανά ζεύγη 12 ακολουθιών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Maximum Composite Likelihood με το πρόγραμμα MEGA4 (Tamura *et al*., 2004, Tamura *et al*., 2007). Όλες οι θέσεις που παρουσίαζαν κενά ή έλειπαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Συνολικός αριθμός θέσεων: 324.

```
[  1]  #1_DnaK
[  2]  #3_DnaK
[  3]  #4_DnaK
[  4]  #6_DnaK
[  5]  #25_DnaK
[  6]  #26_DnaK
[  7]  #28_DnaK
[  8]  #A._brasilense_LMG_DnaK
[  9]  #A._lipoferum_LMG_DnaK
[ 10]  #Rhodospirillum_centenum
[ 11]  #Xanthobacter autotrophicus
[ 12]  #Aquifex_pyrophilus_DnaK

           1      2      3      4      5      6      7      8      9     10     11
[  1]
[  2]   0.071
[  3]   0.053  0.017
[  4]   0.071  0.035  0.017
[  5]   0.053  0.017  0.000  0.017
[  6]   0.053  0.017  0.000  0.017  0.000
[  7]   0.035  0.035  0.017  0.035  0.017  0.017
[  8]   0.035  0.035  0.017  0.035  0.017  0.017  0.000
[  9]   0.017  0.090  0.071  0.090  0.071  0.071  0.053  0.053
[ 10]   0.254  0.232  0.232  0.254  0.232  0.232  0.210  0.210  0.276
[ 11]   0.450  0.450  0.450  0.477  0.450  0.450  0.423  0.423  0.477  0.423
[ 12]   0.882  0.925  0.925  0.969  0.925  0.925  0.882  0.882  0.882  0.765  0.925
```

Εκτίμηση εξελικτικής απόκλισης μεταξύ αμινοξικών ακολουθιών για το γονίδιο *dnaK*
Παρουσιάζεται ο αριθμός υποκαταστάσεων αμινοξέων ανά θέση. Όλα τα αποτελέσματα βασίζονται στην ανάλυση ανά ζεύγη 12 ακολουθιών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου διόρθωσης κατά Poisson με το πρόγραμμα MEGA4 (Zuckerkandl & Pauling, 1965, Tamura *et al*., 2007). Όλες οι θέσεις που παρουσίαζαν κενά ή έλειπαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Συνολικός αριθμός θέσεων: 58.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΥΘΥΓΡΑΜΜΙΣΕΩΝ

Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών 16S rRNA

```
#1_16S                      -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCT---  [  90]
#2_16S                      -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCT---  [  90]
#3_16S                      -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----GGGCT TCGGCCC---  [  90]
#4_16S                      -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCT---  [  90]
#6_16S                      -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----GGGCT TCGGCCC---  [  90]
#25_16S                     -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GCCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCT---  [  90]
#26_16S                     -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----GGGCT TCGGCCC---  [  90]
#27_16S                     -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCT---  [  90]
#28_16S                     -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCT---  [  90]
#31_16S                     -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCT---  [  90]
#32_16S                     -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCT---  [  90]
#A._brasilense_Sp7_16S      ---------- ---------- ---------C GGACGCTGGC GGCCTGC-TA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCT---  [  90]
#A._lipoferum_B2_16S        ---------- ---------- ---------- --ACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCT---  [  90]
#A._oryzae_N7_16S           -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCT---  [  90]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      AAACTTAAGA GTTTGATCCT GGCTCAGATT ?AACGCTGGC GGCATGCTTT ACACATGCAA GTCGAACGGC AGCGGGGGCT TCGGCCCCGC  [  90]
#Methylococcus_capsulatus   ---------- -----ATCAT GGCTCAGATT GAACGCTGGC GGCATGCTTA ACACATGCAA GTCGAACGGT --AACAGGCC TTCGGGC-GC  [  90]
#16_16S                     -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGATT GAACGCTGGC GGCAGGCCTA ACACATGCAA GTCGAGCGGA TGAGTGGAGC TTGCTCC-AT  [  90]
#17_16S                     -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGATT GAACGCTGGC GGCAGGCCTA ACACATGCAA GTCGAGCGGA TGAGTGGAGC TTGCTCC-AT  [  90]
#18_16S                     -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGATT GAACGCTGGC GGCAGGCCTA ACACATGCAA GTCGAGCGGA TGAGTGGAGC TTGCTCC-AT  [  90]
#19_16S                     -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGATT GAACGCTGGC GGCAGGCCTA ACACATGCAA GTCGAGCGGA TGAGTGGAGC TTGCTCC-AT  [  90]
#20_16S                     -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGATT GAACGCTGGC GGCAGGCCTA ACACATGCAA GTCGAGCGGA TGAGTGGAGC TTGCTCC-AT  [  90]
#21_16S                     -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGATT GAACGCTGGC GGCAGGCCTA ACACATGCAA GTCGAGCGGA TGAGTGGAGC TTGCTCC-AT  [  90]
#P._stutzeri_A1501_16S      -------AGA GTTTGATCAT GGCTCAGATT GAACGCTGGC GGCAGGCCTA ACACATGCAA GTCGAGCGGA TGAGTGGAGC TTGCTCC-AT  [  90]
#Azotobacter_vinelandii_16S ------GAGA GTTTGATCCT GGCTCAGATT GAACGCTGGC GGCAGGCCTA ACACATGCAA GTCGAGCGGC AGCGGGACCT TCGGGTT-GC  [  90]
```

```
#1_16S                      ----TAGTGG C-GCACGGGT GAGTAACACG TGGGAACCTG CCTTTCGGTT CGGAATAACG TCTGGAAACG GACGCTAACA CCGGATACGC  [ 180]
#2_16S                      ----TAGTGG C-GCACGGGT GAGTAACACG TGGGAACCTG CCTTTCGGTT CGGAATAACG TCTGGAAACG GACGCTAACA CCGGATAGGC  [ 180]
#3_16S                      ----TAGTGG C-GCACGGGT GAGTAACACG TGGGAACCTG CCTTATGGTT CGGGATAACG TCTGGAAACG GACGCTAACA CCGGATGTGC  [ 180]
#4_16S                      ----TAGTGG C-GCACGGGT GAGTAACACG TGGGAACCTG CCTTATGGTT CGGGATAACG TCTGGAAACG GACGCTAACA CCGGATGTGC  [ 180]
#6_16S                      ----TAGTGG C-GCACGGGT GAGTAACACG TGGGAACCTG CCTTATGGTT CGGGATAACG TCTGGAAACG GACGCTAACA CCGGATGTGC  [ 180]
#25_16S                     ----TAGTGG C-GCACGGGT GAGTAACACG TGGGAACCTG CCTTATGGTT CGGGATAACG TCTGGAAACG GACGCTAACA CCGGATGTGC  [ 180]
#26_16S                     ----TAGTGG C-GCACGGGT GAGTAACACG TGGGAACCTG CCTTATGGTT CGGGATAACG TCTGGAAACG GACGCTAACA CCGGATGTGC  [ 180]
#27_16S                     ----TAGTGG C-GCACGGGT GAGTAACACG TGGGAACCTG CCTTATGGTT CGGGATAACG TCTGGAAACG GACGCTAACA CCGGATGTGC  [ 180]
#28_16S                     ----TAGTGG C-GCACGGGT GAGTAACACG TGGGAACCTG CCTTATGGTT CGGGATAACG TCTGGAAACG GACGCTAACA CCGGATGTGC  [ 180]
#31_16S                     ----TAGTGG C-GCACGGGT GAGTAACACG TGGGAACCTG CCTTATGGTT CGGGATAACG TCTGGAAACG GACGCTAACA CCGGATGTGC  [ 180]
#32_16S                     ----TAGTGG C-GCACGGGT GAGTAACACG TGGGAACCTG CCTTATGGTT CGGGATAACG TCTGGAAACG GACGCTAACA CCGGATGTGC  [ 180]
#A._brasilense_Sp7_16S      ----TAGTGG ?CGCACGGGT GAGTAACACG TGGGAACCTG CCTTTTGGTT CGGGATAACG TCTGGAAACG GACGCTAACA CCGGATACGT  [ 180]
#A._lipoferum_B2_16S        ----TAGTGG C-GCACGGGT GAGTAACACG TGGGAACCTG CCTTTCGGTT CGGAATAACG TTTGGAAACG AACGCTAACA CCGGATACGC  [ 180]
#A._oryzae_N7_16S           ----TAGTGG C-GCACGGGT GAGTAACACG TGGGAACCTG CCTTATGGTT CGGAATAACG TCTGGAAACG GACGCTAACA CCGGATGTGC  [ 180]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      CGGCGAGTGG C-GAACGGGT GAGTAATGCA TCGGAACGTG CCCAGTCATG GGGGATAACT ACGCGAAAGC GTTGCTAATA CCGCATACGC  [ 180]
#Methylococcus_capsulatus   TGACGAGTGG C-GGACGGGT GAGTAATGCG TAGGAATCTG CCTTGTTGTG GGGGATAACT CGGGGAAACC CGAGCTAATA CCGCATACGC  [ 180]
#16_16S                     GATTCAGCGG C-GGACGGGT GAGTAATGCC TAGGAATCTG CCTGGTAGTG GGGGACAACG TTTCGAAAGG AACGCTAATA CCGCATACGT  [ 180]
#17_16S                     GATTCAGCGG C-GGACGGGT GAGTAATGCC TAGGAATCTG CCTGGTAGTG GGGGACAACG TTTCGAAAGG AACGCTAATA CCGCATACGT  [ 180]
#18_16S                     GATTCAGCGG C-GGACGGGT GAGTAATGCC TAGGAATCTG CCTGGTAGTG GGGGACAACG TTTCGAAAGG AACGCTAATA CCGCATACGT  [ 180]
#19_16S                     GATTCAGCGG C-GGACGGGT GAGTAATGCC TAGGAATCTG CCTGGTAGTG GGGGACAACG TTTCGAAAGG AACGCTAATA CCGCATACGT  [ 180]
#20_16S                     GATTCAGCGG C-GGACGGGT GAGTAATGCC TAGGAATCTG CCTGGTAGTG GGGGACAACG TTTCGAAAGG AACGCTAATA CCGCATACGT  [ 180]
#21_16S                     GATTCAGCGG C-GGACGGGT GAGTAATGCC TAGGAATCTG CCTGGTAGTG GGGGACAACG TTTCGAAAGG AACGCTAATA CCGCATACGT  [ 180]
#P._stutzeri_A1501_16S      GATTCAGCGG C-GGACGGGT GAGTAATGCC TAGGAATCTG CCTGGTAGTG GGGGACAACG TTTCGAAAGG AACGCTAATA CCGCATACGT  [ 180]
#Azotobacter_vinelandii_16S CGGCGAGCGG C-GGACGGGT GAGTAATGCC TAGGAATCTG CCTGTTAGTG GGGGATAACG CGGGGAAACT CGCGCTAATA CCGCATACGT  [ 180]
```

```
#1_16S                      CCTTCG---- ---------- --GGGGAAAG TTCACGCCGA GAGAGGG--G CCCACGTCGG -ATTAGGTAG TTGGTGTGGT AACGGCGCAC  [ 270]
#2_16S                      CCTTCG---- ---------- --GGGGAAAG TTCACGCCGA GAGAGGG--G CCCGCGTCGG -ATTAGGTAG TTGGTGTGGT AACGGCGCAC  [ 270]
#3_16S                      CCTTCGGGGG AA-------- --------AG TTTACGCCAT GAGAGGG--G CCCGCGTCCG -ATTAGGTAG TTGGTGGGGT AATGGCCCAC  [ 270]
#4_16S                      CCTTCGGGGG AA-------- --------AG TTTACGCCAT GAGAGGG--G CCCGCGTCCG -ATTAGGTAG TTGGTGGGGT AATGGCCCAC  [ 270]
#6_16S                      CCTTCGGGGG AA-------- --------AG TTTACGCCAT GAGAGGG--G CCCGCGTCCG -ATTAGGTAG TTGGTGGGGT AATGGCCCAC  [ 270]
#25_16S                     CCTTCGGGGG AA-------- --------AG TTTACGCCAT GAGAGGG--G CCCGCGTCCG -ATTAGGTAG TTGGTGGGGT AATGGCCCAC  [ 270]
#26_16S                     CCTTCGGGGG AA-------- --------AG TTTACGCCAT GAGAGGG--G CCCGCGTCCG -ATTAGGTAG TTGGTGGGGT AATGGCCCAC  [ 270]
#27_16S                     CCTTCGGGGG AA-------- --------AG TTTACGCCAT GAGAGGG--G CCCGCGTCCG -ATTAGGTAG TTGGTGGGGT AATGGCCCAC  [ 270]
#28_16S                     CCTTCGGGGG AA-------- --------AG TTTACGCCAT GAGAGGG--G CCCGCGTCCG -ATTAGGTAG TTGGTGGGGT AATGGCCCAC  [ 270]
#31_16S                     CCTTCG---- ---------- --GGGGAAAG TTTACGCCAT GAGAGGG--G CCCGCGTCGG -ATTAGGTAG TTGGTGTGGT AACGGCGCAC  [ 270]
#32_16S                     CCTTCGGGGG AA-------- --------AG TTTACGCCAT GAGAGGG--G CCCGCGTCCG -ATTAGGTAG TTGGTGGGGT AATGGCCCAC  [ 270]
#A._brasilense_Sp7_16S      CCCCCAGAGA GATTT?GGCC GGAGAAAGAG TTACCCCCGA GAGAGGGTTA CCTAGTTCCG GATTAGGTAG TTGGTGGGGT AATGGCCCAC  [ 270]
#A._lipoferum_B2_16S        CCTTTG---- ---------- --GGGGAAAG TTTACGCCGA GAGAGGG--G CCCGCGTCGG -ATTAGGTAG TTGGTGAGGT AATGGCTCAC  [ 270]
#A._oryzae_N7_16S           CCCCCAAGCG ATTGGGT--- --GGGGAAAG TTTACGCCAT GAGAGGG--G CCCGCGTCGG -ATTAGGTAG TTGGTGTGGT AACGGCGCAC  [ 270]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      CCTGAGGGGG AAAGTGGGGG ATCGCAAGAC CTCACGTGAT TGGAGCG--G CCGATGTCAG -ATTAGCTAG TTGGTGAGGT AAAGGCTCAC  [ 270]
#Methylococcus_capsulatus   TCCACGGAGG AAAGCGGGGG ATCTTCGGAC CTCGCGCAAT AAGATGA--G CCTACGTCGG -ATTAGCTGG TTGGTGGGGT AAAGGCCTAC  [ 270]
#16_16S                     CCTACGGGAG AAAGTGGGGG ATCTTCGGAC CTCACGCTAT CAGATGA--G CCTAGGTCGG -ATTAGCTAG TTGGTGAGGT AAAGGCTCAC  [ 270]
#17_16S                     CCTACGGGAG AAAGTGGGGG ATCTTCGGAC CTCACGCTAT CAGATGA--G CCTAGGTCGG -ATTAGCTAG TTGGTGAGGT AAAGGCTCAC  [ 270]
#18_16S                     CCTACGGGAG AAAGTGGGGG ATCTTCGGAC CTCACGCTAT CAGATGA--G CCTAGGTCGG -ATTAGCTAG TTGGTGAGGT AAAGGCTCAC  [ 270]
#19_16S                     CCTACGGGAG AAAGTGGGGG ATCTTCGGAC CTCACGCTAT CAGATGA--G CCTAGGTCGG -ATTAGCTAG TTGGTGAGGT AAAGGCTCAC  [ 270]
#20_16S                     CCTACGGGAG AAAGTGGGGG ATCTTCGGAC CTCGCGCTAT CAGATGA--G CCTAGGTCGG -ATTAGCTAG TTGGTGAGGT AAAGGCTCAC  [ 270]
#21_16S                     CCTACGGGAG AAAGTGGGGG ATCTTCGGAC CTCGCGCTAT CAGATGA--G CCTAGGTCGG -ATTAGCTAG TTGGTGAGGT AAAGGCTCAC  [ 270]
#P._stutzeri_A1501_16S      CCTACGGGAG AAAGTGGGGG ATCTTCGGAC CTCACGCTAT CAGATGA--G CCTAGGTCGG -ATTAGCTAG TTGGTGAGGT AAAGGCTCAC  [ 270]
#Azotobacter_vinelandii_16S CCTACGGGAG AAAGTGGGGG ACCCTCGGGC CTCACGCTAA CAGATGA--G CCTAGGTCGG -ATTAGCTAG TTGGTGGGGT AAAGGCCCAC  [ 270]
```

```
#1_16S                      CAAGCCGACG ATCCGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#2_16S                      CAAGCCGACG ATCCGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#3_16S                      CAAGCCGACG ATCGGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#4_16S                      CAAGCCGACG ATCGGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#6_16S                      CAAGCCGACG ATCGGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#25_16S                     CAAGCCGACG ATCGGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#26_16S                     CAAGCCGACG ATCGGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#27_16S                     CAAGCCGACG ATCGGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#28_16S                     CAAGCCGACG ATCGGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#31_16S                     CAAGCCGACG ACCCGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#32_16S                     CAAGCCGACG ATCGGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#A._brasilense_Sp7_16S      CAAGCC-ACG ATCGGTAGCT GGTCTGAGAG -ATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCC?AGACTC -TACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#A._lipoferum_B2_16S        CAAGCCTTCG ATCCGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#A._oryzae_N7_16S           CAAGCCGACG ATCCGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      CAAGGCGACG ATCTGTAGCG GGTCTGAGAG GATGATCCGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#Methylococcus_capsulatus   CAAGGCGACG ATCCGTAGCT GGTCTGAGAG GACGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#16_16S                     CAAGGCGACG ATCCGTAACT GGTCTGAGAG GATGATCAGT CACACTGGAA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#17_16S                     CAAGGCGACG ATCCGTAACT GGTCTGAGAG GATGATCAGT CACACTGGAA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#18_16S                     CAAGGCGACG ATCCGTAACT GGTCTGAGAG GATGATCAGT CACACTGGAA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#19_16S                     CAAGGCGACG ATCCGTAACT GGTCTGAGAG GATGATCAGT CACACTGGAA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#20_16S                     CAAGGCGACG ATCCGTAACT GGTCTGAGAG GATGATCAGT CACACTGGAA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#21_16S                     CAAGGCGACG ATCCGTAACT GGTCTGAGAG GATGATCAGT CACACTGGAA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#P._stutzeri_A1501_16S      CAAGGCGACG ATCCGTAACT GGTCTGAGAG GATGATCAGT CACACTGGAA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
#Azotobacter_vinelandii_16S CAAGGCGACG ATCCGTAACT GGTCTGAGAG GATGATCAGT CACACTGGAA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG  [ 360]
```

```
#1_16S                      GAATATTGGA CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCG CACGCGACGA  [ 450]
#2_16S                      GAATATTGGA CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCG CACGCGACGA  [ 450]
#3_16S                      GAATATTGGA CAATGGGGGC AACCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCG CACGCGACGA  [ 450]
#4_16S                      GAATATTGGA CAATGGGGGC AACCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGAGCGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCG CACGCGACGA  [ 450]
#6_16S                      GAATATTGGA CAATGGGGGC AACCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCG CACGCGACGA  [ 450]
#25_16S                     GAATATTGGA CAATGGGGGC AACCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCG CACGCGACGA  [ 450]
#26_16S                     GAATATTGGA CAATGGGGGC AACCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCG CACGCGACGA  [ 450]
#27_16S                     GAATATTGGA CAATGGGGGC AACCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCG CACGCGACGA  [ 450]
#28_16S                     GAATATTGGA CAATGGGGGC AACCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCG CACGCGACGA  [ 450]
#31_16S                     GAATATTGGA CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCG CACGCGACGA  [ 450]
#32_16S                     GAATATTGGA CAATGGGGGC AACCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCG CACGCGACGA  [ 450]
#A._brasilense_Sp7_16S      GAATATTGGA CAATGGGGGC AACCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCG CACGCGACGA  [ 450]
#A._lipoferum_B2_16S        GAATATTGGA CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGAGT?A TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCG CACGC?ACGA  [ 450]
#A._oryzae_N7_16S           GAATATTGGA CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAACAATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCG CACGCGACGA  [ 450]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      GAATTTTGGA CAATGGGCGA AAGCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGAGTGA AGAAGGCCTT CGGGTTGTAA AGCTCTTTCG GACGGAAAGA  [ 450]
#Methylococcus_capsulatus   GAATATTGGA CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGTGTGA AGAAGGCCTG CGGGTTGTAA AGCACTTTAA GCAGGAAAGA  [ 450]
#16_16S                     GAATATTGGA CAATGGGCGA AAGCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGTGTGA AGAAGGTCTT CGGATTGTAA AGCACTTTAA GTTGGGAGGA  [ 450]
#17_16S                     GAATATTGGA CAATGGGCGA AAGCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGTGTGA AGAAGGTCTT CGGATTGTAA AGCACTTTAA GTTGGGAGGA  [ 450]
#18_16S                     GAATATTGGA CAATGGGCGA AAGCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGTGTGA AGAAGGTCTT CGGATTGTAA AGCACTTTAA GTTGGGAGGA  [ 450]
#19_16S                     GAATATTGGA CAATGGGCGA AAGCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGTGTGA AGGAGGTCTT CGGATTGTAA AGCACTTTAA GTTGGGAGGA  [ 450]
#20_16S                     GAATATTGGA CAATGGGCGA AAGCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGTGTGA AGAAGGTCTT CGGATTGTAA AGCACTTTAA GTTGGGAGGA  [ 450]
#21_16S                     GAATATTGGA CAATGGGCGA AAGCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGTGTGA AGAAGGTCTT CGGATTGTAA AGCACTTTAA GTTGGGAGGA  [ 450]
#P._stutzeri_A1501_16S      GAATTTTGGA CAATGGGCGA AAGC-TGATC CAGCCATGCC GCGTGTGTGA AGAAGGTCTT CGGATTGTAA ACCACTTTAA GTTGGGAGGA  [ 450]
#Azotobacter_vinelandii_16S GAATATTGGA CAATGGGCGA AAGCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGTGTGA AGAAGGTCTT CGGATTGTAA AGCACTTTAA GTTGGGAGGA  [ 450]
```

```
#1_16S                      ---------- ---------- -----TGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#2_16S                      ---------- ---------- -----TGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#3_16S                      ---------- ---------- -----TGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#4_16S                      ---------- ---------- -----TGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#6_16S                      ---------- ---------- -----TGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#25_16S                     ---------- ---------- -----TGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#26_16S                     ---------- ---------- -----TGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#27_16S                     ---------- ---------- -----TGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#28_16S                     ---------- ---------- -----TGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#31_16S                     ---------- ---------- -----TGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#32_16S                     ---------- ---------- -----TGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#A._brasilense_Sp7_16S      ---------- ---------- -----TGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#A._lipoferum_B2_16S        ---------- ---------- -----TGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#A._oryzae_N7_16S           ---------- ---------- -----TGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      AATCGCGCGG GCTAATATCC CGCGTGGATG ACGGTACCGT AAGAAGAAGC ACCGGCTAAC TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG  [ 540]
#Methylococcus_capsulatus   AGGGTGGGGT GTTAATACCA TCTCACATTG ACGTTACCTG CAGAATAAGC ACCGGCTAAC TCCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGGAGG  [ 540]
#16_16S                     AGGGCAGTAA GTTAATACCT TGCTGTTTTG ACGTTACCAA CAGAATAAGC ACCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#17_16S                     AGGGCAGTAA GTTAATACCT TGCTGTTTTG ACGTTACCAA CAGAATAAGC ACCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#18_16S                     AGGGCAGTAA GTTAATACCT TGCTGTTTTG ACGTTACCAA CAGAATAAGC ACCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#19_16S                     AGGGCAGTAA GTTAATACCT TGCTGTTTTG ACGTTACCAA CAGAATAAGC ACCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#20_16S                     AGGGCAGTAA GTTAATACCT TGCTGTTTTG ACGTTACCAA CAGAATAAGC ACCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#21_16S                     AGGGCAGTAA GTTAATACCT TGCTGTTTTG ACGTTACCAA CAGAATAAGC ACCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#P._stutzeri_A1501_16S      AGGGCAGTAA GTTAATACCT TGCCGGTTTG ACGTTACCAA CAGAATAAGC ACCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#Azotobacter_vinelandii_16S AGGGCGCTCG GTGAATACCC AGGCGTCTTG ACGTTACCGA CAGAATAAGC ACCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
```

```
#1_16S                      GGGCTAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCT GTTTAGTCAG AAGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAT  [ 630]
#2_16S                      GGGCTAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCT GTTTAGTCAG AAGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAT  [ 630]
#3_16S                      GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#4_16S                      GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#6_16S                      GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#25_16S                     GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#26_16S                     GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#27_16S                     GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#28_16S                     GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCT GTTTAGTCAG AAGTGAAAGC CCCGGGCTTA ACCTGGGAAC  [ 630]
#31_16S                     GGGCTAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCT GTTTAGTCAG AAGTGAAAGC CCCGGGCTCA GCCTGGGAAT  [ 630]
#32_16S                     GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#A._brasilense_Sp7_16S      GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#A._lipoferum_B2_16S        GGGCTAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCT GTTTAGTCAG AAGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAT  [ 630]
#A._oryzae_N7_16S           GGGCTAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCT GTTTAGTCAG AAGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAT  [ 630]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      GTGCGAGCGT TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGTGCG CAGGCGGTTT TGTAAGACAG GTGTGAAATC CCCGGGCTTA ACCTGGGAAC  [ 630]
#Methylococcus_capsulatus   GTGCGAGCGT TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGCGGTTT GATAAGTCTG ATGTGAAAGC CCTGGGCTTA ACCTGGGAAC  [ 630]
#16_16S                     GTGCAAGCGT TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTTC GTTAAGTTGG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#17_16S                     GTGCAAGCGT TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTTC GTTAAGTTGG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#18_16S                     GTGCAAGCGT TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTTC GTTAAGTTGG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#19_16S                     GTGCAAGCGT TAATCAGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTTC GTTAAGTTGG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#20_16S                     GTGCAAGCGT TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTTC GTTAAGTTGG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#21_16S                     GTGCAAGCGT TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTTC GTTAAGTTGG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#P._stutzeri_A1501_16S      GTGCAAGCGT TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAG-TGGTTC GTTAAGTTGG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#Azotobacter_vinelandii_16S GTGCAAGCGT TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTTC GGCAAGTTGG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
```

```
#1_16S                      AGCTTTTGAT ACTGGCAGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#2_16S                      AGCTTTTGAT ACTGGCAGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#3_16S                      TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#4_16S                      TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#6_16S                      TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#25_16S                     TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#26_16S                     TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#27_16S                     TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#28_16S                     GGCTTTTGAT ACTGGCAGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#31_16S                     AGCTTTTGAT ACTGGCAGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#32_16S                     TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#A._brasilense_Sp7_16S      TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#A._lipoferum_B2_16S        AGCTTTTGAT ACTGGCAGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#A._oryzae_N7_16S           AGCTTTTGAT ACTGGCAGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACC?  [ 720]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      TGCGCTTGTG ACTGCAAGGC TAGAGTACGG CAGAGGGGGG TGGAATTCCA CGTGTAGCAG TGAAATGCGT AGAGATGTGG AGGAACACCG  [ 720]
#Methylococcus_capsulatus   TGCATTGGAT ACTGTCAGGC TCGAGTGTGG TAGAGGGTAG TGGAATTTCC GGTGTAGCAG TGAAATGCGT AGAGATCGGA AGGAACACCA  [ 720]
#16_16S                     TGCATCCAAA ACTGGCGAGC TAGAGTATGG CAGAGGGTGG TGGAATTTCC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGATATAGGA AGGAACACCA  [ 720]
#17_16S                     TGCATCCAAA ACTGGCGAGC TAGAGTATGG CAGAGGGTGG TGGAATTTCC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGATATAGGA AGGAACACCA  [ 720]
#18_16S                     TGCATCCAAA ACTGGCGAGC TAGAGTATGG CAGAGGGTGG TGGAATTTCC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGATATAGGA AGGAACACCA  [ 720]
#19_16S                     TGCATCCAAA ACTGGCGAGC TAGAGTATGG CAGAGGGTGG TGGAATTTCC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGATATAGGA AGGAACACCA  [ 720]
#20_16S                     TGCATCCAAA ACTGGCGAGC TAGAGTATGG CAGAGGGTGG TGGAATTTCC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGATATAGGA AGGAACACCA  [ 720]
#21_16S                     TGCATCCAAA ACTGGCGAGC TAGAGTATGG CAGAGGGTGG TGGAATTTCC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGATATAGGA AGGAACACCA  [ 720]
#P._stutzeri_A1501_16S      TGCATCCAAA ACTGGCGAGC TAGAGTATGG CAGAGGGTGG TGGAATTTCC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGATATAGGA AGGAACACCA  [ 720]
#Azotobacter_vinelandii_16S CGCATCCAAA ACTACTGGGC TAGAGTACGG TAGAGGGTGG TGGAATTTCC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGATATAGGA AGGAACACCA  [ 720]
```

```
#1_16S                      G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#2_16S                      G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#3_16S                      G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#4_16S                      G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#6_16S                      G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#25_16S                     G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#26_16S                     G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#27_16S                     G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#28_16S                     G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#31_16S                     G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#32_16S                     G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#A._brasilense_Sp7_16S      G-TGGCGAAG GCGGCCATC? GGACGGACAC TGACG?T?AG GCG???AAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#A._lipoferum_B2_16S        G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#A._oryzae_N7_16S           GGTGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      A-TGGCGAAG GCAGCCCCCT GGGCCTGTAC TGACGCTCAT GCACGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#Methylococcus_capsulatus   G-TGGCGAAG GCGGCTACCT GGACCAACAC TGACGCTGAG GTGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#16_16S                     G-TGACGAAG GCGACCACCT GGGCTAATAC TGACACTGAG GTGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#17_16S                     G-TGGCGAAG GCGACCACCT GGGCTAATAC TGACACTGAG GTGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#18_16S                     G-TGGCGAAG GCGACCACCT GGGCTAATAC TGACACTGAG GTGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#19_16S                     G-TGGCGAAG GCGACCACCT GGGCTAATAC TGACACTGAG GTGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#20_16S                     G-TGGCGAAG GCGACCACCT GGGCTAATAC TGACACTGAG GTGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#21_16S                     G-TGGCGAAG GCGACCACCT GGGCTAATAC TGACACTGAG GTGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#P._stutzeri_A1501_16S      G-TGGCGAAG GCGACCACCT GGGCTAATAC TGACACTGAG GTGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#Azotobacter_vinelandii_16S G-TGGCGAAG GCGACCACCT GGACCGATAC TGACACTGAG GTGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
```

```
#1_16S                      CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGTCGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#2_16S                      CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGTCGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#3_16S                      CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#4_16S                      CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#6_16S                      CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#25_16S                     CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#26_16S                     CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#27_16S                     CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#28_16S                     CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#31_16S                     CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGTCGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#32_16S                     CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#A._brasilense_Sp7_16S      C?TAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#A._lipoferum_B2_16S        CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGTCGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#A._oryzae_N7_16S           CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGTCGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCA?TC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      CCTAAACGAT GTCAACTAGT TGTTCGTAGA GGTAACTCTG TGAGTAACGC AGCTAACGCG TGAAGTTGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#Methylococcus_capsulatus   TGTAAACGAT GTCAACTAGC CGTTGGAGGG GTTTAACCTT TTAGTGGCGC AGCTAACGCG ATAAGTTGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#16_16S                     CGTAAACGAT GTCGACTAGC CGTTGG-GAT CCTTGAGATC TTAGTGGCGC AGCTAACGCA TTAAGTCGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#17_16S                     CGTAAACGAT GTCGACTAGC CGTTGG-GAT CCTTGAGATC TTAGTGGCGC AGCTAACGCA TTAAGTCGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#18_16S                     CGTAAACGAT GTCGCCTAGC CGTTGG-GAT CCTTGAGATC TTAGTGGCGC AGCTAACGCA TTAAGTCGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#19_16S                     CGTAAACGAT GTCGACTAGC CGTTGG-GAT CCTTGAGATC TTAGTGGCGC AGCTAACGCA TTAAGTCGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#20_16S                     CGTAAACGAT GTCGACTAGC CGTTGG-GAT CCTTGAGATC TTAGTGGCGC AGCTAACGCA TTAAGTCGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#21_16S                     CGTAAACGAT GTCGACTAGC CGTTGG-GAT CCTTGAGATC TTAGTGGCGC AGCTAACGCA TTAAGTCGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#P._stutzeri_A1501_16S      CGTAAACGAT GTCGACTAGC CGTTGG-GAT CCTTGAGATC TTAGTGGCGC AGCTAACGCA TTAAGTCGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#Azotobacter_vinelandii_16S CGTAAACGAT GTCGACTAGC CGTTGG-GCT CCTTGAGAGC TTAGTGGCGC AGCTAACGCA TTAAGTCGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
```

```
#1_16S                      AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#2_16S                      AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#3_16S                      AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#4_16S                      AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#6_16S                      AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#25_16S                     AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#26_16S                     AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTAGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#27_16S                     AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#28_16S                     AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAG CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#32_16S                     AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#A._brasilense_Sp7_16S      AAG-TTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG -GCTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#A._lipoferum_B2_16S        AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#A._oryzae_N7_16S           AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGA CC?GCACAAG CGGTGGATGA TGTGGATTAA TTCGATGCAA CGCGAAAAAC CTTACCTACC  [ 990]
#Methylococcus_capsulatus   AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGATGCAA CGCGAAGAAC CTTACCTGGC  [ 990]
#31_16S                     AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#16_16S                     AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAGGC  [ 990]
#17_16S                     AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAGGC  [ 990]
#18_16S                     AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAGGC  [ 990]
#19_16S                     AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAGGC  [ 990]
#20_16S                     AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAGGC  [ 990]
#21_16S                     AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAGGC  [ 990]
#P._stutzeri_A1501_16S      AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAGGC  [ 990]
#Azotobacter_vinelandii_16S AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAA-CAA CGCGAAGAAC CTTACCTGGC  [ 990]
```

```
#1_16S                      CTTGACATGT CCACTATGGG CTTGAGAGAT CAGGCTCTTC GGTTCGGCCG GGTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#2_16S                      CTTGACATGT CCACTATGGG CTTGAGAGAT CAGGCTCTTC GGTTCGGCTG GGTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#3_16S                      CTTGACATGT CCATTGCCGG TCCGAGAGAT TGGACC-TTC AGTTCGGCTG GATGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#4_16S                      CTTGACATGT CCATTGCCGG TCCGAGAGAT TGGACC-TTC AGTTCGGCTG GATGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#6_16S                      CTTGACATGT CCATTGCCGG TCCGAGAGAT TGGACC-TTC AGTTCGGCTG GATGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#25_16S                     CTTGACATGT CCATTGCCGG TCCGAGAGAT TGGACC-TTC AGTTCGGCTG GATGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#26_16S                     CTTGACATGT CCATTGCCGG TCCGAGAGAT TGGACC-TTC AGTTCGGCTG GATGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#27_16S                     CTTGACATGT CCATTGCCGG TCCGAGAGAT TGGACC-TTC AGTTCGGCTG GATGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#28_16S                     CTTGACATGT CCACTACCGG CTCGAGAGAT CGG-CT-TTC AGTTCGGCTG GGTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#31_16S                     CTTGACATGT CCACTATGGG TGAGAGAGAT CACACTCTTC GGTTCGGCCG GGTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#32_16S                     CTTGACATGT CCATTGCCGG TCCGAGAGAT TGGACC-TTC AGTTCGGCTG GATGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#A._brasilense_Sp7_16S      CTTGACATGT CCACTA?CGG CTCGAGAGAT CGGGCT-TTC AGTTCGGCTG GGTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#A._lipoferum_B2_16S        CTTGACATGT CCATTATGGG CTCGAGAGAT CGGGTCCTTC AGTTCGGCTG GGTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#A._oryzae_N7_16S           CTTGACATGT CCACTATGGG CTTGAGAGAT CAGGCTCTTC GGTTCGGCCG GGTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      CTTGACATGC CTGGAACC-- TTGGTGAGAG CCGAGGGTGC CTTCGGG--A ACCAGGACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#Methylococcus_capsulatus   CTTGACATGC TTGGAATC-- CTGCAGAGAT GCGGGAGTGC CTTCGGG--A GCCAAGACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#16_16S                     CTTGACATGC AGAGAACT-- TTCCAGAGAT GGATTGGTGC CTTCGGG--A ACTCTGACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#17_16S                     CTTGACATGC AGAGAACT-- TTCCAGAGAT GGATTGGTGC CTTCGGG--A GCTCTGACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#18_16S                     CTTGACATGC AGAGAACT-- TTCCAGAGAT GGATTGGTGC CTTCGGG--A ACTCTGACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#19_16S                     CTTGACATGC AGAGAACT-- TTCCAGAGAT GGATTGGTGC CTTCGGG--A GCTCTGACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#20_16S                     CTTGACATGC AGAGAACT-- TCCCAGAGAT GGATTGGTGC CTTCGGG--A ACTCTGACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#21_16S                     CTTGACATGC AGAGAACT-- TTCCAGAGAT GGATTGGTGC CTTCGGG--A GCTCTGACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#P._stutzeri_A1501_16S      CTTGACATGC TGAGAACT-- TTCCAGAGAT GGATTGGTGC CTTCGGG--A ACTCTGACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
#Azotobacter_vinelandii_16S CTTGACATCC TGCGAACT-- TTCAAGAGAT TGATTGGTGC CTTCGGG--A ACGCAGAGAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT  [1080]
```

```
#1_16S                      CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGTCAGT TGCCATCA-- T-CAGTTGGG CACTCTGGTG GAACCGCCGG  [1170]
#2_16S                      CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGTCAGT TGCCATCA-- TTCAGTTGGG CACTCTGGTG GAACCGCCGG  [1170]
#3_16S                      CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-- TTCAGTTGGG CACTCTGGTG GAACTGCCGG  [1170]
#4_16S                      CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-- TTCAGTTGGG CACTCTGGTG GAACTGCCGG  [1170]
#6_16S                      CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-- TTCAGTTGGG CACTCTGGTG GAACTGCCGG  [1170]
#25_16S                     CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-- TTCAGTTGGG CACTCTGGTG GAACTGCCGG  [1170]
#26_16S                     CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-- TTCAGTTGGG CACTCTGGTG GAACTGCCGG  [1170]
#27_16S                     CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-- TTCAGTTGGG CACTCTGGTG GAACTGCCGG  [1170]
#28_16S                     CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-- TTCAGTTGGG CACTCTGGTG GAACTGCCGG  [1170]
#31_16S                     CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGTCAGT TGCCATCA-- TTCAGTTGGG CACTCTGGTG GAACCGCCGG  [1170]
#32_16S                     CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-- TTCAGTTGGG CACTCTGGTG GAACTGCCGG  [1170]
#A._brasilense_Sp7_16S      CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-- TTCAGTTGGG CACTCTGGTG GAACTGCCGG  [1170]
#A._lipoferum_B2_16S        CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGTCAGT TGCCATCA-- TTCAGTTGGG CACTCTGGTG GAACCGCCGG  [1170]
#A._oryzae_N7_16S           CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGTCAGT TGCCATCA-- TTCAGTTGGG CACTCTGGTG GAACCGCCGG  [1170]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT TGTCATTAAT TGCCATCA-- TTCAGTTGGG CACTTTAATG AGACTGCCGG  [1170]
#Methylococcus_capsulatus   CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGTAACGA GCGCAACCCT TGTCCTTAGT TGCCAGCG-G TTCGGCCGGG AACTCTAAGG AGACTGCCGG  [1170]
#16_16S                     CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGTAACGA GCGCAACCCT TGTCCTTAGT TACCAGCACG TTAAGGTGGG CACTCTAAGG AGACTGCCGG  [1170]
#17_16S                     CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGTAACGA GCGCAACCCT TGTCCTTAGT TACCAGCACG TTAAGGTGGG CACTCTAAGG AGACTGCCGG  [1170]
#18_16S                     CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGTAACGA GCGCAACCCT TGTCCTTAGT TACCAGCACG TTAAGGTGGG CACTCTAAGG AGACTGCCGG  [1170]
#19_16S                     CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGTAACGA GCGCAACCCT TGTCCTTAGT TACCAGCACG TTAAGGTGGG CACTCTAAGG AGACTGCCGG  [1170]
#20_16S                     CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGTAACGA GCGCAACCCT TGTCCTTAGT TACCAGCACG TTAAGGTGGG CACTCTAAGG AGACTGCCGG  [1170]
#21_16S                     CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGTAACGA GCGCAACCCT TGTCCTTAGT TACCAGCACG TTAAGGTGGG CACTCTAAGG AGACTGCCGG  [1170]
#P._stutzeri_A1501_16S      CGTGAGATGT TGGGTTAAGA CCCGTAACGA GCGCAACCCT TGTCCTTAGT TACCAGCACG TTAAGGTGGG CACTCTAAGG AGACTGCCGG  [1170]
#Azotobacter_vinelandii_16S CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGTAACGA GCGCAACCCT TGTCCTTAGT TACCAGCG-A TTCGGTCGGG CACTCTAAGG AGACTGCCGG  [1170]
```

```
#1_16S                      TGACAAGCCG GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAGTGG  [1260]
#2_16S                      TGACAAGCCG GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAGTGG  [1260]
#3_16S                      TGACAAGCCG GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAGTGG  [1260]
#4_16S                      TGACAAGCCG GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAGTGG  [1260]
#6_16S                      TGACAAGCCG GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAGTGG  [1260]
#25_16S                     TGACAAGCCG GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAGTGG  [1260]
#26_16S                     TGACAAGCCG GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAGTGG  [1260]
#27_16S                     TGACAAGCCG GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAGTGG  [1260]
#28_16S                     TGACAAGCCG GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAGTGG  [1260]
#31_16S                     TGACAAGCCG GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAGTGG  [1260]
#32_16S                     TGACAAGCCG GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAGTGG  [1260]
#A._brasilense_Sp7_16S      TGACAAGCCG GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAGTGG  [1260]
#A._lipoferum_B2_16S        TGACAAGCCG GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAGTGG  [1260]
#A._oryzae_N7_16S           TGACAAGCCG GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAGTGG  [1260]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT GGGTAGGGCT TCACACGTCA TACAATGGTC GGTACAGAGG  [1260]
#Methylococcus_capsulatus   TGATAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCATCA TGGCCCTTAT GGCCAGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCC GGTACAGAGG  [1260]
#16_16S                     TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCATCA TGGCCCTTAC GGCCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGTC GGTACAAAGG  [1260]
#17_16S                     TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCATCA TGGCCCTTAC GGCCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGTC GGTACAAAGG  [1260]
#18_16S                     TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCATCA TGGCCCTTAC GGCCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGTC GGTACAAAGG  [1260]
#19_16S                     TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCATCA TGGCCCTTAC GGCCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGTC GGTACAAAGG  [1260]
#20_16S                     TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCATCA TGGCCCTTAC GGCCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGTC GGTACAAAGG  [1260]
#21_16S                     TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCATCA TGGCCCTTAC GGCCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGTC GGTACAAAGG  [1260]
#P._stutzeri_A1501_16S      TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCATCA TGGCC-TTAC GGCCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGTC GGTACAAAGG  [1260]
#Azotobacter_vinelandii_16S TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCATCA TGGCCCTTAC GGCCAGGGCT ACACACGTGC TACAATGGTC GGTACAAAGG  [1260]
```

```
#1_16S                      GACGCGAAGT CGCGAGATGG AGCAAATCCC CAAAAGCCG- TCTCAGTTCG GATCGCACTC TGCAACTCGA GTGCGTGAAG TTGGAATCGC  [1350]
#2_16S                      GACGCGAAGT CGCGAGATGG AGCAAATCCC CAAAAGCCG- TCTCAGTTCG GATCGCACTC TGCAACTCGA GTGCGTGAAG TTGGAATCGC  [1350]
#3_16S                      GACGCGAAGT CGCAAGATGG AGCAAATCCC CAAAAGCCG- TCTCAGTTCG GATTGCACTC TGCAACTCGG GTGCATGAAG TTGGAATCGC  [1350]
#4_16S                      GACGCGAAGT CGCAAGATGG AGCAAATCCC CAAAAGCCG- TCTCAGTTCG GATTGCACTC TGCAACTCGG GTGCATGGAG TTGGAATCGC  [1350]
#6_16S                      GACGCGAAGT CGCAAGATGG AGCAAATCCC CAAAAGCCG- TCTCAGTTCG GATTGCACTC TGCAACTCGG GTGCATGAAG TTGGAATCGC  [1350]
#25_16S                     GACGCGAAGT CGCAAGATGG AGCAAATCCC CAAAAGCCG- TCTCAGTTCG GATTGCACTC TGCAACTCGG GTGCATGAAG TTGGAATCGC  [1350]
#26_16S                     GACGCGAAGT CGCAAGATGG AGCAAATCCC CAAAAGCCG- TCTCAGTTCG GATTGCACTC TGCAACTCGG GTGCATGAAG TTGGAATCGC  [1350]
#27_16S                     GACGCGAAGT CGCAAGATGG AGCAAATCCC CAAAAGCCG- TCTCAGTTCG GATTGCACTC TGCAACTCGG GTGCATGAAG TTGGAATCGC  [1350]
#28_16S                     GATGCGAAGT CGCAAGATGG AGCCAATCCC CAAAAGCCG- TCTCAGTTCG GATTGCACTC TGCAACTCGG GTGCATGAAG TTGGAATCGC  [1350]
#31_16S                     GACGCGAAGT CGCGAGATGG AGCAAATCCC CAAAAGCCG- TCTCAGTTCG GATCGTACTC TGCAACTCGA GTGCGTGAAG TTGGAATCGC  [1350]
#32_16S                     GACGCGAAGT CGCAAGATGG AGCAAATCCC CAAAAGCCG- TCTCAGTTCG GATTGCACTC TGCAACTCGG GTGCATGAAG TTGGAATCGC  [1350]
#A._brasilense_Sp7_16S      GATGCGAAGT CGCAAGATGG AGCCAATCCC CAAAAGCCG- TCTCAGTTCG GATTGCACTC TGCAACTCGG GTGCATGAAG TTGGAATCGC  [1350]
#A._lipoferum_B2_16S        GAAGCGAAGT CGCGAGATGG AGCAAATCCC CAAAAGCCG- TCTCAGTTCG GATCGCACTC TGCAACTCGA GTGCGTGAAG TTGGAATCGC  [1350]
#A._oryzae_N7_16S           GACGCGAAGT CGCGAGATGG AGCAAATCCC CAAAAGCCG- TCTCAGTTCG GATCGCACTC TGCAACTCGA GTGCGTGAAG TTGGAATCGC  [1350]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      GTTGCCAAAC CGCGAGGTGG AGCTAATCCC TTAAAGCCGA TCGTAGTCCG GATCGTAGTC TGCAACTCGA CTGCGTGAAG TCGGAATCGC  [1350]
#Methylococcus_capsulatus   GTAGCCAAGC CGCGAGGTGG AGCCAATCCC AGAAAGCCGG TCTTAGTCCG GATTGCAGTC TGCAACTCGA CTGCATGAAG TCGGAATCGC  [1350]
#16_16S                     GTTGCCAAGC CGCGAGGTGG AGCTAATCCC ATAAAACCGA TCGTAGTCCG GATCGCAGTC TGCAACTCGA CTGCGTGAAG TCGGAATCGC  [1350]
#17_16S                     GTTGCCAAGC CGCGAGGTGG AGCTAATCCC ATAAAACCGA TCGTAGTCCG GATCGCAGTC TGCAACTCGA CTGCGTGAAG TCGGAATCGC  [1350]
#18_16S                     GTTGCCAAGC CGCGAGGTGG AGCTAATCCC ATAAAACCGA TCGTAGTCCG GATCGCAGTC TGCAACTCGA CTGCGTGAAG TCGGAATCGC  [1350]
#19_16S                     GTTGCCAAGC CGCGAGGTGG AGCTAATCCC ATAAAACCGA TCGTAGTCCG GATCGCAGTC TGCAACTCGA CTGCGTGAAG TCGGAATCGC  [1350]
#20_16S                     GTTGCCAAGC CGCGAGGTGG AGCTAATCCC ATAAAACCGA TCGTAGTCCG GATCGCAGTC TGCAACTCGA CTGCGTGAAG TCGGAATCGC  [1350]
#21_16S                     GTTGCCAAGC CGCGAGGTGG AGCTAATCCC ATAAAACCGA TCGTAGTCCG GATCGCAGTC TGCAACTCGA CTGCGTGAAG TCGGAATCGC  [1350]
#P._stutzeri_A1501_16S      GTTGCCAAGC CGCGAGGTGG AGCTAATCCC ATAAAACCGA TCGTAGTCCG GATCGCAGTC TGCAACTCGA CTGCGTGAAG TCGGAATCGC  [1350]
#Azotobacter_vinelandii_16S GTTGCCAAGT CGCGAGGCGG AGCTAATCCC AAAAAACCGA TCGTAGTCCG GATCGCAGTC TGCAACTCGA CTGCGTGAAG TCGGAATCGC  [1350]
```

```
#1_16S                      TAGTAATCGC GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGC TTTACCCGAA  [1440]
#2_16S                      TAGTAATCGC GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGC TTTACCCGAA  [1440]
#3_16S                      TAGTAATCGC GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGC TTTACCCGAA  [1440]
#4_16S                      TAGTAATCGC GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGC TTTACCCGAA  [1440]
#6_16S                      TAGTAATCGC GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGC TTTACCCGAA  [1440]
#25_16S                     TAGTAATCGC GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGC TTTACCCGAA  [1440]
#26_16S                     TAGTAATCGC GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGC TTTACCCGAA  [1440]
#27_16S                     TAGTAATCGC GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGC TTTACCCGAA  [1440]
#28_16S                     TAGTAATCGC GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGC TTTACCCGAA  [1440]
#31_16S                     TAGTAATCGC GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGC TTTACCCGAA  [1440]
#32_16S                     TAGTAATCGC GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGC TTTACCCGAA  [1440]
#A._brasilense_Sp7_16S      TAGTAATCGC GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGC TTTACCCGAA  [1440]
#A._lipoferum_B2_16S        TAGTAATCGC GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGT TTTACCCGAA  [1440]
#A._oryzae_N7_16S           TAGTAATCGC GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGC TTTACCCGAA  [1440]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      TAGTAATCGC AGATCAGCAT GCTGCGGTGA ATACGTTCCC GGGTCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTGGGT TTCA-CCAGA  [1440]
#Methylococcus_capsulatus   TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTGGGT TGCA-CCAGA  [1440]
#16_16S                     TAGTAATCGT GAATCAGGAT GTCACGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCTT GGGAGTGGGT TGCT-CCAGA  [1440]
#17_16S                     TAGTAATCGT GAATCAGAAT GTCACGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTGGGT TGCT-CCAGA  [1440]
#18_16S                     TAGTAATCGT GAATCAGAAT GTCACGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTGGGT TGCT-CCAGA  [1440]
#19_16S                     TAGTAATCGT GAATCAGAAT GTCACGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTGGGT TGCT-CCAGA  [1440]
#20_16S                     TAGTAATCGT GAATCAGAAT GTCACGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTGGGT TGCT-CCAGA  [1440]
#21_16S                     TAGTAATCGT GAATCAGAAT GTCACGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTGGGT TGCT-CCAGA  [1440]
#P._stutzeri_A1501_16S      TAGTAATCGT GAATCAGAAT GTCACGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTGGGT TGCT-CCAGA  [1440]
#Azotobacter_vinelandii_16S TAGTAATCGC GAATCAGAAT GTCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTGGGT TGCTACCAGA  [1440]
```

```
#1_16S                      GACGGTGCGC TAACCCG-CA A-GGGAGGCA GCCGGCCACG GTAAGGTCAG CGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGCC G---------  [1530]
#2_16S                      GACGGTGCGC TAACCCG-CA A-GGGAGGCA GCCGGCCACG GTAAGGTCAG CGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGT---- ----------  [1530]
#3_16S                      GGTGGTGCGC TAACC-GGCA ACGG-AGGCA GCCAACCACG GTCAGGTCAG CGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGCC ----------  [1530]
#4_16S                      GGTGGTGCGC TAACC-GGCA ACGG-AGGCA GCCAACCACG GTCAGGTCAG CGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGG----- ----------  [1530]
#6_16S                      GGTGGTGCGC TAACC-GGCA ACGG-AGGCA GCCAACCACG GTCAGGTCAG CGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGCC ----------  [1530]
#25_16S                     GGTGGTGCGC TAACC-GGCA ACGG-AGGCA GCCAACCACG GTCAGGTCAG CGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGCC ----------  [1530]
#26_16S                     GGTGGTGCGC TAACC-GGCA ACGG-AGGCA GCCAACCACG GTCAGGTCAG CGACTGGGGT GAAGAATC-- ---------- ----------  [1530]
#27_16S                     GGTGGTGCGC TAACC-GGCA ACGG-AGGCA GCCAACCACG GTCAGGTCAG CGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGCC GT--------  [1530]
#28_16S                     GGTGGTGCGC TAACCCGGCA ACGGGAGGCA GCCAACCACG GTCAGGTCAG CGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGCC ----------  [1530]
#31_16S                     GACGGTGCGC TAACCTGGCA ACAGGAGGCA GCCGGCCACG GTAAGGTCAG CGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGCC ----------  [1530]
#32_16S                     GGTGGTGCGC TAACC-GGCA ACGG-AGGCA GCCAACCACG GTCAGGTCAG CGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGCC ----------  [1530]
#A._brasilense_Sp7_16S      GGTGGTGCGC TAACC--GCA ACGG-AGGCA GCCAACCACG GTCAGG---- ---------- ---------- ---------- ----------  [1530]
#A._lipoferum_B2_16S        GGTGGTGCGC TAACCGG-CA A-CGGAGGCA GCCAACCACG GTAAGGTCAG CGA------- ---------- ---------- ----------  [1530]
#A._oryzae_N7_16S           GACGGTGCGT TAACCCG-CA A-GGGAGACA GCCGGCCACG GTAAGGTCAG CGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGCC GTAGGGGAAC  [1530]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      AGTAGGTAGC TTAAC---CT TCGGGAGGGC GCTTACCACG GT?AGATTCA ?GA???GGG- ---------- ---------- ----------  [1530]
#Methylococcus_capsulatus   AGTAGGTAGT CTAAC---CG CGAGGAGGGC GCTTACCACG GTGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAG------- ----------  [1530]
#16_16S                     AGTAGCTAGT CTAAC---CT TCGGGGG-AC GGTTACCACG GAGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGCC GT--------  [1530]
#17_16S                     AGTAGCTAGT CTAAC---CT TCGGGGGGAC GGTTACCACG GAGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGC- ----------  [1530]
#18_16S                     AGTAGCTAGT CTAAC---CT TCGGGGGGAC GGTTACCACG GAGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGT---- ----------  [1530]
#19_16S                     AGTAGCTAGT CTAAC---CT TCGGGGGGAC GGTTACCACG GAGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGCC ----------  [1530]
#20_16S                     AGTAGCTAGT CTAAC---CT TCGGGGGGAC GGTTACCACG GAGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGC- ----------  [1530]
#21_16S                     AGTAGCTAGT CTAAC---CT TCGGGGGGAC GGTTACCACG GAGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGC- ----------  [1530]
#P._stutzeri_A1501_16S      AGTAGCTAGT CTAAC----T TCGGGGGGAC GGTTACCACG GAGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAACC GTA-------  [1530]
#Azotobacter_vinelandii_16S AGTAGCTAGT CTAAC---CC TCGGGAGGAC GGTTACCACG GA-------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1530]
```

```
#1_16S                      ---------- ---------- - [1551]
#2_16S                      ---------- ---------- - [1551]
#3_16S                      ---------- ---------- - [1551]
#4_16S                      ---------- ---------- - [1551]
#6_16S                      ---------- ---------- - [1551]
#25_16S                     ---------- ---------- - [1551]
#26_16S                     ---------- ---------- - [1551]
#27_16S                     ---------- ---------- - [1551]
#28_16S                     ---------- ---------- - [1551]
#31_16S                     ---------- ---------- - [1551]
#32_16S                     ---------- ---------- - [1551]
#A._brasilense_Sp7_16S      ---------- ---------- - [1551]
#A._lipoferum_B2_16S        ---------- ---------- - [1551]
#A._oryzae_N7_16S           CTGCGGCTGG ATCACCTCCT T [1551]
#Azoarcus_sp._BH72_16S      ---------- ---------- - [1551]
#Methylococcus_capsulatus   ---------- ---------- - [1551]
#16_16S                     ---------- ---------- - [1551]
#17_16S                     ---------- ---------- - [1551]
#18_16S                     ---------- ---------- - [1551]
#19_16S                     ---------- ---------- - [1551]
#20_16S                     ---------- ---------- - [1551]
#21_16S                     ---------- ---------- - [1551]
#P._stutzeri_A1501_16S      ---------- ---------- - [1551]
#Azotobacter_vinelandii_16S ---------- ---------- - [1551]
```

Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών 16S rRNA (*Azospirillum*)

```
#1_16S                    -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCTTAG  [  90]
#2_16S                    -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCTTAG  [  90]
#3_16S                    -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----GGGCT TCGGCCCTAG  [  90]
#4_16S                    -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCTTAG  [  90]
#6_16S                    -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----GGGCT TCGGCCCTAG  [  90]
#25_16S                   -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GCCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCTTAG  [  90]
#26_16S                   -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----GGGCT TCGGCCCTAG  [  90]
#27_16S                   -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCTTAG  [  90]
#28_16S                   -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCTTAG  [  90]
#31_16S                   -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCTTAG  [  90]
#32_16S                   -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCTTAG  [  90]
#A._brasilense_Sp7_16S    ---------- ---------- ---------C GGACGCTGGC GGCCTGC-TA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCTTAG  [  90]
#A._lipoferum_B2_16S      ---------- ---------- ---------- --ACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCTTAG  [  90]
#A._oryzae_N7_16S         -------AGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCATGCCTA ACACATGCAA GTCGAACGA- -----AGGCT TCGGCCTTAG  [  90]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    AAACTTAAGA GTTTGATCCT GGCTCAGATT ?AACGCTGGC GGCATGCTTT ACACATGCAA GTCGAACGGC AGCGGGGGCT TCGGCCCCGC  [  90]
#Methylococcus_capsulatus ---------- -----ATCAT GGCTCAGATT GAACGCTGGC GGCATGCTTA ACACATGCAA GTCGAACGGT AACAGGCCTT CGGGC---GC  [  90]

#1_16S                    TGGC------ -GCACGGGTG AGTAACACGT GGGAACCTGC CTTTCGGTTC GGAATAACGT CTGGAAACGG ACGCTAACAC CGGATACGCC  [ 180]
#2_16S                    TGGC------ -GCACGGGTG AGTAACACGT GGGAACCTGC CTTTCGGTTC GGAATAACGT CTGGAAACGG ACGCTAACAC CGGATAGGCC  [ 180]
#3_16S                    TGGC------ -GCACGGGTG AGTAACACGT GGGAACCTGC CTTATGGTTC GGGATAACGT CTGGAAACGG ACGCTAACAC CGGATGTGCC  [ 180]
#4_16S                    TGGC------ -GCACGGGTG AGTAACACGT GGGAACCTGC CTTATGGTTC GGGATAACGT CTGGAAACGG ACGCTAACAC CGGATGTGCC  [ 180]
#6_16S                    TGGC------ -GCACGGGTG AGTAACACGT GGGAACCTGC CTTATGGTTC GGGATAACGT CTGGAAACGG ACGCTAACAC CGGATGTGCC  [ 180]
#25_16S                   TGGC------ -GCACGGGTG AGTAACACGT GGGAACCTGC CTTATGGTTC GGGATAACGT CTGGAAACGG ACGCTAACAC CGGATGTGCC  [ 180]
#26_16S                   TGGC------ -GCACGGGTG AGTAACACGT GGGAACCTGC CTTATGGTTC GGGATAACGT CTGGAAACGG ACGCTAACAC CGGATGTGCC  [ 180]
#27_16S                   TGGC------ -GCACGGGTG AGTAACACGT GGGAACCTGC CTTATGGTTC GGGATAACGT CTGGAAACGG ACGCTAACAC CGGATGTGCC  [ 180]
#28_16S                   TGGC------ -GCACGGGTG AGTAACACGT GGGAACCTGC CTTATGGTTC GGGATAACGT CTGGAAACGG ACGCTAACAC CGGATGTGCC  [ 180]
#31_16S                   TGGC------ -GCACGGGTG AGTAACACGT GGGAACCTGC CTTATGGTTC GGGATAACGT CTGGAAACGG ACGCTAACAC CGGATGTGCC  [ 180]
#32_16S                   TGGC------ -GCACGGGTG AGTAACACGT GGGAACCTGC CTTATGGTTC GGGATAACGT CTGGAAACGG ACGCTAACAC CGGATGTGCC  [ 180]
#A._brasilense_Sp7_16S    TGG?C----- -GCACGGGTG AGTAACACGT GGGAACCTGC CTTTTGGTTC GGGATAACGT CTGGAAACGG ACGCTAACAC CGGATACGTC  [ 180]
#A._lipoferum_B2_16S      TGGC------ -GCACGGGTG AGTAACACGT GGGAACCTGC CTTTCGGTTC GGAATAACGT TTGGAAACGA ACGCTAACAC CGGATACGCC  [ 180]
#A._oryzae_N7_16S         TGGC------ -GCACGGGTG AGTAACACGT GGGAACCTGC CTTATGGTTC GGAATAACGT CTGGAAACGG ACGCTAACAC CGGATGTGCC  [ 180]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    CGGCGAGTGG CGAACGGGTG AGTAATGCAT CGGGAACGTGC CCAGTCATGG GGGATAACTA CGCGAAAGCG TTGCTAATAC CGCATACGCC  [ 180]
#Methylococcus_capsulatus TGACGAGTGG CGGACGGGTG AGTAATGCGT AGGAATCTGC CTTGTTGTGG GGGATAACTC GGGGAAACCC GAGCTAATAC CGCATACGCT  [ 180]

#1_16S                    CTTCG----- ---------- -GGGGAAAGT TCACGCCGAG AGAGGG--GC CCACGTCGG- ATTAGGTAGT TGGTGTGGTA ACGGCGCACC  [ 270]
#2_16S                    CTTCG----- ---------- -GGGGAAAGT TCACGCCGAG AGAGGG--GC CCGCGTCGG- ATTAGGTAGT TGGTGTGGTA ACGGCGCACC  [ 270]
#3_16S                    CTTCGGGGGA A--------- -------AGT TTACGCCATG AGAGGG--GC CCGCGTCCG- ATTAGGTAGT TGGTGGGGTA ATGGCCCACC  [ 270]
#4_16S                    CTTCGGGGGA A--------- -------AGT TTACGCCATG AGAGGG--GC CCGCGTCCG- ATTAGGTAGT TGGTGGGGTA ATGGCCCACC  [ 270]
#6_16S                    CTTCGGGGGA A--------- -------AGT TTACGCCATG AGAGGG--GC CCGCGTCCG- ATTAGGTAGT TGGTGGGGTA ATGGCCCACC  [ 270]
#25_16S                   CTTCGGGGGA A--------- -------AGT TTACGCCATG AGAGGG--GC CCGCGTCCG- ATTAGGTAGT TGGTGGGGTA ATGGCCCACC  [ 270]
#26_16S                   CTTCGGGGGA A--------- -------AGT TTACGCCATG AGAGGG--GC CCGCGTCCG- ATTAGGTAGT TGGTGGGGTA ATGGCCCACC  [ 270]
#27_16S                   CTTCGGGGGA A--------- -------AGT TTACGCCATG AGAGGG--GC CCGCGTCCG- ATTAGGTAGT TGGTGGGGTA ATGGCCCACC  [ 270]
#28_16S                   CTTCGGGGGA A--------- -------AGT TTACGCCATG AGAGGG--GC CCGCGTCCG- ATTAGGTAGT TGGTGGGGTA ATGGCCCACC  [ 270]
#31_16S                   CTTCG----- ---------- -GGGGAAAGT TTACGCCATG AGAGGG--GC CCGCGTCGG- ATTAGGTAGT TGGTGTGGTA ACGGCGCACC  [ 270]
#32_16S                   CTTCGGGGGA A--------- -------AGT TTACGCCATG AGAGGG--GC CCGCGTCCG- ATTAGGTAGT TGGTGGGGTA ATGGCCCACC  [ 270]
#A._brasilense_Sp7_16S    CCCCAGAGAG ATTT?GGCCG GAGAAAGAGT TACCCCCGAG AGAGGGTTAC CTAGTTCCGG ATTAGGTAGT TGGTGGGGTA ATGGCCCACC  [ 270]
#A._lipoferum_B2_16S      CTTTG----- ---------- -GGGGAAAGT TTACGCCGAG AGAGGG--GC CCGCGTCGG- ATTAGGTAGT TGGTGAGGTA ATGGCTCACC  [ 270]
#A._oryzae_N7_16S         CCCCAAGCGA TTGGGT---- -GGGGAAAGT TTACGCCATG AGAGGG--GC CCGCGTCGG- ATTAGGTAGT TGGTGTGGTA ACGGCGCACC  [ 270]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    CTGAGGGGGA AAGTGGGGGA TCGCAAGACC TCACGTGATT GGAGCG--GC CGATGTCAG- ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA AAGGCTCACC  [ 270]
#Methylococcus_capsulatus CCACGGAGGA AAGCGGGGGA TCTTCGGACC TCGCGCAATA AGATGA--GC CTACGTCGG- ATTAGCTGGT TGGTGGGGTA AAGGCCTACC  [ 270]

#1_16S                    AAGCCGACGA TCCGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#2_16S                    AAGCCGACGA TCCGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#3_16S                    AAGCCGACGA TCGGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#4_16S                    AAGCCGACGA TCGGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#6_16S                    AAGCCGACGA TCGGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#25_16S                   AAGCCGACGA TCGGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#26_16S                   AAGCCGACGA TCGGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#27_16S                   AAGCCGACGA TCGGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#28_16S                   AAGCCGACGA TCGGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#31_16S                   AAGCCGACGA CCCGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#32_16S                   AAGCCGACGA TCGGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#A._brasilense_Sp7_16S    AAGCC-ACGA TCGGTAGCTG GTCTGAGAG- ATGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CC?AGACTC- TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#A._lipoferum_B2_16S      AAGCCTTCGA TCCGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#A._oryzae_N7_16S         AAGCCGACGA TCCGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    AAGGCGACGA TCTGTAGCGG GTCTGAGAGG ATGATCCGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]
#Methylococcus_capsulatus AAGGCGACGA TCCGTAGCTG GTCTGAGAGG ACGATCAGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG  [ 360]

#1_16S                    AATATTGGAC AATGGGCGCA AGCCTGATCC AGCAATGCCG CGTGAGTGAT GAAGGCCTTA GGGTTGTAAA GCTCTTTCGC ACGCGA----  [ 450]
#2_16S                    AATATTGGAC AATGGGCGCA AGCCTGATCC AGCAATGCCG CGTGAGTGAT GAAGGCCTTA GGGTTGTAAA GCTCTTTCGC ACGCGA----  [ 450]
#3_16S                    AATATTGGAC AATGGGGGCA ACCCTGATCC AGCAATGCCG CGTGAGTGAT GAAGGCCTTA GGGTTGTAAA GCTCTTTCGC ACGCGA----  [ 450]
#4_16S                    AATATTGGAC AATGGGGGCA ACCCTGATCC AGCAATGCCG CGTGAGCGAT GAAGGCCTTA GGGTTGTAAA GCTCTTTCGC ACGCGA----  [ 450]
#6_16S                    AATATTGGAC AATGGGGGCA ACCCTGATCC AGCAATGCCG CGTGAGTGAT GAAGGCCTTA GGGTTGTAAA GCTCTTTCGC ACGCGA----  [ 450]
#25_16S                   AATATTGGAC AATGGGGGCA ACCCTGATCC AGCAATGCCG CGTGAGTGAT GAAGGCCTTA GGGTTGTAAA GCTCTTTCGC ACGCGA----  [ 450]
#26_16S                   AATATTGGAC AATGGGGGCA ACCCTGATCC AGCAATGCCG CGTGAGTGAT GAAGGCCTTA GGGTTGTAAA GCTCTTTCGC ACGCGA----  [ 450]
#27_16S                   AATATTGGAC AATGGGGGCA ACCCTGATCC AGCAATGCCG CGTGAGTGAT GAAGGCCTTA GGGTTGTAAA GCTCTTTCGC ACGCGA----  [ 450]
#28_16S                   AATATTGGAC AATGGGGGCA ACCCTGATCC AGCAATGCCG CGTGAGTGAT GAAGGCCTTA GGGTTGTAAA GCTCTTTCGC ACGCGA----  [ 450]
#31_16S                   AATATTGGAC AATGGGCGCA AGCCTGATCC AGCAATGCCG CGTGAGTGAT GAAGGCCTTA GGGTTGTAAA GCTCTTTCGC ACGCGA----  [ 450]
#32_16S                   AATATTGGAC AATGGGGGCA ACCCTGATCC AGCAATGCCG CGTGAGTGAT GAAGGCCTTA GGGTTGTAAA GCTCTTTCGC ACGCGA----  [ 450]
#A._brasilense_Sp7_16S    AATATTGGAC AATGGGGGCA ACCCTGATCC AGCAATGCCG CGTGAGTGAT GAAGGCCTTA GGGTTGTAAA GCTCTTTCGC ACGCGA----  [ 450]
#A._lipoferum_B2_16S      AATATTGGAC AATGGGCGCA AGCCTGATCC AGCAATGCCG CGTGAGT?AT GAAGGCCTTA GGGTTGTAAA GCTCTTTCGC ACGC?A----  [ 450]
#A._oryzae_N7_16S         AATATTGGAC AATGGGCGCA AGCCTGATCC AACAATGCCG CGTGAGTGAT GAAGGCCTTA GGGTTGTAAA GCTCTTTCGC ACGCGA----  [ 450]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    AATTTTTGGAC AATGGGCGAA AGCCTGATCC AGCCATGCCG CGTGAGTGAA GAAGGCCTTC GGGTTGTAAA GCTCTTTCGG ACGGAAAGAA  [ 450]
#Methylococcus_capsulatus AATATTGGAC AATGGGCGCA AGCCTGATCC AGCAATGCCG CGTGTGTGAA GAAGGCCTGC GGGTTGTAAA GCACTTT-AA GCAGGAAAGA  [ 450]

#1_16S                    ---------- C--------- ---GATGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#2_16S                    ---------- C--------- ---GATGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#3_16S                    ---------- C--------- ---GATGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#4_16S                    ---------- C--------- ---GATGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#6_16S                    ---------- C--------- ---GATGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#25_16S                   ---------- C--------- ---GATGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#26_16S                   ---------- C--------- ---GATGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#27_16S                   ---------- C--------- ---GATGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#28_16S                   ---------- C--------- ---GATGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#31_16S                   ---------- C--------- ---GATGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#32_16S                   ---------- C--------- ---GATGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#A._brasilense_Sp7_16S    ---------- C--------- ---GATGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#A._lipoferum_B2_16S      ---------- C--------- ---GATGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#A._oryzae_N7_16S         ---------- C--------- ---GATGATG ACGGTAGCGT GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG  [ 540]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    ATCGCGCGG- GCTAATATCC CGCGTGGATG ACGGTACCGT AAGAAGAAGC ACCGGCTAAC TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG  [ 540]
#Methylococcus_capsulatus AGGGTGGGGT GTTAATACCA TCTCACATTG ACGTTACCTG CAGAATAAGC ACCGGCTAAC TCCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGGAGG  [ 540]
```

```
#1_16S                    GGGCTAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCT GTTTAGTCAG AAGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAT  [ 630]
#2_16S                    GGGCTAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCT GTTTAGTCAG AAGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAT  [ 630]
#3_16S                    GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#4_16S                    GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#6_16S                    GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#25_16S                   GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#26_16S                   GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#27_16S                   GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#28_16S                   GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCT GTTTAGTCAG AAGTGAAAGC CCCGGGCTTA ACCTGGGAAC  [ 630]
#31_16S                   GGGCTAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCT GTTTAGTCAG AAGTGAAAGC CCCGGGCTCA GCCTGGGAAT  [ 630]
#32_16S                   GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#A._brasilense_Sp7_16S    GGGCGAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCC GATCAGTCAG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC  [ 630]
#A._lipoferum_B2_16S      GGGCTAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCT GTTTAGTCAG AAGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAT  [ 630]
#A._oryzae_N7_16S         GGGCTAGCGT TGTTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGGGCGCG TAGGCGGCCT GTTTAGTCAG AAGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAT  [ 630]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    GTGCGAGCGT TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGTGCG CAGGCGGTTT TGTAAGACAG GTGTGAAATC CCCGGGCTTA ACCTGGGAAC  [ 630]
#Methylococcus_capsulatus GTGCGAGCGT TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGCGGTTT GATAAGTCTG ATGTGAAAGC CCTGGGCTTA ACCTGGGAAC  [ 630]

#1_16S                    AGCTTTTGAT ACTGGCAGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#2_16S                    AGCTTTTGAT ACTGGCAGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#3_16S                    TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#4_16S                    TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#6_16S                    TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#25_16S                   TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#26_16S                   TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#27_16S                   TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#28_16S                   GGCTTTTGAT ACTGGCAGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#31_16S                   AGCTTTTGAT ACTGGCAGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#32_16S                   TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#A._brasilense_Sp7_16S    TGCATTTGAT ACTGTCGGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#A._lipoferum_B2_16S      AGCTTTTGAT ACTGGCAGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACCG  [ 720]
#A._oryzae_N7_16S         AGCTTTTGAT ACTGGCAGGC TTGAGTTCCG GAGAGGATGG TGGAATTCCC AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTGGG AAGAACACC?  [ 720]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    TGCGCTTGTG ACTGCAAGGC TAGAGTACGG CAGAGGGGGG TGGAATTCCA CGTGTAGCAG TGAAATGCGT AGAGATGTGG AGGAACACCG  [ 720]
#Methylococcus_capsulatus TGCATTGGAT ACTGTCAGGC TCGAGTGTGG TAGAGGGTAG TGGAATTTCC GGTGTAGCAG TGAAATGCGT AGAGATCGGA AGGAACACCA  [ 720]

#1_16S                    G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#2_16S                    G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#3_16S                    G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#4_16S                    G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#6_16S                    G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#25_16S                   G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#26_16S                   G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#27_16S                   G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#28_16S                   G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#31_16S                   G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#32_16S                   G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#A._brasilense_Sp7_16S    G-TGGCGAAG GCGGCCATC? GGACGGACAC TGACG?T?AG GCG???AAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#A._lipoferum_B2_16S      G-TGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#A._oryzae_N7_16S         GGTGGCGAAG GCGGCCATCT GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    A-TGGCGAAG GCAGCCCCCT GGGCCTGTAC TGACGCTCAT GCACGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]
#Methylococcus_capsulatus G-TGGCGAAG GCGGCTACCT GGACCAACAC TGACGCTGAG GTGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC  [ 810]

#1_16S                    CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGTCGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#2_16S                    CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGTCGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#3_16S                    CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#4_16S                    CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#6_16S                    CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#25_16S                   CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#26_16S                   CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#27_16S                   CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#28_16S                   CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#31_16S                   CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#32_16S                   CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#A._brasilense_Sp7_16S    C?TAAACGAT GAATGCTAGA CGCTGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#A._lipoferum_B2_16S      CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGTCGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCATTC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#A._oryzae_N7_16S         CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGTCGG--GG TGCATGCACT TCGGTGTCGC CGCTAACGCA TTAAGCA?TC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    CCTAAACGAT GTCAACTAGT TGTTCGTAGA GGTAACTCTG TGAGTAACGC AGCTAACGCG TGAAGTTGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]
#Methylococcus_capsulatus TGTAAACGAT GTCAACTAGC CGTTGGAGGG GTTTAACCTT TTAGTGGCGC AGCTAACGCG ATAAGTTGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC  [ 900]

#1_16S                    AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#2_16S                    AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#3_16S                    AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#4_16S                    AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#6_16S                    AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#25_16S                   AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#26_16S                   AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTAGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#27_16S                   AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#28_16S                   AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAG CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#31_16S                   AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#32_16S                   AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#A._brasilense_Sp7_16S    AAG-TTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG -GCTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#A._lipoferum_B2_16S      AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#A._oryzae_N7_16S         AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAACC  [ 990]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    AAGGTTAAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGA CC?GCACAAG CGGTGGATGA TGTGGATTAA TTCGATGCAA CGCGAAAAAC CTTACCTACC  [ 990]
#Methylococcus_capsulatus AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGATGCAA CGCGAAGAAC CTTACCTGGC  [ 990]

#1_16S                    CTTGACATGT CCACTATGGG CTTGAGAGAT CAGGCTCTTC GGTTCGGCCG GGTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#2_16S                    CTTGACATGT CCACTATGGG CTTGAGAGAT CAGGCTCTTC GGTTCGGCTG GGTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#3_16S                    CTTGACATGT CCATTGCCGG TCCGAGAGAT TGGACC-TTC AGTTCGGCTG GATGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#4_16S                    CTTGACATGT CCATTGCCGG TCCGAGAGAT TGGACC-TTC AGTTCGGCTG GATGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#6_16S                    CTTGACATGT CCATTGCCGG TCCGAGAGAT TGGACC-TTC AGTTCGGCTG GATGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#25_16S                   CTTGACATGT CCATTGCCGG TCCGAGAGAT TGGACC-TTC AGTTCGGCTG GATGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#26_16S                   CTTGACATGT CCATTGCCGG TCCGAGAGAT TGGACC-TTC AGTTCGGCTG GATGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#27_16S                   CTTGACATGT CCATTGCCGG TCCGAGAGAT TGGACC-TTC AGTTCGGCTG GATGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#28_16S                   CTTGACATGT CCACTACCGG CTCGAGAGAT CGG-CT-TTC AGTTCGGCTG GGTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#31_16S                   CTTGACATGT CCACTATGGG TGAGAGAGAT CACACTCTTC GGTTCGGCCG GGTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#32_16S                   CTTGACATGT CCATTGCCGG TCCGAGAGAT TGGACC-TTC AGTTCGGCTG GATGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#A._brasilense_Sp7_16S    CTTGACATGT CCACTA?CGG CTCGAGAGAT CGGGCT-TTC AGTTCGGCTG GGTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#A._lipoferum_B2_16S      CTTGACATGT CCATTATGGG CTCGAGAGAT CGGGTCCTTC AGTTCGGCTG GGTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#A._oryzae_N7_16S         CTTGACATGT CCATTGCCGG CTTGAGAGAT CAGGCTCTTC GGTTCGGCCG GGTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    CTTGACATGC CTGGAACCTT GGTGAGAGCC GAGGGTGCC- --TTCGGG-A ACCAGGACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
#Methylococcus_capsulatus CTTGACATGC TTGGAATCCT GCAGAGATGC GGGAGTGCC- --TTCGGG-A GCCAAGACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT [1080]
```

```
#1_16S                    CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGTCAGT TGCCATCA-T -CAGTTGGGC ACTCTGGTGG AACCGCCGGT  [1170]
#2_16S                    CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGTCAGT TGCCATCA-T TCAGTTGGGC ACTCTGGTGG AACCGCCGGT  [1170]
#3_16S                    CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-T TCAGTTGGGC ACTCTGGTGG AACTGCCGGT  [1170]
#4_16S                    CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-T TCAGTTGGGC ACTCTGGTGG AACTGCCGGT  [1170]
#6_16S                    CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-T TCAGTTGGGC ACTCTGGTGG AACTGCCGGT  [1170]
#25_16S                   CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-T TCAGTTGGGC ACTCTGGTGG AACTGCCGGT  [1170]
#26_16S                   CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-T TCAGTTGGGC ACTCTGGTGG AACTGCCGGT  [1170]
#27_16S                   CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-T TCAGTTGGGC ACTCTGGTGG AACTGCCGGT  [1170]
#28_16S                   CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-T TCAGTTGGGC ACTCTGGTGG AACTGCCGGT  [1170]
#31_16S                   CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGTCAGT TGCCATCA-T TCAGTTGGGC ACTCTGGTGG AACCGCCGGT  [1170]
#32_16S                   CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-T TCAGTTGGGC ACTCTGGTGG AACTGCCGGT  [1170]
#A._brasilense_Sp7_16S    CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGCCAGT TGCCATCA-T TCAGTTGGGC ACTCTGGTGG AACTGCCGGT  [1170]
#A._lipoferum_B2_16S      CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGTCAGT TGCCATCA-T TCAGTTGGGC ACTCTGGTGG AACCGCCGGT  [1170]
#A._oryzae_N7_16S         CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC TACCGTCAGT TGCCATCA-T TCAGTTGGGC ACTCTGGTGG AACCGCCGGT  [1170]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT TGTCATTAAT TGCCATCA-T TCAGTTGGGC ACTTTAATGA GACTGCCGGT  [1170]
#Methylococcus_capsulatus CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGTAACGA GCGCAACCCT TGTCCTTAGT TGCCAGCGGT TCGGCCGGGA ACTCTAAGGA GACTGCCGGT  [1170]

#1_16S                    GACAAGCCGG AGGAAGGCGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAGTGGG  [1260]
#2_16S                    GACAAGCCGG AGGAAGGCGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAGTGGG  [1260]
#3_16S                    GACAAGCCGG AGGAAGGCGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAGTGGG  [1260]
#4_16S                    GACAAGCCGG AGGAAGGCGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAGTGGG  [1260]
#6_16S                    GACAAGCCGG AGGAAGGCGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAGTGGG  [1260]
#25_16S                   GACAAGCCGG AGGAAGGCGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAGTGGG  [1260]
#26_16S                   GACAAGCCGG AGGAAGGCGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAGTGGG  [1260]
#27_16S                   GACAAGCCGG AGGAAGGCGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAGTGGG  [1260]
#28_16S                   GACAAGCCGG AGGAAGGCGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAGTGGG  [1260]
#31_16S                   GACAAGCCGG AGGAAGGCGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAGTGGG  [1260]
#32_16S                   GACAAGCCGG AGGAAGGCGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAGTGGG  [1260]
#A._brasilense_Sp7_16S    GACAAGCCGG AGGAAGGCGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAGTGGG  [1260]
#A._lipoferum_B2_16S      GACAAGCCGG AGGAAGGCGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAGTGGG  [1260]
#A._oryzae_N7_16S         GACAAGCCGG AGGAAGGCGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAGTGGG  [1260]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    GACAAACCGG AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCCTTATG GGTAGGGCTT CACACGTCAT ACAATGGTCG GTACAGAGGG  [1260]
#Methylococcus_capsulatus GATAAACCGG AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAGTCATCAT GGCCCTTATG GCCAGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCCG GTACAGAGGG  [1260]
```

```
#1_16S                    ACGCGAAGTC GCGAGATGGA GCAAATCCCC AAAAGCCG-T CTCAGTTCGG ATCGCACTCT GCAACTCGAG TGCGTGAAGT TGGAATCGCT  [1350]
#2_16S                    ACGCGAAGTC GCGAGATGGA GCAAATCCCC AAAAGCCG-T CTCAGTTCGG ATCGCACTCT GCAACTCGAG TGCGTGAAGT TGGAATCGCT  [1350]
#3_16S                    ACGCGAAGTC GCAAGATGGA GCAAATCCCC AAAAGCCG-T CTCAGTTCGG ATTGCACTCT GCAACTCGGG TGCATGAAGT TGGAATCGCT  [1350]
#4_16S                    ACGCGAAGTC GCAAGATGGA GCAAATCCCC AAAAGCCG-T CTCAGTTCGG ATTGCACTCT GCAACTCGGG TGCATGGAGT TGGAATCGCT  [1350]
#6_16S                    ACGCGAAGTC GCAAGATGGA GCAAATCCCC AAAAGCCG-T CTCAGTTCGG ATTGCACTCT GCAACTCGGG TGCATGAAGT TGGAATCGCT  [1350]
#25_16S                   ACGCGAAGTC GCAAGATGGA GCAAATCCCC AAAAGCCG-T CTCAGTTCGG ATTGCACTCT GCAACTCGGG TGCATGAAGT TGGAATCGCT  [1350]
#26_16S                   ACGCGAAGTC GCAAGATGGA GCAAATCCCC AAAAGCCG-T CTCAGTTCGG ATTGCACTCT GCAACTCGGG TGCATGAAGT TGGAATCGCT  [1350]
#27_16S                   ACGCGAAGTC GCAAGATGGA GCAAATCCCC AAAAGCCG-T CTCAGTTCGG ATTGCACTCT GCAACTCGGG TGCATGAAGT TGGAATCGCT  [1350]
#28_16S                   ATGCGAAGTC GCAAGATGGA GCCAATCCCC AAAAGCCG-T CTCAGTTCGG ATTGCACTCT GCAACTCGGG TGCATGAAGT TGGAATCGCT  [1350]
#31_16S                   ACGCGAAGTC GCGAGATGGA GCAAATCCCC AAAAGCCG-T CTCAGTTCGG ATCGTACTCT GCAACTCGAG TGCGTGAAGT TGGAATCGCT  [1350]
#32_16S                   ACGCGAAGTC GCAAGATGGA GCAAATCCCC AAAAGCCG-T CTCAGTTCGG ATTGCACTCT GCAACTCGGG TGCATGAAGT TGGAATCGCT  [1350]
#A._brasilense_Sp7_16S    ATGCGAAGTC GCAAGATGGA GCCAATCCCC AAAAGCCG-T CTCAGTTCGG ATTGCACTCT GCAACTCGGG TGCATGAAGT TGGAATCGCT  [1350]
#A._lipoferum_B2_16S      AAGCGAAGTC GCGAGATGGA GCAAATCCCC AAAAGCCG-T CTCAGTTCGG ATCGCACTCT GCAACTCGAG TGCGTGAAGT TGGAATCGCT  [1350]
#A._oryzae_N7_16S         ACGCGAAGTC GCGAGATGGA GCAAATCCCC AAAAGCCG-T CTCAGTTCGG ATCGCACTCT GCAACTCGAG TGCGTGAAGT TGGAATCGCT  [1350]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    TTGCCAAACC GCGAGGTGGA GCTAATCCCT TAAAGCCGAT CGTAGTCCGG ATCGTAGTCT GCAACTCGAC TGCGTGAAGT CGGAATCGCT  [1350]
#Methylococcus_capsulatus TAGCCAAGCC GCGAGGTGGA GCCAATCCCA GAAAGCCGGT CTTAGTCCGG ATTGCAGTCT GCAACTCGAC TGCATGAAGT CGGAATCGCT  [1350]

#1_16S                    AGTAATCGCG GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGCT TTACCCGAAG  [1440]
#2_16S                    AGTAATCGCG GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGCT TTACCCGAAG  [1440]
#3_16S                    AGTAATCGCG GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGCT TTACCCGAAG  [1440]
#4_16S                    AGTAATCGCG GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGCT TTACCCGAAG  [1440]
#6_16S                    AGTAATCGCG GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGCT TTACCCGAAG  [1440]
#25_16S                   AGTAATCGCG GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGCT TTACCCGAAG  [1440]
#26_16S                   AGTAATCGCG GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGCT TTACCCGAAG  [1440]
#27_16S                   AGTAATCGCG GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGCT TTACCCGAAG  [1440]
#28_16S                   AGTAATCGCG GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGCT TTACCCGAAG  [1440]
#31_16S                   AGTAATCGCG GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGCT TTACCCGAAG  [1440]
#32_16S                   AGTAATCGCG GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGCT TTACCCGAAG  [1440]
#A._brasilense_Sp7_16S    AGTAATCGCG GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGCT TTACCCGAAG  [1440]
#A._lipoferum_B2_16S      AGTAATCGCG GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGTT TTACCCGAAG  [1440]
#A._oryzae_N7_16S         AGTAATCGCG GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGCT TTACCCGAAG  [1440]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    AGTAATCGCA GATCAGCATG CTGCGGTGAA TACGTTCCCG GGTCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTGGGTT TCACCAGAAG  [1440]
#Methylococcus_capsulatus AGTAATCGCG GATCAGCATG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTGGGTT GCACCAGAAG  [1440]
```

```
#1_16S                    ACGGTGCGCT AACCCG-CAA -GGGAGGCAG CCGGCCACGG TAAGGTCAGC GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAGCCG ----------  [1530]
#2_16S                    ACGGTGCGCT AACCCG-CAA -GGGAGGCAG CCGGCCACGG TAAGGTCAGC GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGT----- ----------  [1530]
#3_16S                    GTGGTGCGCT AACC-GGCAA CGG-AGGCAG CCAACCACGG TCAGGTCAGC GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAGCC- ----------  [1530]
#4_16S                    GTGGTGCGCT AACC-GGCAA CGG-AGGCAG CCAACCACGG TCAGGTCAGC GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGG------ ----------  [1530]
#6_16S                    GTGGTGCGCT AACC-GGCAA CGG-AGGCAG CCAACCACGG TCAGGTCAGC GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAGCC- ----------  [1530]
#25_16S                   GTGGTGCGCT AACC-GGCAA CGG-AGGCAG CCAACCACGG TCAGGTCAGC GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAGCC- ----------  [1530]
#26_16S                   GTGGTGCGCT AACC-GGCAA CGG-AGGCAG CCAACCACGG TCAGGTCAGC GACTGGGGTG AAGAATC--- ---------- ----------  [1530]
#27_16S                   GTGGTGCGCT AACC-GGCAA CGG-AGGCAG CCAACCACGG TCAGGTCAGC GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAGCCG T---------  [1530]
#28_16S                   GTGGTGCGCT AACCCGGCAA CGGGAGGCAG CCAACCACGG TCAGGTCAGC GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAGCC- ----------  [1530]
#31_16S                   ACGGTGCGCT AACCTGGCAA CAGGAGGCAG CCGGCCACGG TAAGGTCAGC GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAGCC- ----------  [1530]
#32_16S                   GTGGTGCGCT AACC-GGCAA CGG-AGGCAG CCAACCACGG TCAGGTCAGC GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAGCC- ----------  [1530]
#A._brasilense_Sp7_16S    GTGGTGCGCT AACC--GCAA CGG-AGGCAG CCAACCACGG TCAGG----- ---------- ---------- ---------- ----------  [1530]
#A._lipoferum_B2_16S      GTGGTGCGCT AACCGG-CAA -CGGAGGCAG CCAACCACGG TAAGGTCAGC GA-------- ---------- ---------- ----------  [1530]
#A._oryzae_N7_16S         ACGGTGCGTT AACCCG-CAA -GGGAGACAG CCGGCCACGG TAAGGTCAGC GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAGCCG TAGGGGAACC  [1530]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    TAGGTAGCTT AACC----TT CGGGAGGGCG CTTACCACGG T?AGATTCA? GA???GGG-- ---------- ---------- ----------  [1530]
#Methylococcus_capsulatus TAGGTAGTCT AACC----GC GAGGAGGGCG CTTACCACGG TGTGATTCAT GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AG-------- ----------  [1530]

#1_16S                    ---------- ----------  [1550]
#2_16S                    ---------- ----------  [1550]
#3_16S                    ---------- ----------  [1550]
#4_16S                    ---------- ----------  [1550]
#6_16S                    ---------- ----------  [1550]
#25_16S                   ---------- ----------  [1550]
#26_16S                   ---------- ----------  [1550]
#27_16S                   ---------- ----------  [1550]
#28_16S                   ---------- ----------  [1550]
#31_16S                   ---------- ----------  [1550]
#32_16S                   ---------- ----------  [1550]
#A._brasilense_Sp7_16S    ---------- ----------  [1550]
#A._lipoferum_B2_16S      ---------- ----------  [1550]
#A._oryzae_N7_16S         TGCGGCTGGA TCACCTCCTT  [1550]
#Azoarcus_sp._BH72_16S    ---------- ----------  [1550]
#Methylococcus_capsulatus ---------- ----------  [1550]
```

Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών 16S rRNA (*Pseudomonas*)

```
#16_16S                    -AGAGTTTGA TCCTGGCTCA GATTGAACGC TGGCGGCAGG CCTAACACAT GCAAGTCGAG CGGATGAGTG GAGCTTGCTC CATGATTCAG [  90]
#17_16S                    -AGAGTTTGA TCCTGGCTCA GATTGAACGC TGGCGGCAGG CCTAACACAT GCAAGTCGAG CGGATGAGTG GAGCTTGCTC CATGATTCAG [  90]
#18_16S                    -AGAGTTTGA TCCTGGCTCA GATTGAACGC TGGCGGCAGG CCTAACACAT GCAAGTCGAG CGGATGAGTG GAGCTTGCTC CATGATTCAG [  90]
#19_16S                    -AGAGTTTGA TCCTGGCTCA GATTGAACGC TGGCGGCAGG CCTAACACAT GCAAGTCGAG CGGATGAGTG GAGCTTGCTC CATGATTCAG [  90]
#20_16S                    -AGAGTTTGA TCCTGGCTCA GATTGAACGC TGGCGGCAGG CCTAACACAT GCAAGTCGAG CGGATGAGTG GAGCTTGCTC CATGATTCAG [  90]
#21_16S                    -AGAGTTTGA TCCTGGCTCA GATTGAACGC TGGCGGCAGG CCTAACACAT GCAAGTCGAG CGGATGAGTG GAGCTTGCTC CATGATTCAG [  90]
#P._stutzeri_A1501_16S     -AGAGTTTGA TCATGGCTCA GATTGAACGC TGGCGGCAGG CCTAACACAT GCAAGTCGAG CGGATGAGTG GAGCTTGCTC CATGATTCAG [  90]
#Azotobacter_vinelandii_16S GAGAGTTTGA TCCTGGCTCA GATTGAACGC TGGCGGCAGG CCTAACACAT GCAAGTCGAG CGGCAGCGGG ACCTTCGGGT TGCCGGCGAG [  90]

#16_16S                    CGGCGGACGG GTGAGTAATG CCTAGGAATC TGCCTGGTAG TGGGGGACAA CGTTTCGAAA GGAACGCTAA TACCGCATAC GTCCTACGGG [ 180]
#17_16S                    CGGCGGACGG GTGAGTAATG CCTAGGAATC TGCCTGGTAG TGGGGGACAA CGTTTCGAAA GGAACGCTAA TACCGCATAC GTCCTACGGG [ 180]
#18_16S                    CGGCGGACGG GTGAGTAATG CCTAGGAATC TGCCTGGTAG TGGGGGACAA CGTTTCGAAA GGAACGCTAA TACCGCATAC GTCCTACGGG [ 180]
#19_16S                    CGGCGGACGG GTGAGTAATG CCTAGGAATC TGCCTGGTAG TGGGGGACAA CGTTTCGAAA GGAACGCTAA TACCGCATAC GTCCTACGGG [ 180]
#20_16S                    CGGCGGACGG GTGAGTAATG CCTAGGAATC TGCCTGGTAG TGGGGGACAA CGTTTCGAAA GGAACGCTAA TACCGCATAC GTCCTACGGG [ 180]
#21_16S                    CGGCGGACGG GTGAGTAATG CCTAGGAATC TGCCTGGTAG TGGGGGACAA CGTTTCGAAA GGAACGCTAA TACCGCATAC GTCCTACGGG [ 180]
#P._stutzeri_A1501_16S     CGGCGGACGG GTGAGTAATG CCTAGGAATC TGCCTGGTAG TGGGGGACAA CGTTTCGAAA GGAACGCTAA TACCGCATAC GTCCTACGGG [ 180]
#Azotobacter_vinelandii_16S CGGCGGACGG GTGAGTAATG CCTAGGAATC TGCCTGTTAG TGGGGGATAA CGCGGGGAAA CTCGCGCTAA TACCGCATAC GTCCTACGGG [ 180]

#16_16S                    AGAAAGTGGG GGATCTTCGG ACCTCACGCT ATCAGATGAG CCTAGGTCGG ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA AAGGCTCACC AAGGCGACGA [ 270]
#17_16S                    AGAAAGTGGG GGATCTTCGG ACCTCACGCT ATCAGATGAG CCTAGGTCGG ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA AAGGCTCACC AAGGCGACGA [ 270]
#18_16S                    AGAAAGTGGG GGATCTTCGG ACCTCACGCT ATCAGATGAG CCTAGGTCGG ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA AAGGCTCACC AAGGCGACGA [ 270]
#19_16S                    AGAAAGTGGG GGATCTTCGG ACCTCACGCT ATCAGATGAG CCTAGGTCGG ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA AAGGCTCACC AAGGCGACGA [ 270]
#20_16S                    AGAAAGTGGG GGATCTTCGG ACCTCGCGCT ATCAGATGAG CCTAGGTCGG ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA AAGGCTCACC AAGGCGACGA [ 270]
#21_16S                    AGAAAGTGGG GGATCTTCGG ACCTCGCGCT ATCAGATGAG CCTAGGTCGG ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA AAGGCTCACC AAGGCGACGA [ 270]
#P._stutzeri_A1501_16S     AGAAAGTGGG GGATCTTCGG ACCTCACGCT ATCAGATGAG CCTAGGTCGG ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA AAGGCTCACC AAGGCGACGA [ 270]
#Azotobacter_vinelandii_16S AGAAAGTGGG GGACCCTCGG GCCTCACGCT AACAGATGAG CCTAGGTCGG ATTAGCTAGT TGGTGGGGTA AAGGCCCACC AAGGCGACGA [ 270]

#16_16S                    TCCGTAACTG GTCTGAGAGG ATGATCAGTC ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC [ 360]
#17_16S                    TCCGTAACTG GTCTGAGAGG ATGATCAGTC ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC [ 360]
#18_16S                    TCCGTAACTG GTCTGAGAGG ATGATCAGTC ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC [ 360]
#19_16S                    TCCGTAACTG GTCTGAGAGG ATGATCAGTC ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC [ 360]
#20_16S                    TCCGTAACTG GTCTGAGAGG ATGATCAGTC ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC [ 360]
#21_16S                    TCCGTAACTG GTCTGAGAGG ATGATCAGTC ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC [ 360]
#P._stutzeri_A1501_16S     TCCGTAACTG GTCTGAGAGG ATGATCAGTC ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATTTTGGAC [ 360]
#Azotobacter_vinelandii_16S TCCGTAACTG GTCTGAGAGG ATGATCAGTC ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC [ 360]

#16_16S                    AATGGGCGAA AGCCTGATCC AGCCATGCCG CGTGTGTGAA GAAGGTCTTC GGATTGTAAA GCACTTTAAG TTGGGAGGAA GGGCAGTAAG [ 450]
#17_16S                    AATGGGCGAA AGCCTGATCC AGCCATGCCG CGTGTGTGAA GAAGGTCTTC GGATTGTAAA GCACTTTAAG TTGGGAGGAA GGGCAGTAAG [ 450]
#18_16S                    AATGGGCGAA AGCCTGATCC AGCCATGCCG CGTGTGTGAA GAAGGTCTTC GGATTGTAAA GCACTTTAAG TTGGGAGGAA GGGCAGTAAG [ 450]
#19_16S                    AATGGGCGAA AGCCTGATCC AGCCATGCCG CGTGTGTGAA GGAGGTCTTC GGATTGTAAA GCACTTTAAG TTGGGAGGAA GGGCAGTAAG [ 450]
#20_16S                    AATGGGCGAA AGCCTGATCC AGCCATGCCG CGTGTGTGAA GAAGGTCTTC GGATTGTAAA GCACTTTAAG TTGGGAGGAA GGGCAGTAAG [ 450]
#21_16S                    AATGGGCGAA AGCCTGATCC AGCCATGCCG CGTGTGTGAA GAAGGTCTTC GGATTGTAAA GCACTTTAAG TTGGGAGGAA GGGCAGTAAG [ 450]
#P._stutzeri_A1501_16S     AATGGGCGAA AGC-TGATCC AGCCATGCCG CGTGTGTGAA GAAGGTCTTC GGATTGTAAA GCACTTTAAG TTGGGAGGAA GGGCAGTAAG [ 450]
#Azotobacter_vinelandii_16S AATGGGCGAA AGCCTGATCC AGCCATGCCG CGTGTGTGAA GAAGGTCTTC GGATTGTAAA GCACTTTAAG TTGGGAGGAA GGGCGCTCGG [ 450]

#16_16S                    TTAATACCTT GCTGTTTTGA CGTTACCAAC AGAATAAGCA CCGGCTAACT TCGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGAAGGG TGCAAGCGTT [ 540]
#17_16S                    TTAATACCTT GCTGTTTTGA CGTTACCAAC AGAATAAGCA CCGGCTAACT TCGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGAAGGG TGCAAGCGTT [ 540]
#18_16S                    TTAATACCTT GCTGTTTTGA CGTTACCAAC AGAATAAGCA CCGGCTAACT TCGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGAAGGG TGCAAGCGTT [ 540]
#19_16S                    TTAATACCTT GCTGTTTTGA CGTTACCAAC AGAATAAGCA CCGGCTAACT TCGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGAAGGG TGCAAGCGTT [ 540]
#20_16S                    TTAATACCTT GCTGTTTTGA CGTTACCAAC AGAATAAGCA CCGGCTAACT TCGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGAAGGG TGCAAGCGTT [ 540]
#21_16S                    TTAATACCTT GCTGTTTTGA CGTTACCAAC AGAATAAGCA CCGGCTAACT TCGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGAAGGG TGCAAGCGTT [ 540]
#P._stutzeri_A1501_16S     TTAATACCTT GCCGGTTTGA CGTTACCAAC AGAATAAGCA CCGGCTAACT TCGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGAAGGG TGCAAGCGTT [ 540]
#Azotobacter_vinelandii_16S TGAATACCCA GGCGTCTTGA CGTTACCGAC AGAATAAGCA CCGGCTAACT TCGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGAAGGG TGCAAGCGTT [ 540]

#16_16S                    AATCGGAATT ACTGGGCGTA AAGCGCGCGT AGGTGGTTCG TTAAGTTGGA TGTGAAAGCC CCGGGCTCAA CCTGGGAACT GCATCCAAAA [ 630]
#17_16S                    AATCGGAATT ACTGGGCGTA AAGCGCGCGT AGGTGGTTCG TTAAGTTGGA TGTGAAAGCC CCGGGCTCAA CCTGGGAACT GCATCCAAAA [ 630]
#18_16S                    AATCGGAATT ACTGGGCGTA AAGCGCGCGT AGGTGGTTCG TTAAGTTGGA TGTGAAAGCC CCGGGCTCAA CCTGGGAACT GCATCCAAAA [ 630]
#19_16S                    AATCAGAATT ACTGGGCGTA AAGCGCGCGT AGGTGGTTCG TTAAGTTGGA TGTGAAAGCC CCGGGCTCAA CCTGGGAACT GCATCCAAAA [ 630]
#20_16S                    AATCGGAATT ACTGGGCGTA AAGCGCGCGT AGGTGGTTCG TTAAGTTGGA TGTGAAAGCC CCGGGCTCAA CCTGGGAACT GCATCCAAAA [ 630]
#21_16S                    AATCGGAATT ACTGGGCGTA AAGCGCGCGT AGGTGGTTCG TTAAGTTGGA TGTGAAAGCC CCGGGCTCAA CCTGGGAACT GCATCCAAAA [ 630]
#P._stutzeri_A1501_16S     AATCGGAATT ACTGGGCGTA AAGCGCGCGT AG-TGGTTCG TTAAGTTGGA TGTGAAAGCC CCGGGCTCAA CCTGGGAACT GCATCCAAAA [ 630]
#Azotobacter_vinelandii_16S AATCGGAATT ACTGGGCGTA AAGCGCGCGT AGGTGGTTCG GCAAGTTGGA TGTGAAAGCC CCGGGCTCAA CCTGGGAACC GCATCCAAAA [ 630]

#16_16S                    CTGGCGAGCT AGAGTATGGC AGAGGGTGGT GGAATTTCCT GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GATATAGGAA GGAACACCAG TGACGAAGGC [ 720]
#17_16S                    CTGGCGAGCT AGAGTATGGC AGAGGGTGGT GGAATTTCCT GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GATATAGGAA GGAACACCAG TGGCGAAGGC [ 720]
#18_16S                    CTGGCGAGCT AGAGTATGGC AGAGGGTGGT GGAATTTCCT GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GATATAGGAA GGAACACCAG TGGCGAAGGC [ 720]
#19_16S                    CTGGCGAGCT AGAGTATGGC AGAGGGTGGT GGAATTTCCT GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GATATAGGAA GGAACACCAG TGGCGAAGGC [ 720]
#20_16S                    CTGGCGAGCT AGAGTATGGC AGAGGGTGGT GGAATTTCCT GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GATATAGGAA GGAACACCAG TGGCGAAGGC [ 720]
#21_16S                    CTGGCGAGCT AGAGTATGGC AGAGGGTGGT GGAATTTCCT GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GATATAGGAA GGAACACCAG TGGCGAAGGC [ 720]
#P._stutzeri_A1501_16S     CTGGCGAGCT AGAGTATGGC AGAGGGTGGT GGAATTTCCT GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GATATAGGAA GGAACACCAG TGGCGAAGGC [ 720]
#Azotobacter_vinelandii_16S CTACTGGGCT AGAGTACGGT AGAGGGTGGT GGAATTTCCT GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GATATAGGAA GGAACACCAG TGGCGAAGGC [ 720]

#16_16S                    GACCACCTGG GCTAATACTG ACACTGAGGT GCGAAAGCGT GGGGAGCAAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGT [ 810]
#17_16S                    GACCACCTGG GCTAATACTG ACACTGAGGT GCGAAAGCGT GGGGAGCAAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGT [ 810]
#18_16S                    GACCACCTGG GCTAATACTG ACACTGAGGT GCGAAAGCGT GGGGAGCAAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGT [ 810]
#19_16S                    GACCACCTGG GCTAATACTG ACACTGAGGT GCGAAAGCGT GGGGAGCAAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGT [ 810]
#20_16S                    GACCACCTGG GCTAATACTG ACACTGAGGT GCGAAAGCGT GGGGAGCAAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGT [ 810]
#21_16S                    GACCACCTGG GCTAATACTG ACACTGAGGT GCGAAAGCGT GGGGAGCAAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGT [ 810]
#P._stutzeri_A1501_16S     GACCACCTGG GCTAATACTG ACACTGAGGT GCGAAAGCGT GGGGAGCAAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGT [ 810]
#Azotobacter_vinelandii_16S GACCACCTGG ACCGATACTG ACACTGAGGT GCGAAAGCGT GGGGAGCAAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGT [ 810]

#16_16S                    CGACTAGCCG TTGGGATCCT TGAGATCTTA GTGGCGCAGC TAACGCATTA AGTCGACCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG GTTAAAACTC [ 900]
#17_16S                    CGACTAGCCG TTGGGATCCT TGAGATCTTA GTGGCGCAGC TAACGCATTA AGTCGACCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG GTTAAAACTC [ 900]
#18_16S                    CGCCTAGCCG TTGGGATCCT TGAGATCTTA GTGGCGCAGC TAACGCATTA AGTCGACCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG GTTAAAACTC [ 900]
#19_16S                    CGACTAGCCG TTGGGATCCT TGAGATCTTA GTGGCGCAGC TAACGCATTA AGTCGACCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG GTTAAAACTC [ 900]
#20_16S                    CGACTAGCCG TTGGGATCCT TGAGATCTTA GTGGCGCAGC TAACGCATTA AGTCGACCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG GTTAAAACTC [ 900]
#21_16S                    CGACTAGCCG TTGGGATCCT TGAGATCTTA GTGGCGCAGC TAACGCATTA AGTCGACCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG GTTAAAACTC [ 900]
#P._stutzeri_A1501_16S     CGACTAGCCG TTGGGATCCT TGAGATCTTA GTGGCGCAGC TAACGCATTA AGTCGACCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG GTTAAAACTC [ 900]
#Azotobacter_vinelandii_16S CGACTAGCCG TTGGGCTCCT TGAGAGCTTA GTGGCGCAGC TAACGCATTA AGTCGACCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG GTTAAAACTC [ 900]

#16_16S                    AAATGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GAAGCAACGC GAAGAACCTT ACCAGGCCTT GACATGCAGA [ 990]
#17_16S                    AAATGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GAAGCAACGC GAAGAACCTT ACCAGGCCTT GACATGCAGA [ 990]
#18_16S                    AAATGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GAAGCAACGC GAAGAACCTT ACCAGGCCTT GACATGCAGA [ 990]
#19_16S                    AAATGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GAAGCAACGC GAAGAACCTT ACCAGGCCTT GACATGCAGA [ 990]
#20_16S                    AAATGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GAAGCAACGC GAAGAACCTT ACCAGGCCTT GACATGCAGA [ 990]
#21_16S                    AAATGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GAAGCAACGC GAAGAACCTT ACCAGGCCTT GACATGCAGA [ 990]
#P._stutzeri_A1501_16S     AAATGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GAAGCAACGC GAAGAACCTT ACCAGGCCTT GACATGCTGA [ 990]
#Azotobacter_vinelandii_16S AAATGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GAA-CAACGC GAAGAACCTT ACCTGGCCTT GACATCCTGC [ 990]

#16_16S                    GAACTTTCCA GAGATGGATT GGTGCCTTCG GGAACTCTGA CACAGGTGCT GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA [1080]
#17_16S                    GAACTTTCCA GAGATGGATT GGTGCCTTCG GGAGCTCTGA CACAGGTGCT GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA [1080]
#18_16S                    GAACTTTCCA GAGATGGATT GGTGCCTTCG GGAACTCTGA CACAGGTGCT GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA [1080]
#19_16S                    GAACTTTCCA GAGATGGATT GGTGCCTTCG GGAGCTCTGA CACAGGTGCT GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA [1080]
#20_16S                    GAACTTCCCA GAGATGGATT GGTGCCTTCG GGAACTCTGA CACAGGTGCT GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA [1080]
#21_16S                    GAACTTTCCA GAGATGGATT GGTGCCTTCG GGAGCTCTGA CACAGGTGCT GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA [1080]
#P._stutzeri_A1501_16S     GAACTTTCCA GAGATGGATT GGTGCCTTCG GGAACTCTGA CACAGGTGCT GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA [1080]
#Azotobacter_vinelandii_16S GAACTTTCAA GAGATTGATT GGTGCCTTCG GGAACGCAGA GACAGGTGCT GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA [1080]

#16_16S                    AGTCCCGTAA CGAGCGCAAC CCTTGTCCTT AGTTACCAGC ACGTTAAGGT GGGCACTCTA AGGAGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG [1170]
#17_16S                    AGTCCCGTAA CGAGCGCAAC CCTTGTCCTT AGTTACCAGC ACGTTAAGGT GGGCACTCTA AGGAGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG [1170]
#18_16S                    AGTCCCGTAA CGAGCGCAAC CCTTGTCCTT AGTTACCAGC ACGTTAAGGT GGGCACTCTA AGGAGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG [1170]
#19_16S                    AGTCCCGTAA CGAGCGCAAC CCTTGTCCTT AGTTACCAGC ACGTTAAGGT GGGCACTCTA AGGAGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG [1170]
#20_16S                    AGTCCCGTAA CGAGCGCAAC CCTTGTCCTT AGTTACCAGC ACGTTAAGGT GGGCACTCTA AGGAGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG [1170]
#21_16S                    AGTCCCGTAA CGAGCGCAAC CCTTGTCCTT AGTTACCAGC ACGTTAAGGT GGGCACTCTA AGGAGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG [1170]
#P._stutzeri_A1501_16S     AGACCCGTAA CGAGCGCAAC CCTTGTCCTT AGTTACCAGC ACGTTAAGGT GGGCACTCTA AGGAGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG [1170]
#Azotobacter_vinelandii_16S AGTCCCGTAA CGAGCGCAAC CCTTGTCCTT AGTTACCAGC G-ATTCGGTC GGGCACTCTA AGGAGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG [1170]

#16_16S                    GTGGGGATGA CGTCAAGTCA TCATGGCCCT TACGGCCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GTCGGTACAA AGGGTTGCCA AGCCGCGAGG [1260]
#17_16S                    GTGGGGATGA CGTCAAGTCA TCATGGCCCT TACGGCCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GTCGGTACAA AGGGTTGCCA AGCCGCGAGG [1260]
#18_16S                    GTGGGGATGA CGTCAAGTCA TCATGGCCCT TACGGCCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GTCGGTACAA AGGGTTGCCA AGCCGCGAGG [1260]
#19_16S                    GTGGGGATGA CGTCAAGTCA TCATGGCCCT TACGGCCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GTCGGTACAA AGGGTTGCCA AGCCGCGAGG [1260]
#20_16S                    GTGGGGATGA CGTCAAGTCA TCATGGCCCT TACGGCCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GTCGGTACAA AGGGTTGCCA AGCCGCGAGG [1260]
#21_16S                    GTGGGGATGA CGTCAAGTCA TCATGGCCCT TACGGCCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GTCGGTACAA AGGGTTGCCA AGCCGCGAGG [1260]
#P._stutzeri_A1501_16S     GTGGGGATGA CGTCAAGTCA TCATGGCC-T TACGGCCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GTCGGTACAA AGGGTTGCCA AGCCGCGAGG [1260]
#Azotobacter_vinelandii_16S GTGGGGATGA CGTCAAGTCA TCATGGCCCT TACGGCCAGG GCTACACACG TGCTACAATG GTCGGTACAA AGGGTTGCCA AGTCGCGAGG [1260]

#16_16S                    TGGAGCTAAT CCCATAAAAC CGATCGTAGT CCGGATCGCA GTCTGCAACT CGACTGCGTG AAGTCGGAAT CGCTAGTAAT CGTGAATCAG [1350]
#17_16S                    TGGAGCTAAT CCCATAAAAC CGATCGTAGT CCGGATCGCA GTCTGCAACT CGACTGCGTG AAGTCGGAAT CGCTAGTAAT CGTGAATCAG [1350]
#18_16S                    TGGAGCTAAT CCCATAAAAC CGATCGTAGT CCGGATCGCA GTCTGCAACT CGACTGCGTG AAGTCGGAAT CGCTAGTAAT CGTGAATCAG [1350]
#19_16S                    TGGAGCTAAT CCCATAAAAC CGATCGTAGT CCGGATCGCA GTCTGCAACT CGACTGCGTG AAGTCGGAAT CGCTAGTAAT CGTGAATCAG [1350]
#20_16S                    TGGAGCTAAT CCCATAAAAC CGATCGTAGT CCGGATCGCA GTCTGCAACT CGACTGCGTG AAGTCGGAAT CGCTAGTAAT CGTGAATCAG [1350]
#21_16S                    TGGAGCTAAT CCCATAAAAC CGATCGTAGT CCGGATCGCA GTCTGCAACT CGACTGCGTG AAGTCGGAAT CGCTAGTAAT CGTGAATCAG [1350]
#P._stutzeri_A1501_16S     TGGAGCTAAT CCCATAAAAC CGATCGTAGT CCGGATCGCA GTCTGCAACT CGACTGCGTG AAGTCGGAAT CGCTAGTAAT CGTGAATCAG [1350]
#Azotobacter_vinelandii_16S CGGAGCTAAT CCCAAAAAAC CGATCGTAGT CCGGATCGCA GTCTGCAACT CGACTGCGTG AAGTCGGAAT CGCTAGTAAT CGCGAATCAG [1350]
```

```
#16_16S                     GATGTCACGG TGAATACGTT CCCGGGCCTT GTACACACCG CCCGTCACAC CTTGGGAGTG GGTTGCT-CC AGAAGTAGCT AGTCTAACCT  [1440]
#17_16S                     AATGTCACGG TGAATACGTT CCCGGGCCTT GTACACACCG CCCGTCACAC CATGGGAGTG GGTTGCT-CC AGAAGTAGCT AGTCTAACCT  [1440]
#18_16S                     AATGTCACGG TGAATACGTT CCCGGGCCTT GTACACACCG CCCGTCACAC CATGGGAGTG GGTTGCT-CC AGAAGTAGCT AGTCTAACCT  [1440]
#19_16S                     AATGTCACGG TGAATACGTT CCCGGGCCTT GTACACACCG CCCGTCACAC CATGGGAGTG GGTTGCT-CC AGAAGTAGCT AGTCTAACCT  [1440]
#20_16S                     AATGTCACGG TGAATACGTT CCCGGGCCTT GTACACACCG CCCGTCACAC CATGGGAGTG GGTTGCT-CC AGAAGTAGCT AGTCTAACCT  [1440]
#21_16S                     AATGTCACGG TGAATACGTT CCCGGGCCTT GTACACACCG CCCGTCACAC CATGGGAGTG GGTTGCT-CC AGAAGTAGCT AGTCTAACCT  [1440]
#P._stutzeri_A1501_16S      AATGTCACGG TGAATACGTT CCCGGGCCTT GTACACACCG CCCGTCACAC CATGGGAGTG GGTTGCT-CC AGAAGTAGCT AGTCTAAC-T  [1440]
#Azotobacter_vinelandii_16S AATGTCGCGG TGAATACGTT CCCGGGCCTT GTACACACCG CCCGTCACAC CATGGGAGTG GGTTGCTACC AGAAGTAGCT AGTCTAACCC  [1440]

#16_16S                     TCGGGGG-AC GGTTACCACG GAGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGCC GT- [1503]
#17_16S                     TCGGGGGGAC GGTTACCACG GAGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGC- --- [1503]
#18_16S                     TCGGGGGGAC GGTTACCACG GAGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGT---- --- [1503]
#19_16S                     TCGGGGGGAC GGTTACCACG GAGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGCC --- [1503]
#20_16S                     TCGGGGGGAC GGTTACCACG GAGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGC- --- [1503]
#21_16S                     TCGGGGGGAC GGTTACCACG GAGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGC- --- [1503]
#P._stutzeri_A1501_16S      TCGGGGGGAC GGTTACCACG GAGTGATTCA TGACTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAACC GTA [1503]
#Azotobacter_vinelandii_16S TCGGGAGGAC GGTTACCACG GA-------- ---------- ---------- ---------- --- [1503]
```

Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών *nifH*

```
#nifH1                        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH2                        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH3                        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH4                        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH6                        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH25                       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH26                       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH27                       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH28                       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH31                       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH32                       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#A._brasilense_Sp7_nifH       ATGTCTTTGC GCCAGATTGC GTTCTACGGT AAGGGCGGTA TCGGCAAGTC CACCACCTCC CAGAACACCC TGGCCGCGCT GGTCGAGCTG [ 90]
#A._oryzae_N7_nifH            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#Methylococcus_capsulatus     ---------- ---------- ---------- AAGGGGGGTA TTGGTAAGTC CACCACCTCC CAGAACACCC TGGCCGCGCT GGCCGAAATG [ 90]
#A._lipoferum_B2_nifH         ---------- ---------- ----TACGGG AAGGGGGGGA TTGGGAAGTC CACCACCTCT CAGAACACGC TGGCCGCGCT GGTCGAGCTG [ 90]
#nifH16                       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH17                       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH18                       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH19                       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH20                       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#nifH21                       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]
#P._stutzeri_A1501_nifH       ATGGCAATGC GTCAATGCGC TATTTACGGG AAGGGTGGAA TCGGCAAATC CACCACGACC CAGAACCTCG TGGCGGCCCT GGCCGAACTC [ 90]
#Azotobacter_vinelandii_nifH  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [ 90]

#nifH1                        ---------- ---------- ---------- ----GACCCG CCTGATCCTG CACGCAAAGG CCCAGGACAC CGTCCTGCAT [180]
#nifH2                        ---------- ---------- ---------- ----GACCCG CCTGATCCTG CACGCAAAGG CCCAGGACAC CGTCCTGCAT [180]
#nifH3                        ---------- ---------- ---------- ----GACCCG CCTGATCCTG CACGCCAAGG CGCAGGACAC CGTGCTGCAC [180]
#nifH4                        ---------- ---------- ---------- ----GACCCG CCTGATCCTG CACGCCAAGG CGCAGGACAC CGTGCTGCAC [180]
#nifH6                        ---------- ---------- ---------- ----GACCCG CCTGATCCTG CACGCCAAGG CGCAGGACAC CGTGCTGCAC [180]
#nifH25                       ---------- ---------- ---------- ----GACCCG CCTGATCCTG CACGCCAAGG CGCAGGACAC CGTGCTGCAC [180]
#nifH26                       ---------- ---------- ---------- ----GACCCG CCTGATCCTG CACGCCAAGG CGCAGGACAC CGTGCTGCAC [180]
#nifH27                       ---------- ---------- ---------- ----GACCCG CCTGATCCTG CATGCCAAGG CGCAGGACAC CGTGCTGCAC [180]
#nifH28                       ---------- ---------- ---------- ----GACCCG CCTGATCCTG CACGCCAAGG CGCAGGACAC CGTGCTGCAC [180]
#nifH31                       ---------- ---------- ---------- ----GACCCG CCTGATCCTG CACGCAAAGG CCCAGGACAC CGTCCTGCAT [180]
#nifH32                       ---------- ---------- ---------- ----GACCCG CCTGATCCTG CACGCCAAGG CGCAGGACAC CGTGCTGCAC [180]
#A._brasilense_Sp7_nifH       GATCAGAAGA TCCTGATCGT CGGCTGCGAT CCGAAGGCCG ACTCGACCCG CCTGATCCTG CACGCCAAGG CGCAGGACAC CGTGCTGCAC [180]
#A._oryzae_N7_nifH            ---------- ---------- ---TTGCGAT CC?AAGG?GG ACTCGACCCG CCTGATCCTG CACGCAAAGG CCCAGGACAC CGTCCTGCAT [180]
#Methylococcus_capsulatus     GGCCAGAAGA TCCTGATCGT CGGCTGCGAC CCCAAGGCCG ACTCCACCCG TCTGATCCTG CACGCCAAGG CTCAGGACAC CATTCTGTCC [180]
#A._lipoferum_B2_nifH         GATCAGAAGA TCCTGATCGT CGGCTGCGAC CCGAAGGCCG ACTCGACCCG CCTGATCCTG CACGCAAAGG CCCAGGACAC CGTCCTGCAT [180]
#nifH16                       ---------- ---------- ---------- ---------- ----CACTCG CCTGATCCTG CACTCCAAGG CGCAGAACAC CATCATGGAA [180]
#nifH17                       ---------- ---------- ---------- ---------- ----CACTCG CCTGATCCTG CACTCCAAGG CGCAGAACAC CATCATGGAA [180]
#nifH18                       ---------- ---------- ---------- ---------- ----CACTCG CCTGATCCTG CACTCCAAGG CGCAGAACAC CATCATGGAA [180]
#nifH19                       ---------- ---------- ---------- ---------- ----CACTCG CCTGATCCTG CACTCCAAGG CGCAGAACAC CATCATGGAA [180]
#nifH20                       ---------- ---------- ---------- ---------- ----CACTCG CCTGATCCTG CACTCCAAGG CGCAGAACAC CATCATGGAA [180]
#nifH21                       ---------- ---------- ---------- ---------- ----CACTCG CCTGATCCTG CACTCCAAGG CGCAGAACAC CATCATGGAA [180]
#P._stutzeri_A1501_nifH       GGCAAGAAGG TCATGATCGT CGGCTGCGAC CCCAAGGCCG ACTCCACTCG CCTGATCCTG CACTCCAAGG CGCAGAACAC CATCATGGAA [180]
#Azotobacter_vinelandii_nifH  ---------- ---------- ---------- ----------C CGTATTCATT CACTGCAACA AACATCACAC AATCATGAAA [180]

#nifH1                        CTGGCCGCCG AGGCCGGTTC GGTCGAGGAT CTGGAACTCG AGGACGTTCT CAAGATCGGC TACAAGAACA TCAAGTGCGT -CGAGTCCGG [270]
#nifH2                        CTGGCCGCCG AGGCCGGTTC GGTCGAGGAT CTGGAACTCG AGGACGTTCT CAAGATCGGC TACAAGAACA TCAAGTGCGT -CGAGTCCGG [270]
#nifH3                        CTCGCCGCCG AAGCCGGCTC GGTCGAGGAT CTGGAGCTCG AGGACGTTCT CAAGATCGGC TACAAGGGCA TCAAGTGCGT -CGAGTCCGG [270]
#nifH4                        CTCGCCGCCG AAGCCGGCTC GGTCGAGGAT CTGGAGCTCG AGGACGTTCT CAAGATCGGC TACAAGGGCA TCAAGTGCGT -CGAGTCCGG [270]
#nifH6                        CTCGCCGCCG AAGCCGGCTC GGTCGAGGAT CTGGAGCTCG AGGACGTTCT CAAGATCGGC TACAAGGGCA TCAAGTGCGT -CGAGTCCGG [270]
#nifH25                       CTCGCCGCCG AAGCCGGCTC GGTCGAGGAT CTGGAGCTCG AGGACGTTCT CAAGATCGGC TACAAGGGCA TCAAGTGCGT -CGAGTCCGG [270]
#nifH26                       CTCGCCGCCG AAGCCGGCTC GGTCGAGGAT CTGGAGCTCG AGGACGTTCT CAAGATCGGC TACAAGGGCA TCAAGTGCGT -CGAGTCCGG [270]
#nifH27                       CTCGCCGCCG AAGCCGGCTC GGTCGAGGAT CTGGAGCTCG AGGACGTTCT CAAGATCGGC TACAAGGGCA TCAAGTGCGT -CGAGTCCGG [270]
#nifH28                       CTCGCCGCCG AAGCCGGCTC GGTCGAGGAT CTGGAGCTCG AGGACGTTCT CAAGATCGGC TACAAGGGCA TCAAGTGCGT -CGAGTCCGG [270]
#nifH31                       CTGGCCGCCG AGGCCGGTTC GGTCGAGGAT CTGGAACTCG AGGACGTCCT CAAGATCGGC TACAAGAACA TCAAGTGCGT -CGAGTCCGG [270]
#nifH32                       CTCGCCGCCG AAGCCGGCTC GGTCGAGGAT CTGGAGCTCG AGGACGTTCT CAAGATCGGC TACAAGGGCA TCAAGTGCGT -CGAGTCCGG [270]
#A._brasilense_Sp7_nifH       CTCGCCGCCG AAGCCGGCTC GGTCGAGGAT CTGGAGCTCG AGGACGTTCT CAAGATCGGC TACAAGGGCA TCAAGTGCGT -CGAGTCCGG [270]
#A._oryzae_N7_nifH            CTGGCCGCCG AGGCGGGTTC GGTCGAGGAT CTGGAACTCG AGGACGTCCT CAAGATCGGC TACAAGAACA TCAAGTGCGT -CGAGTCCGG [270]
#Methylococcus_capsulatus     CTGGCCGCCG ACGCCGGCAG CGTCGAGGAC CTGGAGCTGG AAGACGTGAT GAAGGTCGGC TTCCGCGACA TCCGTTGCGT -GGAATCCGG [270]
#A._lipoferum_B2_nifH         CTGGCCGCCG AGGCCGGCTC GGTCGAGGAT CTGGAGCTCG AGGACGTTCT CAAGATCGGC TACAAGAACA TCAAGTGCGT -CGAGTCCGG [270]
#nifH16                       ATGGCCGCCG AGGCCGGTAC CGTGGAAGAC CTGGAACTCG AGGACGTGCT CAAGACCGGC TACGGCGACA TCAAGTGCGT -CGAGTCGGG [270]
#nifH17                       ATGGCCGCCG AGGCCGGTAC CGTGGAAGAC CTGGAACTCG AGGACGTGCT CAAGACCGGC TACGGCGACA TCAAGTGCGT -CGAGTCGGG [270]
#nifH18                       ATGGCCGCCG AGGCCGGTAC CGTGGAAGAC CTGGAACTCG GGGACGTGCT CAAGACCGGC TACGGCGACA TCAAGTGCGT -CGAGTCGGG [270]
#nifH19                       ATGGCCGCCG AGGCCGGTAC CGTGGAAGAC CTGGAACTCG AGGACGTGCT CAAGACCGGC TACGGCGACA TCAAGTGCGT -CGAGTCGGG [270]
#nifH20                       ATGGCCGCCG AGGCCGGTAC CGTGGAAGAC CTGGAACTCG AGGACGTGCT CAAGACCGGC TACGGCGACA TCAAGTGCGT -CGAGTCGGG [270]
#nifH21                       ATGGCCGCCG AGGCCGGTAC CGTGGAAGAC CTGGAACTCG AGGACGTGCT CAAGACCGGC TACGGCGACA TCAAGTGCGT -CGAGTCGGG [270]
#P._stutzeri_A1501_nifH       ATGGCCGCCG AGGCCGGTAC CGTGGAAGAC CTGGAACTCG AGGACGTGCT CAAGACCGGC TACGGCGACA TCAAGTGCGT -CGAGTCGGG [270]
#Azotobacter_vinelandii_nifH  AACATTGTGC AAGACAATGG CGTCGAAAAT ATCAACATGG AAGACGTGAT CAAAAAAGGC TTTGTGGACA TCCAGTGCGT GTGAGTCCGG [270]

#nifH1                        CGGTCCGGAG CCGGGCGTCG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TCATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAAA ACGGCGCCTA CGA----CGA [360]
#nifH2                        CGGTCCGGAG CCGGGCGTCG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TCATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAAA ACGGCGCCTA CGA----CGA [360]
#nifH3                        CGGTCCGGAG CCGGGGGTTG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCGTA CGA----CGA [360]
#nifH4                        CGGTCCGGAG CCGGGGGTCG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGA----CGA [360]
#nifH6                        CGGTCCGGAG CCGGGGGTCG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGA----CGA [360]
#nifH25                       CGGTCCGGAG CCGGGGGTTG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCGTA CGA----CGA [360]
#nifH26                       CGGTCCGGAG CCGGGGGTTG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCGTA CGA----CGA [360]
#nifH27                       TGGTCCGGAG CCGGGGGTTG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCGTA CGA----CGA [360]
#nifH28                       CGGTCCGGAG CCGGGGGTCG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGA----CGA [360]
#nifH31                       CGGTCCGGAG CCGGGCGTCG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TCATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGA----CGA [360]
#nifH32                       CGGTCCGGAG CCGGGGGTCG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGA----CGA [360]
#A._brasilense_Sp7_nifH       CGGTCCGGAG CCGGGGGTCG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGA----CGA [360]
#A._oryzae_N7_nifH            CGGTCCGGAG CCGGGCGTCG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TCATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGA----CGA [360]
#Methylococcus_capsulatus     CGGTCCGGAA CCGGGCGTGG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TTATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAAC AAGGCGCTTA TGA----TGG [360]
#A._lipoferum_B2_nifH         CGGTCCGGAG CCGGGGGTCG GCTGCGCCGG CCGCGG--CG TCATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGA----CGA [360]
#nifH16                       CGGTCCGGAG CCGGGCGTGG GCTGCGCCGG TCGCGG--CG TGATCACCGC GATCAACTTC CTCGAAGAGG AAGGCGCCTA CGAGGA-TGA [360]
#nifH17                       CGGTCCGGAG CCGGGCGTGG GCTGCGCCGG TCGCGG--CG TGATCACCGC GATCAACTTC CTCGAAGAGG AAGGCGCCTA CGAGGA-TGA [360]
#nifH18                       CGGTCCGGAG CCGGGCGTGG GCTGCGCCGG TCGCGG--CG TGATCACCGC GATCAACTTC CTCGAAGAGG AAGGCGCCTA CGAGGA-TGA [360]
#nifH19                       CGGTCCGGAG CCGGGCGTGG GCTGCGCCGG TCGCGG--CG TGATCACCGC GATCAACTTC CTCGAAGAGG AAGGCGCCTA CGAGGA-TGA [360]
#nifH20                       CGGTCCGGAG CCGGGCGTGG GCTGCGCCGG TCGCGG--CG TGATCACCGC GATCAACTTC CTCGAAGAGG AAGGCGCCTA CGAGGA-TGA [360]
#nifH21                       CGGTCCGGAG CCGGGCGTGG GCTGCGCCGG TCGCGG--CG TGATCACCGC GATCAACTTC CTCGAAGAGG AAGGCGCCTA CGAGGA-TGA [360]
#P._stutzeri_A1501_nifH       CGGTCCGGAG CCGGGCGTGG GCTGCGCCGG TCGCGG--CG TGATCACCGC GATCAACTTC CTCGAAGAGG AAGGCGCCTA CGAGGA-TGA [360]
#Azotobacter_vinelandii_nifH  TGGCCCCGAG CCGGGCGTTG GTTGCGCCGG CCGCTGGCTG TTATCACCGC CATCAACTTC ATGGAAGAAA AAGGCGCCTA CAAAGACTGA [360]

#nifH1                        CGTGGACTAT GTGTCCTACG ACGTGCTGGG CGACGTGGTC TGCGGCGGCT TCGCCATGCC GATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAAATCTA [450]
#nifH2                        CGTGGACTAT GTGTCCTACG ACGTGCTGGG CGACGTGGTC TGCGGCGGCT TCGCCATGCC GATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAAATCTA [450]
#nifH3                        CGTGGACTAC GTGTCCTACG ACGTGCTGGG CGACGTGGTG TGCGGCGGTT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAAATCTA [450]
#nifH4                        CGTGGACTAC GTCTCCTACG ACGTGCTGGG CGACGTGGTG TGCGGCGGTT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAAATCTA [450]
#nifH6                        CGTGGACCAC GTCTCCTACG ACGTGCTGGG CGACGTGGTG TGCGGCGGTT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAAATCTA [450]
#nifH25                       CGTGGACTAC GTGTCCTACG ACGTGCTGGG CGACGTGGTG TGCGGCGGTT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAAATCTA [450]
#nifH26                       CGTGGACTAC GTGTCCTACG ACGTGCTGGG CGACGTGGTG TGCGGCGGTT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAAATCTA [450]
#nifH27                       CGTGGACTAC GTGTCCTACG ACGTGCTGGG CGACGTGGTG TGCGGCGGTT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAAATCTA [450]
#nifH28                       CGTGGACTAC GTCTCCTACG ACGTGCTGGG CGACGTGGTG TGCGGCGGTT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAAATCTA [450]
#nifH31                       CGTGGACTAT GTGTCCTACG ACGTGCTGGG CGACGTGGTC TGCGGCGGCT TCGCCATGCC GATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAAATCTA [450]
#nifH32                       CGTCGACTAC GTCTCCTACG ACGTGCTGGG CGACGTGGTG TGCGGCGGCT TCGCGATGCC GATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAAATCTA [450]
#A._brasilense_Sp7_nifH       CGTGGACTAC GTCTCCTACG ACGTGCTGGG CGACGTGGTG TGCGGCGGTT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAAATCTA [450]
#A._oryzae_N7_nifH            CGTGGACTAT GTGTCCTACG ACGTGCTGGG CGACGTGGTC TGCGGCGGGC TCGCCATGCC GATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAAATCTA [450]
#Methylococcus_capsulatus     CATCGACTAC GTCTCCTACG ACGTGCTCGG CGACGTGGTT TGCGGTGGTT TTGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCGC AGGAAATCTA [450]
#A._lipoferum_B2_nifH         CGTGGACTAT GTGTCCTACG ACGTGCTGGG CGACGTGGTG TGCGGCGGCT TCGCCATGCC GATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAAATCTA [450]
#nifH16                       CCTGGACTTC GCCTTCTACG ACGTGCTCGG CGACGTGGTC TGTGGCGGCT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAGATCTA [450]
#nifH17                       CCTGGACTTC GTCTTCTACG ACGTGCTCGG CGACGTGGTC TGTGGCGGCT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAGATCTA [450]
#nifH18                       CCTGGACTTC GTCTTCTACG ACGTGCTCGG CGACGTGGTC TGTGGCGGCT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAGATCTA [450]
#nifH19                       CCTGGACTTC GTCTTCTACG ACGTGCTCGG CGACGTGGTC TGTGGCGGCT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAGATCTA [450]
#nifH20                       CCTGGACTTC GTCTTCTACG ACGTGCTCGG CGACGTGGTC TGTGGCGGCT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAGATCTA [450]
#nifH21                       CCTGGACTTC GTCTTCTACG ACGTGCTCGG CGACGTGGTC TGTGGCGGCT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAGATCTA [450]
#P._stutzeri_A1501_nifH       CCTGGACTTC GTCTTCTACG ACGTGCTCGG CGACGTGGTC TGTGGCGGCT TCGCCATGCC CATCCGCGAG AACAAGGCCC AGGAGATCTA [450]
#Azotobacter_vinelandii_nifH  CCTGGACTTC GTGTTCTTCG ACGTACTGGG CGACGTCGTG TGCGGCGGTT TCGCCATGCC GATCCGCGAC AACAAGGCCC AGGA-ATCTA [450]

#nifH1                        CATCGTCATG ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH2                        CATCGTCATG ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH3                        CATCGTCATG ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH4                        CATCGTCATG ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH6                        CATCGTCATG ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH25                       CATCGTCATG ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH26                       CATCGTTATG ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH27                       CATCGTCATG ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH28                       CATCGTCATG ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH31                       CATCGTCATG ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH32                       CATCGTCATG ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#A._brasilense_Sp7_nifH       CATCGTCATG TCCGGTGAGA TGATGGCGCT CTACGCCGCC AAACAACATCG CCAAGGGCAT TCTGAAGTAC GCCCACAGCG GCGGCGTGCG [540]
#A._oryzae_N7_nifH            CATCGTCATG TCCGGCGAAA TGATGGCCAT A--------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#Methylococcus_capsulatus     CATCGTCATG TCCGGCGAAA TGATGGC--- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#A._lipoferum_B2_nifH         CATCGTCATG TCCGGCGAAA TGATGGC--- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH16                       CGTGGTCTGC ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH17                       CGTGGTCTGC ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH18                       CGTGGTCTGC ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH19                       CGTGGTCTGC ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH20                       CGTGGTCTGC ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#nifH21                       CGTGGTCTGC ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
#P._stutzeri_A1501_nifH       CGTGGTCTGC TCCGGCGAGA TGATGGCGAT GTATGCCGCC AACAACATCT GCAAGGGCAT CGTGAAGTAC GCCAACTCCG GCAGCGTGCG [540]
#Azotobacter_vinelandii_nifH  CAT------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- [540]
```

```
#nifH1                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH2                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH3                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH4                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH6                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH25                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH26                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH27                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH28                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH31                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH32                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#A._brasilense_Sp7_nifH     CCTCGGCGGC CTGATCTGCA ACGAGCGCCA GACCGACAAG GAAATCGACC TCGCCTCCGC CCTGGCCGCC CGCCTCGGCA CCCAGCTCAT  [630]
#A._oryzae_N7_nifH          ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#Methylococcus_capsulatus   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#A._lipoferum_B2_nifH       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH16                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH17                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH18                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH19                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH20                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH21                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#P._stutzeri_A1501_nifH     GCTCGGCGGG CTGATCTGCA ACAGCCGCAA CACCGACCGC GAGGACGAGC TGATCATGGC CCTGGCCGAC AAGCTGGGCT CGCAGATGAT  [630]
#Azotobacter_vinelandii_nifH ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]

#nifH1                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH2                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH3                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH4                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH6                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH25                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH26                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH27                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH28                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH31                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH32                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#A._brasilense_Sp7_nifH     CCACTTCGTG CCGCGCGACA ACATCGTGCA GCACGCCGAG CTGCGCCGCA TGACGGTGAT CGAGTACGCG CCGGACAGCC AGCAGGCCCA  [720]
#A._oryzae_N7_nifH          ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#Methylococcus_capsulatus   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#A._lipoferum_B2_nifH       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH16                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH17                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH18                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH19                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH20                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH21                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#P._stutzeri_A1501_nifH     CCACTTCGTC CCGCGCGACA ACGTCGTGCA GCGCGCCGAA ATCCGCCGCA TGACCGTCAT CGAGTACGAC CCCGCCGCCA AGCAGGCCGA  [720]
#Azotobacter_vinelandii_nifH ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
```

```
#nifH1                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH2                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH3                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH4                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH6                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH25                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH26                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH27                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH28                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH31                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH32                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#A._brasilense_Sp7_nifH     GGAATACCGC CAGCTCGCCA ACAAGGTCCA CGCGAACAAG GGCAAGGGCA CCATCCCGAC CCCGATCACG ATGGAAGAGC TGGAAGAGAT  [810]
#A._oryzae_N7_nifH          ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#Methylococcus_capsulatus   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#A._lipoferum_B2_nifH       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH16                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH17                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH18                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH19                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH20                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH21                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#P._stutzeri_A1501_nifH     CGAATACCGG ACCCTGGCGA AGAAGATCGT CGAGAACAAG AAACTGGTCA TCCCCACCCC GATCAGCATG GACGAGCTGG AAGCCTTGCT  [810]
#Azotobacter_vinelandii_nifH ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]

#nifH1                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH2                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH3                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH4                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH6                      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH25                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH26                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH27                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH28                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH31                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH32                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#A._brasilense_Sp7_nifH     GCTGATGGAC TTCGGCATCA TGAAGTCGGA GGAGCAGCAG CTCGCCGAGC TCCAGGCCAA GGAAGCCGCC AAGGCCTGA  [889]
#A._oryzae_N7_nifH          ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#Methylococcus_capsulatus   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#A._lipoferum_B2_nifH       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH16                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH17                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH18                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH19                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH20                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#nifH21                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
#P._stutzeri_A1501_nifH     TATGGAGTTC GGGATCATGG ACGAGGAAGA CATGACCATC GTCGGCAAGA CCGCCGCCGA GGAAGTCGTT GCCTGA---  [889]
#Azotobacter_vinelandii_nifH ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------  [889]
```

Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών *nifH* (*Azospirillum*)

```
#nifH1                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#nifH2                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#nifH3                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#nifH4                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#nifH6                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#nifH25                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#nifH26                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#nifH27                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#nifH28                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#nifH31                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#nifH32                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#A._brasilense_Sp7_nifH   ---ATGTCTT TGCGCCAGAT TGCGTTCTAC GGTAAGGGCG GTATCGGCAA GTCCACCACC TCCCAGAACA CCCTGGCCGC GCTGGTCGAG  [ 90]
#A._oryzae_N7_nifH        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#Methylococcus_capsulatus ---------- ---------- ---------- ---AAGGGGG GTATTGGTAA GTCCACCACC TCCCAGAACA CCCTGGCCGC GCTGGCCGAA  [ 90]
#A._lipoferum_B2_nifH     ---------- ---------- --------TAC GGGAAGGGGG GGATTGGGAA GTCCACCACC TCTCAGAACA CGCTGGCCGC GCTGGTCGAG  [ 90]
#Azoarcus_sp._BH72_nifH   ATGGCAAAGC TGCGTCAATG CGCCATTTAT GGCAAGGGCG GTATCGGCAA GTCGACCACC ACCCAGAACC TGGTTGCGGC CCTGGCCGAA  [ 90]

#nifH1                    ---------- ---------- ---------- ---------- -------GAC CCGCCTGATC CTGCACGCAA AGGCCCAGGA CACCGTCCTG  [180]
#nifH2                    ---------- ---------- ---------- ---------- -------GAC CCGCCTGATC CTGCACGCAA AGGCCCAGGA CACCGTCCTG  [180]
#nifH3                    ---------- ---------- ---------- ---------- -------GAC CCGCCTGATC CTGCACGCCA AGGCGCAGGA CACCGTGCTG  [180]
#nifH4                    ---------- ---------- ---------- ---------- -------GAC CCGCCTGATC CTGCACGCCA AGGCGCAGGA CACCGTGCTG  [180]
#nifH6                    ---------- ---------- ---------- ---------- -------GAC CCGCCTGATC CTGCACGCCA AGGCGCAGGA CACCGTGCTG  [180]
#nifH25                   ---------- ---------- ---------- ---------- -------GAC CCGCCTGATC CTGCACGCCA AGGCGCAGGA CACCGTGCTG  [180]
#nifH26                   ---------- ---------- ---------- ---------- -------GAC CCGCCTGATC CTGCACGCCA AGGCGCAGGA CACCGTGCTG  [180]
#nifH27                   ---------- ---------- ---------- ---------- -------GAC CCGCCTGATC CTGCATGCCA AGGCGCAGGA CACCGTGCTG  [180]
#nifH28                   ---------- ---------- ---------- ---------- -------GAC CCGCCTGATC CTGCACGCCA AGGCGCAGGA CACCGTGCTG  [180]
#nifH31                   ---------- ---------- ---------- ---------- -------GAC CCGCCTGATC CTGCACGCAA AGGCCCAGGA CACCGTCCTG  [180]
#nifH32                   ---------- ---------- ---------- ---------- -------GAC CCGCCTGATC CTGCACGCCA AGGCGCAGGA CACCGTGCTG  [180]
#A._brasilense_Sp7_nifH   CTGGATCAGA AGATCCTGAT CGTCGGCTGC GATCCGAAGG CCGACTCGAC CCGCCTGATC CTGCACGCCA AGGCGCAGGA CACCGTGCTG  [180]
#A._oryzae_N7_nifH        ---------- ---------- ------TTGC GATCC?AAGG ?GGACTCGAC CCGCCTGATC CTGCACGCAA AGGCCCAGGA CACCGTCCTG  [180]
#Methylococcus_capsulatus ATGGGCCAGA AGATCCTGAT CGTCGGCTGC GACCCCAAGG CCGACTCCAC CCGTCTGATC CTGCACGCCA AGGCTCAGGA CACCATTCTG  [180]
#A._lipoferum_B2_nifH     CTGGATCAGA AGATCCTGAT CGTCGGCTGC GACCCGAAGG CCGACTCGAC CCGCCTGATC CTGCACGCAA AGGCCCAGGA CACCGTCCTG  [180]
#Azoarcus_sp._BH72_nifH   GCCGGCAAGA AGGTCATGAT CGTCGGTTGC GACCCGAAGG CTGACTCCAC CCGTCTGATC CTCCACAGCA AGGCCCAGAC CACCGTGATG  [180]
```

```
#nifH1                    CATCTGGCCG CCGAGGCCGG TTCGGTCGAG GATCTGGAAC TCGAGGACGT TCTCAAGATC GGCTACAAGA ACATCAAGTG CGTCGAGTCC  [270]
#nifH2                    CATCTGGCCG CCGAGGCCGG TTCGGTCGAG GATCTGGAAC TCGAGGACGT TCTCAAGATC GGCTACAAGA ACATCAAGTG CGTCGAGTCC  [270]
#nifH3                    CACCTCGCCG CCGAAGCCGG CTCGGTCGAG GATCTGGAGC TCGAGGACGT TCTCAAGATC GGCTACAAGG GCATCAAGTG CGTCGAGTCC  [270]
#nifH4                    CACCTCGCCG CCGAAGCCGG CTCGGTCGAG GATCTGGAGC TCGAGGACGT TCTCAAGATC GGCTACAAGG GCATCAAGTG CGTCGAGTCC  [270]
#nifH6                    CACCTCGCCG CCGAAGCCGG CTCGGTCGAG GATCTGGAGC TCGAGGACGT TCTCAAGATC GGCTACAAGG GCATCAAGTG CGTCGAGTCC  [270]
#nifH25                   CACCTCGCCG CCGAAGCCGG CTCGGTCGAG GATCTGGAGC TCGAGGACGT TCTCAAGATC GGCTACAAGG GCATCAAGTG CGTCGAGTCC  [270]
#nifH26                   CACCTCGCCG CCGAAGCCGG CTCGGTCGAG GATCTGGAGC TCGAGGACGT TCTCAAGATC GGCTACAAGG GCATCAAGTG CGTCGAGTCC  [270]
#nifH27                   CACCTCGCCG CCGAAGCCGG CTCGGTCGAG GATCTGGAGC TCGAGGACGT TCTCAAGATC GGCTACAAGG GCATCAAGTG CGTCGAGTCC  [270]
#nifH28                   CACCTCGCCG CCGAAGCCGG CTCGGTCGAG GATCTGGAGC TCGAGGACGT TCTCAAGATC GGCTACAAGG GCATCAAGTG CGTCGAGTCC  [270]
#nifH31                   CATCTGGCCG CCGAGGCCGG TTCGGTCGAG GATCTGGAAC TCGAGGACGT CCTCAAGATC GGCTACAAGA ACATCAAGTG CGTCGAGTCC  [270]
#nifH32                   CACCTCGCCG CCGAAGCCGG CTCGGTCGAG GATCTGGAGC TCGAGGACGT TCTCAAGATC GGCTACAAGG GCATCAAGTG CGTCGAGTCC  [270]
#A._brasilense_Sp7_nifH   CACCTCGCCG CCGAAGCCGG CTCGGTCGAG GATCTGGAGC TCGAGGACGT TCTCAAGATC GGCTACAAGG GCATCAAGTG CGTCGAGTCC  [270]
#A._oryzae_N7_nifH        CATCTGGCCG CCGAGGCGGG TTCGGTCGAG GATCTGGAAC TCGAGGACGT CCTCAAGATC GGCTACAAGA ACATCAAGTG CGTCGAGTCC  [270]
#Methylococcus_capsulatus TCCCTGGCCG CCGACGCCGG CAGCGTCGAG GACCTGGAGC TGGAAGACGT GATGAAGGTC GGCTTCCGCG ACATCCGTTG CGTGGAATCC  [270]
#A._lipoferum_B2_nifH     CATCTGGCCG CCGAGGCCGG CTCGGTCGAG GATCTGGAGC TCGAGGACGT TCTCAAGATC GGCTACAAGA ACATCAAGTG CGTCGAGTCC  [270]
#Azoarcus_sp._BH72_nifH   CACCTGGCCG CTGAAGCCGG CTCGGTTGAA GACCTCGAAC TCGACGACGT CCTGTCGGTC GGCTTCGGTG GCGTGAAGTG CGTCGAGTCC  [270]

#nifH1                    GGCGGTCCGG AGCCGGGCGT CGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TCATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAAA ACGGCGCCTA CGACGACG--  [360]
#nifH2                    GGCGGTCCGG AGCCGGGCGT CGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TCATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAAA ACGGCGCCTA CGACGACG--  [360]
#nifH3                    GGCGGTCCGG AGCCGGGGGT TGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCGTA CGACGACG--  [360]
#nifH4                    GGCGGTCCGG AGCCGGGGGT CGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGACGACG--  [360]
#nifH6                    GGCGGTCCGG AGCCGGGGGT CGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGACGACG--  [360]
#nifH25                   GGCGGTCCGG AGCCGGGGGT TGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCGTA CGACGACG--  [360]
#nifH26                   GGCGGTCCGG AGCCGGGGGT TGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCGTA CGACGACG--  [360]
#nifH27                   GGTGGTCCGG AGCCGGGGGT TGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCGTA CGACGACG--  [360]
#nifH28                   GGCGGTCCGG AGCCGGGGGT CGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGACGACG--  [360]
#nifH31                   GGCGGTCCGG AGCCGGGCGT CGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TCATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGACGACG--  [360]
#nifH32                   GGCGGTCCGG AGCCGGGGGT CGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGACGACG--  [360]
#A._brasilense_Sp7_nifH   GGCGGTCCGG AGCCGGGGGT CGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TGATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGACGACG--  [360]
#A._oryzae_N7_nifH        GGCGGTCCGG AGCCGGGCGT CGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TCATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGACGACG--  [360]
#Methylococcus_capsulatus GGCGGTCCGG AACCGGGCGT GGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TTATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAAG AAGGCGCTTA TGATGGCA--  [360]
#A._lipoferum_B2_nifH     GGCGGTCCGG AGCCGGGGGT CGGCTGCGCC GGCCGCGGCG TCATCACCTC GATCAACTTC CTGGAAGAGA ACGGCGCCTA CGACGACG--  [360]
#Azoarcus_sp._BH72_nifH   GGCGGTCCGG AACCCGGCGT CGGCTGCGCC GGCCGTGGCG TTATCACCGC CATCAACTTC CTGGAAGAAG AAGGCGCCTA CGACGACGAA  [360]
```

```
#nifH1                    -TGGACTATG TGTCCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTCT GCGGCGGCTT CGCCATGCCG ATCCGCGAGA ACAAGGCCCA GGAAATCTAC  [450]
#nifH2                    -TGGACTATG TGTCCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTCT GCGGCGGCTT CGCCATGCCG ATCCGCGAGA ACAAGGCCCA GGAAATCTAC  [450]
#nifH3                    -TGGACTACG TGTCCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTGT GCGGCGGTTT CGCCATGCCC ATCCGCGAGA ACAAGGCCCA GGAAATCTAC  [450]
#nifH4                    -TGGACTACG TCTCCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTGT GCGGCGGTTT CGCCATGCCC ATCCGCGAGA ACAAGGCCCA GGAAATCTAC  [450]
#nifH6                    -TGGACTACG TCTCCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTGT GCGGCGGTTT CGCCATGCCC ATCCGCGAGA ACAAGGCCCA GGAAATCTAC  [450]
#nifH25                   -TGGACTACG TGTCCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTGT GCGGCGGCTT CGCCATGCCC ATCCGCGAGA ACAAGGCCCA GGAAATCTAC  [450]
#nifH26                   -TGGACTACG TGTCCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTGT GCGGCGGTTT CGCCATGCCC ATCCGCGAGA ACAAGGCCCA GGAAATCTAC  [450]
#nifH27                   -TGGACTACG TGTCCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTGT GCGGCGGTTT CGCCATGCCC ATCCGCGAGA ACAAGGCCCA GGAAATCTAC  [450]
#nifH28                   -TGGACTACG TCTCCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTGT GCGGCGGTTT CGCCATGCCC ATCCGCGAGA ACAAGGCCCA GGAAATCTAC  [450]
#nifH31                   -TGGACTATG TGTCCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTCT GCGGCGGCTT CGCCATGCCG ATCCGCGAGA ACAAGGCCCA GGAAATCTAC  [450]
#nifH32                   -TCGACTACG TCTCCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTGT GCGGCGGCTT CGCGATGCCG ATCCGCGAGA ACAAGGCCCA GGAAATCTAC  [450]
#A._brasilense_Sp7_nifH   -TGGACTACG TCTCCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTGT GCGGCGGTTT CGCCATGCCC ATCCGCGAGA ACAAGGCCCA GGAAATCTAC  [450]
#A._oryzae_N7_nifH        -TGGACTATG TGTCCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTCT GCGGCGGCTT CGCCATGCCG ATCCGCGAGA ACAAGGCCCA GGAAAATCTAC  [450]
#Methylococcus_capsulatus -TCGACTACG TCTCCTACGA CGTGCTCGGC GACGTGGTTT GCGGTGGTTT TGCCATGCCC ATCCGCGAGA ACAAGGCGCA GGAAATCTAC  [450]
#A._lipoferum_B2_nifH     -TGGACTATG TGTCCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTGT GCGGCGGCTT CGCCATGCCG ATCCGCGAGA ACAAGGCCCA GGAAATCTAC  [450]
#Azoarcus_sp._BH72_nifH   CTCGACTTCG TGTTCTACGA CGTGCTGGGC GACGTGGTGT GTGGTGGCTT CGCGATGCCG ATTCGCGAAA ACAAGGCCCA GGAAATCTAC  [450]

#nifH1                    ATCGTCATG- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [540]
#nifH2                    ATCGTCATG- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [540]
#nifH3                    ATCGTCATG- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [540]
#nifH4                    ATCGTCATG- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [540]
#nifH6                    ATCGTCATG- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [540]
#nifH25                   ATCGTCATG- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [540]
#nifH26                   ATCGTTATG- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [540]
#nifH27                   ATCGTCATG- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [540]
#nifH28                   ATCGTCATG- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [540]
#nifH31                   ATCGTCATG- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [540]
#nifH32                   ATCGTCATG- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [540]
#A._brasilense_Sp7_nifH   ATCGTCATGT CCGGTGAGAT GATGGCGCTC TACGCCGCCA ACAACATCGC CAAGGGCATT CTGAAGTACG CCCACAGCGG CGGCGTGCGC  [540]
#A._oryzae_N7_nifH        ATCGTCATGT CCGGCGAAAT GATGGCCATA ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [540]
#Methylococcus_capsulatus ATCGTCATGT CCGGCGAAAT GATGGC---- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [540]
#A._lipoferum_B2_nifH     ATCGTCATGT CCGGCGAAAT GATGGC---- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [540]
#Azoarcus_sp._BH72_nifH   ATCGTCTGCT CGGGCGAAAT GATGGCCATG TACGCCGCCA ACAACATCGC CAAGGGCATC GTGAAGTACG CCAACTCCGG TGGCGTGCGC  [540]
```

```
#nifH1                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH2                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH3                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH4                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH6                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH25                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH26                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH27                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH28                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH31                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#nifH32                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#A._brasilense_Sp7_nifH   CTCGGCGGCC TGATCTGCAA CGAGCGCCAG ACCGACAAGG AAATCGACCT CGCCTCCGCC CTGGCCGCCC GCCTCGGCAC CCAGCTCATC  [630]
#A._oryzae_N7_nifH        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#Methylococcus_capsulatus ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#A._lipoferum_B2_nifH     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#Azoarcus_sp._BH72_nifH   CTCGGCGGCC TGATCTGCAA CAGCCGCAAC ACCGACCGCG AAGACGAACT GATCGAAGCG CTGGCCGCCG CCATGGGCAC CCAGATGATC  [630]

#nifH1                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH2                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH3                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH4                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH6                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH25                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH26                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH27                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH28                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH31                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#nifH32                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#A._brasilense_Sp7_nifH   CACTTCGTGC CGCGCGACAA CATCGTGCAG CACGCCGAGC TGCGCCGCAT GACGGTGATC GAGTACGCGC CGGACAGCCA GCAGGCCCAG  [720]
#A._oryzae_N7_nifH        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#Methylococcus_capsulatus ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#A._lipoferum_B2_nifH     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [720]
#Azoarcus_sp._BH72_nifH   CACTTCGTGC CGCGTGACAA CGCCGTGCAG CACGCCGAAA TCCGCCGCAT GACCGTCATC GAGTACGACC CGACCCACAA GCAGGCCGAC  [720]
```

```
#nifH1                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH2                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH3                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH4                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH6                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH25                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH26                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH27                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH28                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH31                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#nifH32                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#A._brasilense_Sp7_nifH   GAATACCGCC AGCTCGCCAA CAAGGTCCAC GCGAACAAGG GCAAGGGCAC CATCCCGACC CCGATCACGA TGGAAGAGCT GGAAGAGATG  [810]
#A._oryzae_N7_nifH        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#Methylococcus_capsulatus ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#A._lipoferum_B2_nifH     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [810]
#Azoarcus_sp._BH72_nifH   CAGTACCGTC AGCTCGCCCA GAAGGTGCTG AACAACAAGA TGCTCGTCAT CCCGACCCCG ATCGAGATGG AACAGCTCGA AGCCCTGCTG  [810]

#nifH1                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---- [894]
#nifH2                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---- [894]
#nifH3                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---- [894]
#nifH4                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---- [894]
#nifH6                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---- [894]
#nifH25                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---- [894]
#nifH26                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---- [894]
#nifH27                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---- [894]
#nifH28                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---- [894]
#nifH31                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---- [894]
#nifH32                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---- [894]
#A._brasilense_Sp7_nifH   CTGATGGACT TCGGCATCAT GAAGTCGGAG GAGCAGCAGC TCGCCGAGCT CCAGGCCAAG GAAGCCGCCA AGGCCTGA-- ---- [894]
#A._oryzae_N7_nifH        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---- [894]
#Methylococcus_capsulatus ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---- [894]
#A._lipoferum_B2_nifH     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---- [894]
#Azoarcus_sp._BH72_nifH   ATGGAATTCG GCATCATGGA ACAGGAAGAC GAGTCCATCG TCGGCCAGAC CGCTGCCGAG CTTGCCGCCG GCGCCGCTGC CTAA [894]
```

Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών *nifH* (*Pseudomonas*)

```
#nifH16                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#nifH17                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#nifH18                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#nifH19                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#nifH20                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#nifH21                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#P._stutzeri_A1501_nifH  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#Azotobacter_vinelandii  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#M._barkeri_nifH         TCACATATCA ACAATTCCGA ATTCAACCAT CATTGATTCT AACTCTTCCA TTGGAAGCGG AGTTGGGACA ACAAGTTTGT CGTTGTTCTG  [  90]

#nifH16                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#nifH17                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#nifH18                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#nifH19                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#nifH20                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#nifH21                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#P._stutzeri_A1501_nifH  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#Azotobacter_vinelandii  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#M._barkeri_nifH         GACGTTGTGG GCAAGAGTCA GGTACTCTTT TGCCTGGTTG GATTCTGGGT CAAAATCAAT TACAGTCTTC CTGTTAATTT CTGCTCTCTG  [ 180]

#nifH16                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#nifH17                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#nifH18                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#nifH19                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#nifH20                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#nifH21                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#P._stutzeri_A1501_nifH  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- --------AT GGCAATGCGT  [ 270]
#Azotobacter_vinelandii  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#M._barkeri_nifH         AACAATGTTG TCCCTGGGTA TGAAGTGAAT TAGCTGACTT CCCAGTTTTT TTGCAAAAGC GTCGAGAAGT TCACGCTCTC CGTCGACATT  [ 270]

#nifH16                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#nifH17                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#nifH18                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#nifH19                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#nifH20                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#nifH21                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#P._stutzeri_A1501_nifH  CAATGCGCTA TTTACGGGAA GGGTGGAATC GGCAAATCCA CCACGACCCA GAACCTCGTG GCGGCCCTGG CCGAACTCGG CAAGAAGGTC  [ 360]
#Azotobacter_vinelandii  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#M._barkeri_nifH         TCTACTGTTG CAGATGATAC CTCCCAGACG GGCTCCACCT TTGGCAAACT TAGCAAGTCC TTTACAGATG TTATTTGCAG CATAGATAGC  [ 360]

#nifH16                  ---------- ---------- ---------- --CACTCGCC TGATCCTGCA CTCCAAGGCG CAGAACA-CC ATCATGGAAA TGGCCGCCGA  [ 450]
#nifH17                  ---------- ---------- ---------- --CACTCGCC TGATCCTGCA CTCCAAGGCG CAGAACA-CC ATCATGGAAA TGGCCGCCGA  [ 450]
#nifH18                  ---------- ---------- ---------- --CACTCGCC TGATCCTGCA CTCCAAGGCG CAGAACA-CC ATCATGGAAA TGGCCGCCGA  [ 450]
#nifH19                  ---------- ---------- ---------- --CACTCGCC TGATCCTGCA CTCCAAGGCG CAGAACA-CC ATCATGGAAA TGGCCGCCGA  [ 450]
#nifH20                  ---------- ---------- ---------- --CACTCGCC TGATCCTGCA CTCCAAGGCG CAGAACA-CC ATCATGGAAA TGGCCGCCGA  [ 450]
#nifH21                  ---------- ---------- ---------- --CACTCGCC TGATCCTGCA CTCCAAGGCG CAGAACA-CC ATCATGGAAA TGGCCGCCGA  [ 450]
#P._stutzeri_A1501_nifH  ATGATCGTCG GCTGCGACCC CAAGGCCGAC TCCACTCGCC TGATCCTGCA CTCCAAGGCG CAGAACA-CC ATCATGGAAA TGGCCGCCGA  [ 450]
#Azotobacter_vinelandii  ---------- ---------- ---------- -------CCG TATTCATTCA CTGCAACAAA CATCACA-CA ATCATGAAAA ACATTGTGCA  [ 450]
#M._barkeri_nifH         CATCAGTTCT CCACTGGCAA CTATGTAAAT CTCTTTTGCT T-TTCCTTCG CGGATAGGCA TAGCAAATCC ACCACACACA ACATCACCAA  [ 450]

#nifH16                  GGCCG--GTA CCGTGGAAGA CCTGGAACTC GAGGACGTGC TCAAGA---- -CCGGC--TA CGGCGACATC AAGTGCGT-C GAGTCGGGCG  [ 540]
#nifH17                  GGCCG--GTA CCGTGGAAGA CCTGGAACTC GAGGACGTGC TCAAGA---- -CCGGC--TA CGGCGACATC AAGTGCGT-C GAGTCGGGCG  [ 540]
#nifH18                  GGCCG--GTA CCGTGGAAGA CCTGGAACTC GGGGACGTGC TCAAGA---- -CCGGC--TA CGGCGACATC AAGTGCGT-C GAGTCGGGCG  [ 540]
#nifH19                  GGCCG--GTA CCGTGGAAGA CCTGGAACTC GAGGACGTGC TCAAGA---- -CCGGC--TA CGGCGACATC AAGTGCGT-C GAGTCGGGCG  [ 540]
#nifH20                  GGCCG--GTA CCGTGGAAGA CCTGGAACTC GAGGACGTGC TCAAGA---- -CCGGC--TA CGGCGACATC AAGTGCGT-C GAGTCGGGCG  [ 540]
#nifH21                  GGCCG--GTA CCGTGGAAGA CCTGGAACTC GAGGACGTGC TCAAGA---- -CCGGC--TA CGGCGACATC AAGTGCGT-C GAGTCGGGCG  [ 540]
#P._stutzeri_A1501_nifH  GGCCG--GTA CCGTGGAAGA CCTGGAACTC GAGGACGTGC TCAAGA---- -CCGGC--TA CGGCGACATC AAGTGCGT-C GAGTCGGGCG  [ 540]
#Azotobacter_vinelandii  AGACA--ATG GCGTCGAAAA TATCAACATG GAAGACGTGA TCAAAA---- -AAGGC--TT TGTGGACATC CAGTGCGTGT GAGTCCGGTG  [ 540]
#M._barkeri_nifH         GTACGTCGTA GAATACATAA TCAAGATCAT CGGTATATGC TCCAAGGTTT TCAAGCAGCC CGATGGAAGT GATAATTCCT CTGCCTGCAC  [ 540]

#nifH16                  GTCCGGAGCC GGGCGTGGGC TGCGCCGGTC GCGG--CGTG ATCACCGCGA TCAACTTCCT CGAAGAGGAA GGCGCCTACG AGGA-TGACC  [ 630]
#nifH17                  GTCCGGAGCC GGGCGTGGGC TGCGCCGGTC GCGG--CGTG ATCACCGCGA TCAACTTCCT CGAAGAGGAA GGCGCCTACG AGGA-TGACC  [ 630]
#nifH18                  GTCCGGAGCC GGGCGTGGGC TGCGCCGGTC GCGG--CGTG ATCACCGCGA TCAACTTCCT CGAAGAGGAA GGCGCCTACG AGGA-TGACC  [ 630]
#nifH19                  GTCCGGAGCC GGGCGTGGGC TGCGCCGGTC GCGG--CGTG ATCACCGCGA TCAACTTCCT CGAAGAGGAA GGCGCCTACG AGGA-TGACC  [ 630]
#nifH20                  GTCCGGAGCC GGGCGTGGGC TGCGCCGGTC GCGG--CGTG ATCACCGCGA TCAACTTCCT CGAAGAGGAA GGCGCCTACG AGGA-TGACC  [ 630]
#nifH21                  GTCCGGAGCC GGGCGTGGGC TGCGCCGGTC GCGG--CGTG ATCACCGCGA TCAACTTCCT CGAAGAGGAA GGCGCCTACG AGGA-TGACC  [ 630]
#P._stutzeri_A1501_nifH  GTCCGGAGCC GGGCGTGGGC TGCGCCGGTC GCGG--CGTG ATCACCGCGA TCAACTTCCT CGAAGAGGAA GGCGCCTACG AGGA-TGACC  [ 630]
#Azotobacter_vinelandii  GCCCCGAGCC GGGCGTTGGT TGCGCCGGCC GCTGGCTGTT ATCACCGCCA TCAACTTCAT GGAAGAAAAA GGCGCCTACA AAGACTGACC  [ 630]
#M._barkeri_nifH         ATCCTACACC TGGTTCAGGC C-CTCCGGAT TCCA--CACA TTTTATGTCG CCAAATCCCC GCTGCATAAC AACATC---- AAGATCAACT  [ 630]

#nifH16                  TGGACTTCGC CTTCTACGAC GTGCTCGGCG ACGTGGTCTG TGGCGGCTTC GCCATGCCCA TCC-GCGAGA ACAAGGCCCA GGAGATCTAC  [ 720]
#nifH17                  TGGACTTCGT CTTCTACGAC GTGCTCGGCG ACGTGGTCTG TGGCGGCTTC GCCATGCCCA TCC-GCGAGA ACAAGGCCCA GGAGATCTAC  [ 720]
#nifH18                  TGGACTTCGT CTTCTACGAC GTGCTCGGCG ACGTGGTCTG TGGCGGCTTC GCCATGCCCA TCC-GCGAGA ACAAGGCCCA GGAGATCTAC  [ 720]
#nifH19                  TGGACTTCGT CTTCTACGAC GTGCTCGGCG ACGTGGTCTG TGGCGGCTTC GCCATGCCCA TCC-GCGAGA ACAAGGCCCA GGAGATCTAC  [ 720]
#nifH20                  TGGACTTCGT CTTCTACGAC GTGCTCGGCG ACGTGGTCTG TGGCGGCTTC GCCATGCCCA TCC-GCGAGA ACAAGGCCCA GGAGATCTAC  [ 720]
#nifH21                  TGGACTTCGT CTTCTACGAC GTGCTCGGCG ACGTGGTCTG TGGCGGCTTC GCCATGCCCA TCC-GCGAGA ACAAGGCCCA GGAGATCTAC  [ 720]
#P._stutzeri_A1501_nifH  TGGACTTCGT CTTCTACGAC GTGCTCGGCG ACGTGGTCTG TGGCGGCTTC GCCATGCCCA TCC-GCGAGA ACAAGGCCCA GGAGATCTAC  [ 720]
#Azotobacter_vinelandii  TGGACTTCGT GTTCTTCGAC GTACTGGGCG ACGTCGTGTG CGGCGGTTTC GCCATGCCGA TCC-GCGACA ACAAGGCCCA GGA-ATCTAC  [ 720]
#M._barkeri_nifH         C---CTTCAT CGCCTTCA-- -CTTCTAAGA GTGTCAAGTA CGGTCTTCTG GTTCAGGCCA CCAAGCAGCA TTCTAGTAGA ATCTGCCTTC  [ 720]

#nifH16                  GTGGTCTGC- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#nifH17                  GTGGTCTGC- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#nifH18                  GTGGTCTGC- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#nifH19                  GTGGTCTGC- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#nifH20                  GTGGTCTGC- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#nifH21                  GTGGTCTGC- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#P._stutzeri_A1501_nifH  GTGGTCTGCT CCGGCGAGAT GATGGCGATG TATGCCGCCA ACAACATCTG CAAGGGCATC GTGAAGTACG CCAACTCCGG CAGCGTGCGG  [ 810]
#Azotobacter_vinelandii  AT-------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#M._barkeri_nifH         GGGTCACATC CTACAAGCAT AATTTTGTTG CCCATGGTCG AGAGGGACGC GGTCAGATTC TGAGTAGTAG TGGATTTTCC AATTCCACCT  [ 810]

#nifH16                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#nifH17                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#nifH18                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#nifH19                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#nifH20                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#nifH21                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#P._stutzeri_A1501_nifH  CTCGGCGGGC TGATCTGCAA CAGCCGCAAC ACCGACCGCG AGGACGAGCT GATCATGGCC CTGGCCGACA AGCTGGGCTC GCAGATGATC  [ 900]
#Azotobacter_vinelandii  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#M._barkeri_nifH         TTTCCGTAGA TTGCTATCTG TCTCAT---- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]

#nifH16                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#nifH17                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#nifH18                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#nifH19                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#nifH20                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#nifH21                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#P._stutzeri_A1501_nifH  CACTTCGTCC CGCGCGACAA CGTCGTGCAG CGCGCCGAAA TCCGCCGCAT GACCGTCATC GAGTACGACC CCGCCGCCAA GCAGGCCGAC  [ 990]
#Azotobacter_vinelandii  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#M._barkeri_nifH         ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]

#nifH16                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#nifH17                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#nifH18                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#nifH19                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#nifH20                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#nifH21                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#P._stutzeri_A1501_nifH  GAATACCGGA CCCTGGCGAA GAAGATCGTC GAGAACAAGA AACTGGTCAT CCCCACCCCG ATCAGCATGG ACGAGCTGGA AGCCTTGCTT  [1080]
#Azotobacter_vinelandii  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#M._barkeri_nifH         ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]

#nifH16                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----- [1155]
#nifH17                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----- [1155]
#nifH18                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----- [1155]
#nifH19                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----- [1155]
#nifH20                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----- [1155]
#nifH21                  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----- [1155]
#P._stutzeri_A1501_nifH  ATGGAGTTCG GGATCATGGA CGAGGAAGAC ATGACCATCG TCGGCAAGAC CGCCGCCGAG GAAGTCGTTG CCTGA [1155]
#Azotobacter_vinelandii  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----- [1155]
#M._barkeri_nifH         ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----- [1155]
```

Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών *ipdC*

```
#2_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#3_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#6_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#25_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#26_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#27_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#28_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#31_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#32_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#A._lipoferum_ipdC         ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#Enterobacter_cloacae_ipdC ATCCACATAT TCCAGCCCCA TACGCTTCAG GCTTTGATCC AGGCTGGCAA CCAGATATTT GCGTGACCCC CAGTCGCCGT AGGGGCCATC  [  90]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]

#2_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#3_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#6_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#25_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#26_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#27_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#28_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#31_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#32_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#A._lipoferum_ipdC         ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#Enterobacter_cloacae_ipdC CCACATGGTA TAACCCGCTT TGGTCGAGAT GATCAGCTCG TCGCGCCATG GCAGGAAATC TTCCTGCAAA ATGCGACCGA AATTACGTTC  [ 180]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]

#2_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#3_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#6_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#25_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#26_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#27_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#28_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#31_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#32_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#A._lipoferum_ipdC         ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#Enterobacter_cloacae_ipdC GGCTGAGCCG GGAGGAGGAC CGTAATTATT GGCAAGGTCG AAATGCGTAA TACCCAGATC GAACGCGCGT TGTAAAAGTT GACGGCTGTT  [ 270]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
```

```
#2_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#3_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#6_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#25_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#26_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#27_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#28_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#31_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#32_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#A._lipoferum_ipdC         ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#Enterobacter_cloacae_ipdC TTCGACAAGC GTGGCGTCGC CAAAATTGTG CCACAACCCG AGTGAGATGG CAGGCAACCT GAGTCCGCTT TGCCCGCAGC GGCGATACTG  [ 360]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]

#2_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#3_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#6_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#25_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#26_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#27_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#28_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#31_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#32_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#A._lipoferum_ipdC         ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------G GGGCGGGAGA GGGGGGATCA  [ 450]
#Enterobacter_cloacae_ipdC CATTGTCTGA TAACGATTTT TGTCCGGCTG GTAACCCATT CTGATGCCCT CTGGCGCTGA AAGGAAAAAT CAGTGTATAC GTTTACATTT  [ 450]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]

#2_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#3_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#6_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#25_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#26_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#27_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#28_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#31_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#32_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#A._lipoferum_ipdC         TACGCGGCCT CCACCCCTCC ACAATTTCCG GCGCATATGG ATTGTTTCGA ATGAAACAAT TCTTGCGCGG AGCGTGGCGG AGGCCGATGC  [ 540]
#Enterobacter_cloacae_ipdC ACATGAAAAA AAAGAGCATA GCGCAGCCTT TTTTGTAAAG CATTCTTTCC ATGCCCTTCT TACGACCAAT TCTGGACAGC CATCACGCTT  [ 540]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
```

```
#2_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#3_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#6_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#25_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#26_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#27_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#28_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#31_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#32_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#A._lipoferum_ipdC         TGTCCCCCTG TGCGGGTTTT CGGCCCGCGA AACCAATTGG AACGGGAGAG CGGCCATGAA GCTGGCCGAA GCCCTGCTGC GCGCGCTGAA  [ 630]
#Enterobacter_cloacae_ipdC CTTTAATACT CAAAGTGAGG TCAACGTCAG AAGGACACCT GTTATGCGAA CCCCATACTG CGTCGCCGAT TACCTGCTGG ACCGTCTTAC  [ 630]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC ---------- ---------- ---------- ---------- ---ATGCAAC CGACCTACAC TATTGGGGAT TATCTGCTGG ATCGCCTCGT  [ 630]

#2_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#3_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#6_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#25_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#26_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#27_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#28_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#31_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#32_ipdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#A._lipoferum_ipdC         GGATCGCGGC GCACAGGCCA TGTTCGGGAT TCCGGGCGAT TTCGCCTTGC CCTTCTTCAA GGTGGCGGAG GAAACCCAGA TCCTGCCCCT  [ 720]
#Enterobacter_cloacae_ipdC AGATTGTGGT GCCGATCATC TGTTTGGCGT GCCGGGCGAC TATAACCTGC AGTTTCTCGA CCACGTAATA GACAGCCCGG ATATTTGTTG  [ 720]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC TGACTGCGGT ATTGACCGCT TGTTCGGCGT ACCAGGAGAT TACAACTTAC AGTTTCTCGA TCGCGTCATC GCGCACAGCG CCCTGGGGTG  [ 720]

#2_ipdC                    ---------- ---------- ---------- -------GGGG GACGCGGCGG CGCGTTACAG TTCGACGCTG GGGGTGGCGG CGGTCACCTA  [ 810]
#3_ipdC                    ---------- ---------- ---------GG CTTCGCGGGG GACGCGACGG CGCGTTACAG TTCGACGCTG GGGGTGGCGG CGGTCACCTA  [ 810]
#6_ipdC                    ---------- ---------- --------GG CTTCGCGGGG GACGCGGCGG CGCGTTACAG CTCGACGCTG GGGGTGGCGG CGGTCACCTA  [ 810]
#25_ipdC                   ---------- ---------- --------GG CTTCGCGGGG GACGCGGCGG CGCGTTACAG TTCGACGCTG GGGGTGGCGG CGGTCACCTA  [ 810]
#26_ipdC                   ---------- ---------- --------GG CTTCGCGGGG GACGCGGCGG CGCGTTACAG TTCGACGCTG GGGGTGGCGG CGGTCACCTA  [ 810]
#27_ipdC                   ---------- ---------- ---------- CTTCGCGGGG GACGCGGCGG CGCGTTACAG TTCGACGCTG GGGGTGGCGG CGGTCACCTA  [ 810]
#28_ipdC                   ---------- ---------- --------GG CTTCGCGGGG GACGCGGCGG CGCGTTACAG TTCGACGCTG GGGGTGGCGG CGGTCACCTA  [ 810]
#31_ipdC                   ---------- ---------- --------GG CTTCGCGGGG GACGCGGCGG CGCGTTACAG TTCGACGCTG GGGGTGGCGG CGGTCACCTA  [ 810]
#32_ipdC                   ---------- ---------- --------GG CTTCGCGGGG GACGCGGCGG CGCGTTACAG CTCGACGCTG GGGGTGGCGG CGGTCACCTA  [ 810]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    ---------- ---------- --------GG CTTCGCGGGG GACGCGGCGG CGCGTTACAG CTCCACTCTA GGGGTGGCGG CGGTCACCTA  [ 810]
#A._lipoferum_ipdC         CCACACGCTG AGCCACGAGC CGGCGGTGGG CTTCGCGGCG GACGCGGCGG CGCGCTACAG CTCCACTCTA GGGGTGGCGG CGGTCACCTA  [ 810]
#Enterobacter_cloacae_ipdC GGTGGGCTGT GCCAATGAGC TGAACGCATC CTATGCCGCT GACGGATACG CCCGATGTAA ---GGGCTTT GCCGCGCTGC TGACCACATT  [ 810]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC GGTCGGCTGC GCCAACGAGC TGAATGCGGC CTATTCCGCT GACGGATATG CGCGCATCAA ---AGGGGCC GGTGCGCTGC TGACCACCTA  [ 810]
```

```
#2_ipdC                    CGGGGCGGGC GCCTTCAACA TGGTGAACGC GGTGGCCGGC GCCTACGCCG AGAAGTCGCC GGTCGTCGTC ATCTCCGGCG CGCCGGGCAC  [ 900]
#3_ipdC                    CGGGGCGGGC GCCTTCA-CA TGGTGAACGC GGTGGCCGGC GCCTACGCCG AGAAGTCGCC GGTCGTCGTC ATCTCCGGCG CGCCGGGCAC  [ 900]
#6_ipdC                    CGGGGCGGGC GCCTTCAACA TGGTGAACGC GGTGGCCGGC GCCTACGCCG AGAAGTCGCC GGTTGTCGTC ATCTCCGGCG CGCCGGGCAC  [ 900]
#25_ipdC                   CGGGGCGGGC GCCTTCAACA TGGTGAACGC GGTGGCCGGC GCCTACGCCG AGAAGTCGCC GGTCGTCGTC ATCTCCGGCG CGCCGGGCAC  [ 900]
#26_ipdC                   CGGGGCGGGC GCCTTCAACA TGGTGAGCGC GGTGGCCGGC GCCTACGCCG AGAAGTCGCC GGTCGTCGTC ATCCCCGGCG CGCCGGGCAC  [ 900]
#27_ipdC                   CGGGGCGGGC GCCTTCAACA TGGTGAACGC GGTGGCCGGC GCCTACGCCG AGAAGTCGCC GGTCGTCGTC ATCTCCGGCG CGCCGGGCAC  [ 900]
#28_ipdC                   CGGCGCGGGC GCCTTCAACA TGGTGAACGC GGTGGCCGGC GCCTACGCCG AGAAGTCGCC GGTCGTCGTC ATCTCCGGCG CGCCGGGCAC  [ 900]
#31_ipdC                   CGGGGCGGG- GCCTTCAACA TGGTGAACGC GGTGGCCGGC GCCTACGCCG AGAAGTCGCC GGTCGTCGTC ATCTCCGGCG CGCCGGGCAC  [ 900]
#32_ipdC                   CGGGGCGGGC GCCTTCAACA TGGTGAACGC GGTGGCCGGC GCCTACGCCG AGAAGTCGCC GGTTGTCGTC ATCTCCGGCG CGCCGGGCAC  [ 900]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    CGGGGCGGGC GCCTTCAACA TGGTGAATGC GGTGGCCGGC GCCTACGCCG AGAAGTCGCC GATCGTCGTC ATCTCCGGCG CGCCGGGCAC  [ 900]
#A._lipoferum_ipdC         CGGGGCGGGC GCCTTCAACA TGGTGAACGC GGTGGCCGGC GCCTACGCCG AGAAGTCGCC GGTCGTCGTC ATCTCCGGCG CGCCGGGCAC  [ 900]
#Enterobacter_cloacae_ipdC CGGCGTTGGG GAGTTAAGTG CCATGAACGG CATTGCCGGC AGCTATGCCG AGCATGTCCC GGTTTACAT ATTGTGGGGG CGCCGGGTAC  [ 900]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC CGGCGTCGGC GAACTGAGCG CGCTGAACGG CATTGCGGGT AGCTATGCGG AACATATTCC GGTATTGCAT ATCGTCGGCG CGCCCTCTAC  [ 900]

#2_ipdC                    GACGG-AGGG CAATGCCGGC CTGCTGCTGC ACCAC-CAGG GCCGCACGCT GGACA-CACA GTT----CCA GGTGTTCAAG GAGATCACCG  [ 990]
#3_ipdC                    GACGG-AGGG CAATGCCGGC CTGCTGCTGC ACCAC-CAGG GCCGCACGCT GGACA-CACA GTT----CCA GGTGTTCAAG GAGATCACCG  [ 990]
#6_ipdC                    GACGG-AGGG CAATGCCGGC CTGCTGCTGC ACCAC-CAGG GCCGCACGCT GGACA-CGCA GTT----CCA GGTGTTCAAG GAGATCACCG  [ 990]
#25_ipdC                   GACGG-AGGG CAATGCCGGC CTGCTGCTGC ACCAC-CAGG GCCGCACGCT GGACA-CACA GTT----CCA GGTGTTCAAG GAGATCACCG  [ 990]
#26_ipdC                   GACGG-AGGG CAATGCCGGC CTGCTGCTGC ACCAC-CAGG GCCGCACGCT GGGCAACAAC AAG----TCA AGTGTC--AA GAGATCACCG  [ 990]
#27_ipdC                   GACGG-AGGG CAATGCCGGC CTGCTGCTGC ACCAC-CAGG GCCGCACGCT GGACA-CGCA GTT----CCA GGTGTTCAAG GAGATCACCG  [ 990]
#28_ipdC                   GACGG-AGGG CAACGCCGGC CTGCTGCTGC ACCAC-CAGG GCCGCACGCT GGACA-CGCA GTT----CCA GGTGTTCAAG GAGATCACCG  [ 990]
#31_ipdC                   GACGG-AGGG CAATGCCGGC CTGCTGCTGC ACCAC-CAGG GCCGCACGCT GGACA-CACA GTT----CCA GGTGTTCAAG GAGATCACCG  [ 990]
#32_ipdC                   GACGG-AGGG CAATGCCGGC CTGCTGCTGC ACCAC-CAGG GCCGCACGCT GGACA-CGCA GTT----CCA GGTGTTCAAG GAGATCACCG  [ 990]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    GACGG-AGGG CAATGCCGGC CTGCTGCTGG ACCAC-CAGG GCCGCACGCT GCACA-CGCA GTT----CCA GGTGTTCAAG GAGATCACCG  [ 990]
#A._lipoferum_ipdC         GACGG-AGGG CAACGCCGGC CTGCTGCTGC ACCAC-CAGG GCCGCACGCT GGACA-CGCA GTT----CCA GGTGTTCAAG GAGATCACCG  [ 990]
#Enterobacter_cloacae_ipdC GGCGGCACAG CAAAGG-GGA GAGTTGCTGC ATCATACGTT GGGGGATGGG GAGTTCCGTC ACTTTTATCA TATGAGCGAG CCGATCACCG  [ 990]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC CGGCGCTCAG CAGCGT-GGC GAACTGCTGC ACCATACCCT CGGCGATGGC GATTTTCGCC ATTTCGCCCG CATGAGCGAG CAGATCACCT  [ 990]

#2_ipdC                    TCGCCCAGGC CCGGCTGGAC GACCCGGCCA AGGCCCCGGC GGAGATCTCT CGTGTGCTGG GGGCCGCCCG CGCCCTGTCG CGCCCGGTCT [1080]
#3_ipdC                    TCGCCCAGGC CCGGCTGGAC GACCCGGCCA AGGCCCCGGC GGAGATCTCT CGTGTGCTGG GGGCCGCCCG CGCCCTGTCG CGCCCGGTCT [1080]
#6_ipdC                    TCGCACAGGC GCGGCTGGAC GACCCGGCCA AGGCCCCGGC GGAGATCGCC CGCGTGCTCG GGGCCGCCCG CGCCCTGTCG CGCCCGGTCT [1080]
#25_ipdC                   TCGCCCAGGC CCGGCTGGAC GACCCGGCCA AGGCCCCGGC GGAGATCTCT CGTGTGCTGG GGGCCGCCCG CGCCCTGTCG CGCCCGGTCT [1080]
#26_ipdC                   TCGCCCAAGC C--GCTG-AC GACCCAC--- AAGCCCCGGC GGAGATCTCT CGTGTGCTGG GGGCCGCCCG CGCC-TGTCG CGCCCGGTCT [1080]
#27_ipdC                   TCGCACAGGC GCGGCTGGAC GACCCGGCCA AGGCCCCAGC GGAGATCGCT CGTGTGCTGG GGGCCGCCCG CGCCCTGTCG CGCCCGGTCT [1080]
#28_ipdC                   TCGCCCAGGC GCGGCTGGAC GACCCGGCCA AGGCCCCGGC GGAGATCGCC CGCGTGCTGG GGGCCGCCCG CGCCCTGTCG CGCCCGGTCT [1080]
#31_ipdC                   TCGCCCAGGC CCGGCTGGAC GACCCGGCCA AGGCCCCGGC GGAGATCTCT CGTGTGCTGG GGGCCGCCCG CGCCCTGTCG CGCCCGGTCT [1080]
#32_ipdC                   TCGCACAGGC GCGGCTGGAC GACCCGGCCA AGGCCCCGGC GGATATCGCC CGCGTGCTCG GGGCCGCCCG CGCCCTGTCG CGCCCGGTCT [1080]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    TGGCCCAGGC CCGGCTGGAC GACCCGGCCA AGGCCCCGGC GGAGATCGCC CGCGTGCTGG GGGCCGCCCG CGCCCTGTCG CGCCCGGTCT [1080]
#A._lipoferum_ipdC         TCGCCCAGGC GCGGTTGGAC GACCCGGCCA AGGCCCCGGC GGAGATCGCC CGCGTGCTGG GGGCCGCCCG CGCCCTGTCG CGCCCGGTCT [1080]
#Enterobacter_cloacae_ipdC TCGCACAGGC GGTCCTTACC GAACAAA--- ATGCCTGTTA TGAAATCGAC CGTGTGTTGA CAACCATGCT TCGGGAACGT CGCCCCGGTT [1080]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC GCAGCCAGGC GCTGCTGACC GCCGGCA--- ACGCCTGCCA TGAGATCGAC CGTGTCCTGC GCGATATGCT GACGCATCAT CGGCCCGGCT [1080]

#2_ipdC                    ATCTGGAAAT CCCCCGCAAC ATGGTCAACG CCGAGGTCGA GCCGGTGGGC GACGACCCCG CCTGGCCGGT GGACCGCGAC --GCGCTCGC [1170]
#3_ipdC                    ATCTGGAAAT CCCCCGCAAC ATGGTCAACG CCGAGGTCGA GCCGGTGGGC GACGACCCCG CCTGGCCGGT GGACCGCGAC --GCGCTCGC [1170]
#6_ipdC                    ATCTGGAAAT CCCCCGCAAC ATGGTCAACG CCGAGGTCGA GCCGGTCGGC GACGACCCCG CTTGGCCGGT GGACCGCGAC --GCGCTCGC [1170]
#25_ipdC                   ATCTGGAAAT CCCCCGCAAC ATGGTCAACG CCGAGGTCGA GCCGGTGGGC GACGACCCCG CCTGGCCGGT GGACCGCGAC --GCGCTCGC [1170]
#26_ipdC                   ATCTGGAAAT CCCCCGCAAC ATGGTCAACG CCGAGGTCGA GCCGGTGGGC GACGACCCCG CCTGGCCGGT GGACCGCGAC --GCGCTCGC [1170]
#27_ipdC                   ACCTGGAAAT CCCCCGCAAC ATGGTCAACG CCGAGGTCGA GCCGGTGGGC GATGATCGGG CCTGGCCGGT GGACCGCGAC --GCGCTGGC [1170]
#28_ipdC                   ATCTGGAAAT CCCCCGCAAC ATGGTCAACG CCGAGGTCGA GCCGGTGGGC GACGACCCCG CATGGCCGGT GGACCGCGAC --GCGCTCGC [1170]
#31_ipdC                   ATCTGGAAAT CCCCCGCAAC ATGGTCAACG CCGAGGTCGA GCCGGTGGGC GACGACCCCG CCTGGCCGGT GGACCGCGAC --GCGCTCGC [1170]
#32_ipdC                   ATCTGGAAAT CCCCCGCAAC ATGGTCAACG CCGATGTCGA GCCGGTCGGC CACCACCCCT CTTGGCCGGT GGACCGCGAC --GCGCTCGC [1170]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    ATCTGGAAAT CCCCCGCAAC ATGGCCAACG CCGAGGTCGA GCCGGTGGGC GACGACCCCG CCTGGCCGGT GGACCGCGAC --GCGCTGGC [1170]
#A._lipoferum_ipdC         ATCTGGAAAT CCCCCGCAAC ATGGTCAACG CCGAGGTCGA GCCGGTGGGC GACGACCCCG CCTGGCCGGT GGACCGCGAC --GCGCTGGC [1170]
#Enterobacter_cloacae_ipdC ATCTGATGTT ACCCGCCGAT GTGGCAAAAA AAGCGCCCAC GCCGCCTGTA AACGCTCTCA CTGATA-AGC AGGCTAATGC CGATAGCGCC [1170]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC ATCTGATGCT GCCGGCCGAT GTCGCCAGAG CGGCAGCGAT TGCCCCGGCC CA-GCGCTTA CTGGTGGAGC CCGCTCCGGC GGATGAAAAC [1170]

#2_ipdC                    CGCCTGCGC- GGA--CGAGG TGCTGGCGGC GATGCGCT-- ---CGGCCAA ATCGCCGGTG CTGATGGTCT GCGTGGAGGT CCGCCGCTAC [1260]
#3_ipdC                    CGCCTGCGC- GGA--CGAGG TGCTGGCGGC GATGCGCT-- ---CGGCCAA ATCGCCGGTG CTGATGGTCT GCGTGGAGGT CCGCCGCTAC [1260]
#6_ipdC                    CGCCTGCGC- GGA--CGAGG TGCTGGCGGC GATGCGCT-- ---CGGCCAC ATCGCCGGTG CTGATGGTCT GCGTGGAGGT CCGCCGCTAC [1260]
#25_ipdC                   CGCCTGCGC- GGA--CGAGG TGCTGGCGGC GATGCGCT-- ---CGGCCAA ATCGCCGGTG CTGATGGTCT GCGTGGAGGT CCGCCGCTAC [1260]
#26_ipdC                   CGCCTGCGC- GGA--CGAGG TGCTGGCGGC GATGCGCT-- ---CGGCCAA ATCGCCGGTG CTGATGGTCT GCGTGGAGGT CCGCCGCTAC [1260]
#27_ipdC                   GGCCTGCGC- GGA--CGAGG TGCTGGCGGC GATGCGCT-- ---CGGCCAA ATCGCCGGTG CTGATGGTCT GCGTGGAGGT CCGCCGCTAC [1260]
#28_ipdC                   CGCCTGCGC- GGA--CGAGG TGCTGGCGGC GATGCGCT-- ---CGGCCAC ATCGCCGGTG CTGATGGTCT GCGTCGAGGT CCGCCGCTAC [1260]
#31_ipdC                   CGCCTGCGC- GGA--CGAGG TGCTGGCGGC GATGCGCT-- ---CGGCCAA ATCGCCGGTG CTGATGGTCT GCGTGGAGGT CCGCCGCTAC [1260]
#32_ipdC                   CGCCTGCGC- GGA--CGATG TGCTGGCGGA GATGCTCT-- ---CGGCCAC ATCCCCGGTG CTGATGGTCT GCGTGGAGGT CCGCCGCTAC [1260]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    -GCCTGCGCC GGA--CGAGG TGCTGGCGGC CATGCGCT-- ---CGGCCAC GTCCCCGGTG CTGATGGTCT GCGTCGAGGT CCGCCGCTAC [1260]
#A._lipoferum_ipdC         -CCCCTGCGC- GGA--CGAGG TGCTGGCGGC CATGCGCT-- ---CGGCCAC GTCACCGGTG CTGATGGTCT GCGT-GAGGT CCGCCGCTAC [1260]
#Enterobacter_cloacae_ipdC TGCCTGAAAG CGTTCCGGGA TGCTGCTGAG AACAAACTGG CGATGAGCAA ACGTACCGCG CTGCTGGCCG ACTTCCTTGT TCTGCGCCAT [1260]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC CAGCTCGCGG GGTTCCGCGA ACATGCCAGC CGCCTGCTGC GGGGCAGCCG ACGCATTTCT CTGCTGGCGG ATTTCCTGGC GCAACGCTAT [1260]

#2_ipdC                    GGG-CTGGAG GCCAAGGTGG CGGAGCTGGC GCAACGGCTG GGCGTGCCGG TGGTGACCAC CTTCATGGGG CGCGGCCTGC TGGCCGACGC [1350]
#3_ipdC                    GGG-CTGGAG GCCAAGGTGG CGGAGCTGGC GCAACGGCTG GGCGTGCCGG TGGTGACCAC CTTCATGGGG CGCGGCCTGC TGGCCGACGC [1350]
#6_ipdC                    GGG-CTGGAG GCCAAGGTGG CGGAGCTGGC GCAACGGCTG GGCGTGCCGG TGGTGACCAC CTTCATGGGG CGCGGCCTGC TGGCCGACGC [1350]
#25_ipdC                   GGG-CTGGAG GCCAAGGTGG CGGAGCTGGC GCAACGGCTG GGCGTGCCGG TGGTGACCAC CTTCATGGGG CGCGGCCTGC TGGCCGACGC [1350]
#26_ipdC                   GGG-CTGGAG GCCAAGGTGG CGGAGCTGGC GCAACGGCTG GGCGTGCCGG TGGTGACCAC CTTCATGGGG CGCGGCCTGC TGGCCGACGC [1350]
#27_ipdC                   GGG-CTGGAG GCCAAGGCGG CGGAGCTGGC GCAACGGCTG GGCGTGCCGG TGGTGACCAC CTTCATGGGG CGCGGCCTGC TGGCCGACGC [1350]
#28_ipdC                   GGG-CTGGAG GCCAAGGTGG CGGAGCTGGC GCAGCGGCTG GGCGTGCCGG TGGTGACCAC CTTCATGGGG CGCGGCCTGC TGGCCGATGC [1350]
#31_ipdC                   GGG-CTGGAG GCCAAGGTGG CGGAGCTGGC GCAACGGCTG GGCGTGCCGG TGGTGACCAC CTTCACGGGG CGCGGCCTGC TGGCCGACGC [1350]
#32_ipdC                   GGG-CTGGAG GCCAAGGTGG CGGAGCTGGC GCAACGGCTG GGCGTGCCGG TGGTGACCAC CTTCATGGGG CGCGGCCTGC TGGCCGACGC [1350]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    GGG-CTGGAG GCCAAGGTGG CGGACGTGGC GCACGGGCTG GGCGTGCGGT CGGTCACCAC CTTCATGGGG CGCGGCCTGC TGGCCGACGC [1350]
#A._lipoferum_ipdC         GGGGCTGGAG GCCAAGGTGG CGGAACTGGC GCAGCGGCTG GGCGTGCCGG TGGTCACCAC CTTCATGGGG CGCGGCCTGT TGGCCGACGC [1350]
#Enterobacter_cloacae_ipdC GGC-CTGAAG CATGCGCTAC AGAAGTGGGT GAAAGAGGTA CCGATGGCAC ATGCCACCAT GCTGATGGGG AAAGGGATAT TCGACGAGC- [1350]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC GGC-CTGCAG AACACGCTCC GGGAGTGGGT GGCGAAAACC CCCATCGCTC ACGCCACCAT GCTAATGGGC AAGGGGTTGT TCGATGAGCA [1350]

#2_ipdC                    GCCGACCCCG CCGCT-CGGC ACCTACATCG GCGTCGCCGG CGACGCGGAG ATCACCCGGC TGGTCGAGGA GTCGGACGGG CTGTTCCTGC [1440]
#3_ipdC                    GCCGACCCCG CCGCT-CGGC ACCTACATCG GCGTCGCCGG CGACGCGGAG ATCACCCGGC TGGTCGAGGA GTCGGACGGG CTGTTCCTGC [1440]
#6_ipdC                    GCCGACCCCG CCGCT-CGGC ACCTACATCG GCGTCGCCGG CGACGCGGAG ATCACCCGGC TGGTCGAGGA GTCGGACGGG CTGTTCCTGC [1440]
#25_ipdC                   GCCGACCCCG CCGCT-CGGC ACCTACATCG GCGTCGCCGG CGACGCGGAG ATCACCCGGC TGGTCGAGGA GTCGGACGGG CTGTTCCTGC [1440]
#26_ipdC                   GCCGACCCCG CCGCT-CGGC ACCTACATCG GCGTCGCCGG CGACGCGGAG ATCACCCGGC TGGTCGAGGA GTCGGACGGG CTGTTCCTGC [1440]
#27_ipdC                   GCCGACCCCG CCGCT-CGGC ACCTACATCG GCGTCGCGGG CGACGCGGAA ATCACCCGGC TGGTCGAGGA GTCGGACGGG CTGTTCCTGC [1440]
#28_ipdC                   GCCGACCCCG CCGCT-CGGC ACCTACATCG GCGTCGCCGG CGACGCGGAG ATCACCCGGC TGGTCGAGGA GTCGGACGGG CTGTTCCTGC [1440]
#31_ipdC                   GCCGACCCCG CCGCT-CGGC ACCTACATCG GCGTCGCCGG CGACGCGGAG ATCACCCGGC TGGTCGAGGA GTCGGACGGG CTGTTCCTGC [1440]
#32_ipdC                   GCCGACCCCG CCGCT-CGGC ACCTACATCG GCGTCGCCGG CGACGCGGAG ATCACCCGGC TGGTCGAGGA GTCGGACGGG CTGTTCCTGC [1440]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    GCCGACCCCG CCGCT-CGGC ACCTACATCG GCGTCGCCGG CGACGCGGAG ATCACCCGGC TGGTCGAGGA GTCGGACGGG CTGTTCCTGC [1440]
#A._lipoferum_ipdC         GCCGACCCCG CCGCT-CGGC ACCTACATCG GCGTCGCCGG CGACGCGGAG ATCACCCGGC TGGTCGAGGA GTCGGACGGG CTGTTCCTGC [1440]
#Enterobacter_cloacae_ipdC GTCAGGCGGG TTTTTACGGT ACATACAGTG GTTCAGCCAG CACCGGTGCG GTAAAAGAGG CGATTGAAGG GGCTGACACG GTATTGTGTG [1440]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC GCTGAACGGG TTTGT-CGGG ACCTATAGCG GGATCGCCAG CGCCCCGCAG ACCCGGGAGG CGATTGAAAA CGCCGACACC ATCATCTGCA [1440]

#2_ipdC                    TCGGCGCCAT CCTCAGCGAC ACCAACTTCG CGGTGTCCCA GCGCAAGATC GACC-TGCGC AAGACCATCC ACGCCTTCGA CCGGGCGGTG [1530]
#3_ipdC                    TCGGCGCCAT CCTCAGCGAC ACCAACTTCG CGGTGTCCCA GCGCAAGATC GACC-TGCGC AAGACCATCC ACGCCTTCGA CCGGGCGGTG [1530]
#6_ipdC                    TCGGCGCCAT CCTCAGCGAC ACCAACTTCG CGGTGTCCCA GCGCAAGATC GACC-TGCGC AAGACCATCC ACGCCTTCGA CCGGGCGGTG [1530]
#25_ipdC                   TCGGCGCCAT CCTCAGCGAC ACCAACATAG CGGTGTCCCA GCGCAAGATC GACCCTGCGC AAGACCATCC ACGCCTTCGA CCGGGCGGTG [1530]
#26_ipdC                   TCGGCGCCAT CCTCAGCGAC ACCAACTTCG CGGTGTCCCA GCACAAGATC GACC-TGCGC AAGACCATCC ACGCCTTCGA CCGGGCGGTG [1530]
#27_ipdC                   TCGGTGCCAT CCTCAGCGAC ACCAACTTCG CGGTGTCCCA GCGCAAGATC GACC-TGCGC AAGACCATCC ACGCCTTCGA CCGGGCGGTG [1530]
#28_ipdC                   TCGGCGCGAT CCTCAGCGAC ACCAACTTCG CGGTGTCCCA GCGCAAGATC GACC-TGCGC AAGACCATCC ACGCCTTCGA CCGGGCGGTG [1530]
#31_ipdC                   TCGGCGCCAT CCTCAGCGAC ACCAACTTCG CGGTGTCCCA GCGCAAGATC GACC-TGCGC AAGACCATCC ACGCCTTCGA CCGGGCGGTG [1530]
#32_ipdC                   TCGGCGCCAT CCTCAGCGAC ACCAACTTCG CGGTGTCCCA GCGCAAGATC GACC-TGCGC AAGACCATCC ACGCCTTCGA CCGGGCGGTG [1530]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    TCGGCGCCAT CCTCAGCGAC ACAAACTTCG CGGTGTCCCA GCGCAAGATC GACC-TGCGC AAGACCATCC ACGCCTTCGA CCGGGCGGTG [1530]
#A._lipoferum_ipdC         TCGGCGCCAT CCTCAGCGAC ACCAACTTCG CGGTGTCCCA GCGCAAGATC GACC-TGCGC AAGACCATCC ACGCCTTCGA CCGGGCGGTG [1530]
#Enterobacter_cloacae_ipdC TTGGCACGCG TTTTACCGAT ACCCTGACGG CCGGGTTCAC GCACCAGCTT ACCCCGGCGC AA-ACCATTG AAG--TTCAG CCGCATGCCG [1530]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC TTGGTACGCG CTTCACCGAC ACTATCACCG CGGGATTCAC CCAGCATCTG GCGCGGGAGA AG-ACCATTG AGA--TCCAG CCCTTCGCCG [1530]

#2_ipdC                    -ACGC-TGGG CTATCACACC TACGCCGACA TCCCGCTGGA CGGGCTGGTC GACGCGCTGC TGGAGCGGCT G---CCGCCG TCCGACCGGA [1620]
#3_ipdC                    -ACGC-TGGG CTATCACACC TACGCCGACA TCCCGCTGGA CGGGCTGGTC GACGCGCTGC TGGAGCGGCT G---CCGCCG TCCGACCGGA [1620]
#6_ipdC                    -ACGC-TGGG CTATCACACC TACGCCGACA TCCCGCTGGA CGGGCTGGTC GACGCGCTGC TGGAGCGGCT G---CCGCCG TCCGACCGGA [1620]
#25_ipdC                   -ACGC-TGGG CTATCACACG TACGCCGACA TCCCGCTGGA CGGGCTGGTC GACGCGCTGC TGGAGCGGCT G---CCGCCG TCCGACCGGA [1620]
#26_ipdC                   -ACGC-TGGG CTATCACACC TACGCCGACA TCCCGCTGGA CGGGCTGGTC GACGCGCTGC TGGAGCGGCT G---TCGCCG TCCGACCGGA [1620]
#27_ipdC                   -ACGC-TGGG CTATCACACC TACGCCGACA TCCCGCTGGA CGGGCTGGTC GACGCCCTGC TGGAGCGGCT G---CCGCCG TCCGACCGGA [1620]
#28_ipdC                   -ACGC-TGGG CTATCACACC TACGCCGACA TCCCGCTGGC CGGGCTGGTG GACGCCCTGC TGGAGCGGCT G---CCGCCG TCCGACCGGA [1620]
#31_ipdC                   -ACGC-TGGG CTATCACACC TACGCCGACA TCCCGCTGGA CGGGCTGGTC GACGCGCTGC TGGAGCGGCT G---CCGCCG TCCGACCGGA [1620]
#32_ipdC                   -ACGC-TGGG CTATCACACC TACGCCGACA TCCCGCTGGA CGGGCTGGTG GACGCGCTGC TGGAGCGGCT G---CCGCCG TCCGACCGGA [1620]
#A._brasilense_Sp7_ipdC    -ACGC-TGGG CTATCACACC TACGCCGACA TCCCGCTGGA CGGGCTGGTG GACGCGCTGC TGGAGCGGCT G---CCGCCG TCCGACCGCA [1620]
#A._lipoferum_ipdC         -ACGC-TGGG CTATCACACC TACGCCGACA ATCCGCTGGG CGGGCTGGTG GACGCGCTGC TGGAGTGGCT G---CCGCGC TCCGACCGGA [1620]
#Enterobacter_cloacae_ipdC CACGCGTCGG GGATGTCTGG TTTACCGGCA TCCCAATGAA CCAGGCGATT GAGACGCTGG TCGAACT--- ----CAGCAA ACAGCACGTG [1620]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC TCAGGGTGGG CGACCACTGG TTCAGCGGCG TGCCGATGGA TCAAGCTCTG GCTGCATTAA TGACGCTTTC CGCCCCGCTG GCGGCG-GAG [1620]
```

```
#2_ipdC                     CGACCCGCGG CAAGGAGCCC CA-CGCCTAC CCCACCGGCC TTCAGGCGGA CGG-CGAGCC GATCGCCCCG ATGGACATC- -GCCCGTGCC  [1710]
#3_ipdC                     CGACCCGCGG CAAGGAGCCC CA-CGCCTAC CCCACCGGCC TTCAGGCGGA CGG-CGAGCC GATCGCCCCG ATGGACATC- -GCCCGTGCC  [1710]
#6_ipdC                     CGACCCGCGG CAAGGAGCCC CA-CGCCTAC CCCACCGGCC TTCAGGCGGA CGG-CGAGCC GATCGCCCCG ATGGACATC- -GCCCGTGCC  [1710]
#25_ipdC                    CGACCCGCGG CAAGGAGCCC CA-CGCCTAC CCCACCGGCC TTCAGGCGGA CGG-CGAGCC GATCGCCCCG ATGGACATC- -GCCCGTGCC  [1710]
#26_ipdC                    CGACCCGCGG CAAGGAGCCC CA-CGCCTAC CCCACCGGCC TTCAGGCGGA CGG-CGAGCC GATCGCCCCG ATGGACATC- -GCCCGTGCC  [1710]
#27_ipdC                    CGACCCGCGG CAAGGAGCCC CA-CGCCTAC CCCACCGGCC TTCAGGCGGA CGG-CGAGCC GATCGCCCCG ATGGACATC- -GCCCGTGCC  [1710]
#28_ipdC                    CGACCCGCGG CAAGGAGCCC CA-CGCCTAC CCGACCGGCC TTCAGGCGGA CGG-CGAGCC GATCGCCCCG ATGGACATT- -GCCCGCGCC  [1710]
#31_ipdC                    CGACCCGCGG CAAGGAGCCC CA-CGCCTAC CCCACCGGCC TTCAGGCGGA CGG-CGAGCC GATCGCCCCG ATGGACATC- -GCCCGTGCC  [1710]
#32_ipdC                    CGACCCGCGG CAAGGAGCCC CA-CGCCTAC CCCACCGGCC TTCAGGCGGA CGG-CGAGCC GATCGCCCCG ATGGACATC- -GCCCGTGCC  [1710]
#A._brasilense_Sp7_ipdC     CGACGCGCGG CAAGGAACCC CA-CGCCTAC CCGACCGGCC TTCAGGCCGA CGA-CGGCCC CATCGCACCG ATGGACATC- -GCCCGTGCC  [1710]
#A._lipoferum_ipdC          CGACCCGCGG CAAGGAGCCC CA-CGCCTAT CCGACCGGAC TTCAGGCGGA CGG-CGAACC GATCGCCCCG ATGGACATC- -GCCCGCGCC  [1710]
#Enterobacter_cloacae_ipdC  CACACTG-GC CTTATGTCGT CATCATCCGG CGCAATACCG TTCCCGCAGC CGGACGGTTC GCTTACCCAG GAGAATTTCT GGAGAAGTTT  [1710]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC TGGGCGGCGC CTCAGGTCGT -GGCGCCGGA AGTGGAAGAG -----GAGGG CGAA-GGCGA GTTAACCCAG AAGAATTTCT GGTCGACAGT  [1710]

#2_ipdC                     GTCAACGACC GCGTCCGCGC CGGGCAGGAA CCGCTGCTGA TCGCCGCGGA CATGGGCGAC TGCC--TGTT CACCGCCATG GACATGATCG  [1800]
#3_ipdC                     GTCAACGACC GCGTCCGCGC CGGGCAGGAA CCGCTGCTGA TCGCCGCGGA CATGGGCGAC TGCC--TGTT CACCGCCATG GACATGATCG  [1800]
#6_ipdC                     GTCAACGACC GCGTCCGCGC CGGGCAGGAA CCGCTGCTGA TCGCCGCGGA CATGGGCGAC TGCC--TGTT CACCGCCATG GACATGATCG  [1800]
#25_ipdC                    GTCAACGACC GCGTCCGCGC CGGGCAGGAA CCGCTGCTGA TCGCCGCGGA CATGGGCGAC TGCC--TGTT CACCGCCATG GACATGATGG  [1800]
#26_ipdC                    GTCAACGACC GCGTCCGCGC CGGGCAGGAA CCGCTGCTGA TCGCCGCGGA CATGGGCGAC TGCC--TGTT CACCGCCATG GACATGATCG  [1800]
#27_ipdC                    GTCAACGACC GCGTCCGCGC CGGGCAGGAA CCGCTGCTGA TCGCCGCGGA CATGGGCGAC TGCC--TGTT CACCGCCATG GACATGATCG  [1800]
#28_ipdC                    GTCAACGACC GTGTCCGCGC CGGGCAGGAA CCGCTGCTGA TCGCCGCGGA CATGGGCGAC TGCC--TGTT CACCGCCATG GACATGATCG  [1800]
#31_ipdC                    GTCAACGACC GCGTCCGCGC CGGGCAGGAA CCGCTGCTGA TCGCCGCGGA CATGGGCGAC TGCC--TGTT CACCGCCATG GACATGATCG  [1800]
#32_ipdC                    GTCAACGACC GCGTCCGCGC CGGGCAGGAA CCGCTGCTGA TCGCCGCGGA CATGGGCGAC TGCC--TGTT CACCGCCATG GACATGATCG  [1800]
#A._brasilense_Sp7_ipdC     GTCAACGACC GCGTGCGCGC CGGGCAGGAG CCGCTGCTGA TCGCGGCGGA CATGGGCGAC TGCC--TGTT CACCGCCATG GACATGATCG  [1800]
#A._lipoferum_ipdC          GTCAACGACC GCGTGCGGGC CGGGCAGGAG CCGCTGCTGA TCGCGGCGGA CATGGGCGAC TGCC--TGTT CACCGCCATG GACATGATCG  [1800]
#Enterobacter_cloacae_ipdC  GCAAACCTTT ATTCGCCCGG GGGACATTAT CC-TTGCCGA CCA--GGGAA CATCGGCCTT CGGCGCGATT GATCTGCGTT TAC-CGGCTG  [1800]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC GCAGGATGCG CTGCGCCCCG GCGATATTAT CC-TCGCCGA TCA--GGGGA CGGCGGCGTT TGGCATCGCG GCGCTTAAGC TTC-CCTCTG  [1800]

#2_ipdC                     ACGCCGGGCT GATGGCGCCG GGCTATTACG CGGGC--ATG GGCTTCGGCG TGCCAGCGGG CATTGGGGCG CAGTGCGTGT CGGGCGGCAA  [1890]
#3_ipdC                     ACGCCGGGCT GATGGCGCCG GGCTATTACG CGGGC--ATG GGCTTCGGCG TGCCAGCGGG CATTGGGGCG CAGTGCGTGT CGGGCGGCAA  [1890]
#6_ipdC                     ACGCCGGGCT GATGGCGCCG GGCTATTACG CGGGC--ATG GGCTTCGGCG TGCCGGCGGG GATCGGGGCG CAGTGCGTGT CGGGCGGCAA  [1890]
#25_ipdC                    ACGCCGGGCT GATGGCGCCG GGCTATTACG CGGGC--ATG GGCTTCGGCG TGCCAGCGGG CATTGGGGCG CAGTGCGTGT CGGGCGGCAA  [1890]
#26_ipdC                    ACGCCGGGCT GATGGCGCCG GGCTATTACG CGGGC--ATG GGCTTCGGCG TGCCAGCGGG CATTGGGGCG CAGTGCGTGT CGGGCGGCAA  [1890]
#27_ipdC                    ACGCCGGGCT GATGGCGCCG GGCTATTACG CGGGC--ATG GGCTTCGGCG TGCCGGCGGG CATCGGGGCG CAGTGCGTGT CGGGCGGCAA  [1890]
#28_ipdC                    ACGCCGGGCT GATGGCGCCG GGCTATTACG CGGGC--ATG GGCTTCGGCG TCCCGGCGGG CATCGGGGCG CAGTGCGTGT CGGGCGGCAG  [1890]
#31_ipdC                    ACGCCGGGCT GATGGCGCCG GGCTATTACG CGGGC--ATG GGCTTCGGCG TGCCAGCGGG CATTGGGGCG CAGTGCGTGT CGGGCGGCAA  [1890]
#32_ipdC                    ACGCCGGGCT GATGGCGCCG GGCTATTACG CGGGC--ATG GGCTTCGGCG TGCCGGCGGG GATCGGGGCG CAGTGCGTGT CGGGCGGCAA  [1890]
#A._brasilense_Sp7_ipdC     ACGCCGGGCT GATGGCGCCG GGCTATTACG CGGGC--ATG GGCTTCGGCG TGCCGGCGGG CATCGGGGCG CAGTGCGTGT CGGGCGGCAA  [1890]
#A._lipoferum_ipdC          ACGCCGGGCT GATGGCGCCG GGCTATTACG CGGGC--ATG GGCTTCGGCG TGCCGGCGGG GATCGGGGCG CAGTGCGTGT CGGGCGGCAA  [1890]
#Enterobacter_cloacae_ipdC  ATGTGAACTT TAT--CGTCC AGCCGCTGTG GGGCTCGATT GGTTACACGC TGGCGGCGGC GTTTGGTGCA CAAACCGCAT GCCCGAACCG  [1890]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC AGGCATCGCT GAT--CGTTC AGCCGCTGTG GGGGTCGATT GGTTTTACCC TCCCGGCCGC CTATGGCGCG CAAACCGCGG CGGCAGAGCG  [1890]

#2_ipdC                     GCGCATCCTG ACGGTGGTCG GCGACGGCGC CTTCCAGATG ACCGGGTGGG AGCTTGGCA- ACTGCCGACG CCTGGGCATC GACCCCATCG  [1980]
#3_ipdC                     GCGCATCCTG ACGGTGGTCG GCGACGGCGC CTTCCAGATG ACCGGGTGGG AGCTTGGCA- ACTGCCGACG CCTGGGCATC GACCCCATCG  [1980]
#6_ipdC                     GCGCATCCTG ACGGTGGTCG GCGACGGTGC CTTCCAGATG ACCGGGTGGG AGCTTGGCA- ACTGCCGACG CCTGGGCATC GACCCCATCG  [1980]
#25_ipdC                    GCGCATCCTG GCGGTGGTCG GCGACGGCGC CTTCCAGATG ACCGGGTGGG AGCTTGGCA- ACTGCCGACG CCTGGGCATC GACCCCATCG  [1980]
#26_ipdC                    GCGCATCCTG ACGGTGGTCG GCGACGGCGC CTTCCAGATG ACCGGGTGGG AGCTTGGCA- ACTGCCGACG CCTGGGCATC GACCCCATCG  [1980]
#27_ipdC                    GCGCATCCTG ACGGTGGTCG GCGACGGCGC CTTCCAGATG ACCGGGTGGG AGCTTGGCA- ACTGCCGACG CCTGGGCATC GACCCCATCG  [1980]
#28_ipdC                    GCGCATCCTG ACCGTGGTCG GCGACGGCGC CTTCCAGATG ACCGGGTGGG AGCTTGGCA- ACTGCCGACG GCTGGGCATC GACCCCATCG  [1980]
#31_ipdC                    GCGCATCCTG ACGGTGGTCG GCGACGGCGC CTTCCAGATG ACCGGGTGGG AGCTTGGCA- ACTGCCGACG CCTGGGCATC GACCCCATCG  [1980]
#32_ipdC                    GCGCATCCTG ACGGTGATCG GCGACGGTGC CTTCCAGATG ACCGGGTGGG AGCTTGGCA- ACTGCCGACG CCTGGGCATC GACCCCATCG  [1980]
#A._brasilense_Sp7_ipdC     GCGCATCCTG ACGGTGGTCG GCGACGGCGC CTTCCAGATG ACCGGGTGGG AGCTTGGCA- ACTGCCGACG GCTGGGCATC GACCCCATCG  [1980]
#A._lipoferum_ipdC          GCGCATCCTG ACGGTGGTCG GCGACGGCGC CTTCCAGATG ACCGGGTGGG AGCTTGGCA- ACTGCCGACG GCTGGGCATC GACCCCATCG  [1980]
#Enterobacter_cloacae_ipdC  GCGCGTGATT GTGCTGACGG GGGATGGCGC GGCCCAGCTC ACTATTCAGG AACTAGGCTC GATGCTGCGT GATAAACAGC -ACCCCATTA  [1980]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC GCGGGTGGTG CTGATCGTCG GCGATGGCGC CGCCCAACTG ACGATTCAGG AGATGGGCTC TATGCTTCGC GATAAGCAAA -AACCGCTTA  [1980]

#2_ipdC                     TGATCCTGTT CAACAACGCC AGTTGGGAGA TGCTGCGCAC CTTCCA--GC CCGAATCGGC -CTTCAACGA CCTGGACGAC TGG-------  [2070]
#3_ipdC                     TGATCCTGTT CAACAACGCC AGTTGGGAGA TGCTGCGCAC CTTCCA--GC CCGAATCGGC -CTTCAACGA CCTGGACGAC TGG-------  [2070]
#6_ipdC                     TGATCCTGTT CAACAACGCC AGTTGGGAGA TGCTGCGCAC CTTCCA--GC CCGAATCGGC -CTTCAACGA CCTGGACGAC TGG-------  [2070]
#25_ipdC                    TGATCCTGTT CAACAACGCC AGTTGGGAGG TGCTGCGCAC CTTCCA--GC CCGAATCGGC -CTTCAACGA CCTGGACGAC TGG-------  [2070]
#26_ipdC                    TGATCCTGTT CAACAACGCC AGTTGGGAGA TGCTGCGCAC CTTCCA--GC CCGAATCGGC -CTTCAACGA CCTGG----- ----------  [2070]
#27_ipdC                    TGATCCTGTT CAACAACGCC AGTTGGGAGA TGCTGCGCAC CTTCCA--GC CCGAATCGGC -CTTCAACGA CCTGGACGAC TGG-------  [2070]
#28_ipdC                    TGATCCTGTT CAACAACGCC AGTTGGGAGA TGCTGCGCAC CTTCCA--GC CCGAATCGGC -CTTCAACGA CCTGGACGAC TGG-------  [2070]
#31_ipdC                    TGATCCTGTT CAACAACGCC AGTTGGGAGA TGCTGCGCAC CTTCCA--GC CCGAATCGGC -CTTCAACGA CCTGGACGAC TGG-------  [2070]
#32_ipdC                    TGATCCTGTT CAACAACGCC AGTTGGGAGA TGCTGCGCAC CTTCCA--GC CCGAATCGGC -CTTCAACGG CCTGGACGAC TGG-------  [2070]
#A._brasilense_Sp7_ipdC     TGATCCTGTT CAACAACGCC AGTTGGGAGA TCGTGCGCAC CTTCCA--GC CCGAATCGGC -CTTCAACGA CCTGGACGAC TGG-------  [2070]
#A._lipoferum_ipdC          TGATCCTGTT CAACAACGCC AGTTGGGAGA TGCTGCGCAC CTTCCA--GC CCGAATCCGC -CTTCAACGA CCTGGACGAC TGGCGGTTCG  [2070]
#Enterobacter_cloacae_ipdC  TTCTGGTGCT CAACAACGAA GGCTACACGG TTGAAAGGGC TATCCATGGG GCGGAGCAGC GGTATAACGA CATTGCTTTG TGGAACTGGA  [2070]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC TTCTGTTGCT GAATAACGAA GGGTATACCG TGGAGCGGGC GATTCATGGC CCTGAGCAGC GCTACAATGA CATCGCCCTG TGGGACTGGC  [2070]

#2_ipdC                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2160]
#3_ipdC                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2160]
#6_ipdC                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2160]
#25_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2160]
#26_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2160]
#27_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2160]
#28_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2160]
#31_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2160]
#32_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2160]
#A._brasilense_Sp7_ipdC     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2160]
#A._lipoferum_ipdC          CCGACATGGC GGCGGGCATG GGCGGCGACG GCGTCCGCGT GCGCACGCGG GCGGAGCTGA AGGCGGCGCT GGACAGCGCC TTCGCCACGC  [2160]
#Enterobacter_cloacae_ipdC  CGCACATTCC ACAGGCGTTG AGCCTCGATC CTCAGTCTGA GTGCTGGCGG GTCAGTGAAG CGGAACAGCT GGCGGACGTA CTTG-AAAAA  [2160]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC AGCGGCTGCC GGAAGCTTTC GCCCCGGACG TTGTTTCTCG CTGCTGGCGG GTCACGCACA CGGCTGAGCT ACGGGAAGCG ATGGCGGAAA  [2160]

#2_ipdC                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2250]
#3_ipdC                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2250]
#6_ipdC                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2250]
#25_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2250]
#26_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2250]
#27_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2250]
#28_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2250]
#31_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2250]
#32_ipdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2250]
#A._brasilense_Sp7_ipdC     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [2250]
#A._lipoferum_ipdC          ACGCCGCGCC CCGGGATTAA GGGCGGGGGG AGGCGCGTAC G [2291]
#Enterobacter_cloacae_ipdC  GAAGCGCGTA ATA------- ---------- ---------- - [2291]
#Klebsiella_pneumoniae_ipdC GAGGAACGAA ACAGCCGCGT TTAG------ ---------- - [2291]
```

Ευθυγράμμιση αμινοξικών ακολουθιών IpdC

```
#2_IpdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#3_IpdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#6_IpdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#25_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#26_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#27_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#28_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#31_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#32_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#A._brasilense_Sp7_IpdC    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#A._lipoferum_IpdC         ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#Enterobacter_cloacae_IpdC MPSGAERKNQ CIRLHLHEKK EHSAAFFVKH SFHALLTTNS GQPSRFFNTQ SEVNVRRTPV MRTPYCVADY LLDRLTDCGA DHLFGVPGDY  [ 90]
#Klebsiella_pneumoniae_IpdC ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- MQPTYTIGDY LLDRLVDCGI DRLFGVPGDY  [ 90]

#2_IpdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -MVNAVAGAY AEKSPVVVIS GAPGTTEGNA GLLLHHQGRT  [180]
#3_IpdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -MVNAVAGAY AEKSPVVVIS GAPGTTEGNA GLLLHHQGRT  [180]
#6_IpdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -MVNAVAGAY AEKSPVVVIS GAPGTTEGNA GLLLHHQGRT  [180]
#25_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -MVNAVAGAY AEKSPVVVIS GAPGTTEGNA GLLLHHQGRT  [180]
#26_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -MVSAVAGAY AEKSPVVVIP GAPGTTEGNA GLLLHHQGRT  [180]
#27_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -MVNAVAGAY AEKSPVVVIS GAPGTTEGNA GLLLHHQGRT  [180]
#28_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -MVNAVAGAY AEKSPVVVIS GAPGTTEGNA GLLLHHQGRT  [180]
#31_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -MVNAVAGAY AEKSPVVVIS GAPGTTEGNA GLLLHHQGRT  [180]
#32_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -MVNAVAGAY AEKSPVVVIS GAPGTTEGNA GLLLHHQGRT  [180]
#A._brasilense_Sp7_IpdC    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -MVNAVAGAY AEKSPIVVIS GAPGTTEGNA GLLLHQGRT  [180]
#A._lipoferum_IpdC         ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -MVNAVAGAY AEKSPVVVIS GAPGTTEGNA GLLLHHQGRT  [180]
#Enterobacter_cloacae_IpdC NLQFLDHVID SPDICWVGCA NELNASYAAD GYARCKGFAA LLTTFGVGEL SAMNGIAGSY AEHVPVLHIV GAPGTAAQQR GELLHH---T  [180]
#Klebsiella_pneumoniae_IpdC NLQFLDRVIA HSALGWVGCA NELNAAYSAD GYARIKGAGA LLTTYGVGEL SALNGIAGSY AEHIPVLHIV GAPSTGAQQR GELLHH---T  [180]

#2_IpdC                    L-DT------ ---------- ---------- ---------- QFQVFK---- EITVAQARLD DPAKAPAEIS RVLGAARALS R-------PV  [270]
#3_IpdC                    L-DT------ ---------- ---------- ---------- QFQVFK---- EITVAQARLD DPAKAPAEIS RVLGAARALS R-------PV  [270]
#6_IpdC                    L-DT------ ---------- ---------- ---------- QFQVFK---- EITVAQARLD DPAKAPAEIA RVLGAARALS R-------PV  [270]
#25_IpdC                   LDTQFQVFKE ITVAQARLDD PAKA------ ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [270]
#26_IpdC                   LGNN------ ---------- --KSSVKRSP SPKPLTTHKP ---------- ---------- ---------- ---------R RRSLVCWGP-  [270]
#27_IpdC                   L-DT------ ---------- ---------- ---------- QFQVFK---- EITVAQARLD DPAKAPAEIA RVLGAARALS R-------PV  [270]
#28_IpdC                   L-DT------ ---------- ---------- ---------- QFQVFK---- EITVAQARLD DPAKAPAEIA RVLGAARALS R-------PV  [270]
#31_IpdC                   L-DT------ ---------- ---------- ---------- QFQVFK---- EITVAQARLD DPAKAPAEIS RVLGAARALS R-------PV  [270]
#32_IpdC                   L-DT------ ---------- ---------- ---------- QFQVFK---- EITVAQARLD DPAKAPADIA RVLGAARALS R-------PV  [270]
#A._brasilense_Sp7_IpdC    L-HT------ ---------- ---------- ---------- QFQVFK---- EITVAQARLD DPAKAPAEIA RVLGAARALS R-------PV  [270]
#A._lipoferum_IpdC         L-DT------ ---------- ---------- ---------- QFQVFK---- EITVAQARLD DPAKAPAEIA RVLGAARALS R-------PV  [270]
#Enterobacter_cloacae_IpdC LGDG------ ---------- ---------- ---------- EFRHFYHMSE PITVAQAVLT E-QNACYEID RVLTTMLRER R-------PG  [270]
#Klebsiella_pneumoniae_IpdC LGDG------ ---------- ---------- ---------- DFRHFARMSE QITCSQALLT A-GNACHEID RVLRDMLTHH R-------PG  [270]
```

```
#2_IpdC                    YLEIPRNMVN ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#3_IpdC                    YLEIPRNMVN ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#6_IpdC                    YLEIPRNMVN ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#25_IpdC                   ----PAEIS- ---------- ---------- -RVLG----- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#26_IpdC                   ----PAPVAP GLSGNPPQHG QRRGRAGGRR PRLAGGPRRA RRLRGRGAGG DALGQIAGAD GLRGGPPLRA GGQGGGAGAT AGRAGGDHLH  [360]
#27_IpdC                   YLEIPRNMVN ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#28_IpdC                   YLEIPRNMVN ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#31_IpdC                   YLEIPRNMVN ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#32_IpdC                   YLEIPRNMVN ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#A._brasilense_Sp7_IpdC    YLEIPRNMAN ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#A._lipoferum_IpdC         YLEIPRNMVN ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#Enterobacter_cloacae_IpdC YLMLPADVAK K--------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#Klebsiella_pneumoniae_IpdC YLMLPADVAR A--------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]

#2_IpdC                    ---------- ---------- ---------- ---------A EVEPVG---D DPAWPVDRDA LAACADEVLA AMRSAKSPVL MVCVEVRRYG  [450]
#3_IpdC                    ---------- ---------- ---------- ---------A EVEPVG---D DPAWPVDRDA LAACADEVLA AMRSAKSPVL MVCVEVRRYG  [450]
#6_IpdC                    ---------- ---------- ---------- ---------A EVEPVG---D DPAWPVDRDA LAACADEVLA AMRSATSPVL MVCVEVRRYG  [450]
#25_IpdC                   ---------- -AARALSRPV YLEIPR---- NMVNAEVEPV GDDPAWP--- ------VDRDA LAACADEVLA AMRSAKSPVL MVCVEVRRYG  [450]
#26_IpdC                   GARPAGRRAD PAARHLHR-- ------RRRRR ---------- GDHPAGRG-- -----VGR-- ---------- ---------- --AVPARRH-  [450]
#27_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------A EVEPVG---D DPAWPVDRDA LAACADEVLA AMRSAKSPVL MVCVEVRRYG  [450]
#28_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------A EVEPVG---D DPAWPVDRDA LAACADEVLA AMRSATSPVL MVCVEVRRYG  [450]
#31_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------A EVEPVG---D DPAWPVDRDA LAACADEVLA AMRSAKSPVL MVCVEVRRYG  [450]
#32_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------A DVEPVG---H HPSWPVDRDA LAACADDVLA EMLSATSPVL MVCVEVRRYG  [450]
#A._brasilense_Sp7_IpdC    ---------- ---------- ---------- ---------A EVEPVG---D DPAWPVDRDA LAPAPDEVLA AMRSATSPVL MVCVEVRRYG  [450]
#A._lipoferum_IpdC         ---------- ---------- ---------- ---------A EVEPVG---D DPAWPVDRDA LAACADEVLA AMRSATSPVL MVCVRSAATG  [450]
#Enterobacter_cloacae_IpdC ---------- ---------- ---------- ---------A ATPPVNALTH KQA-NADSAC LKAFRDAAEN KLAMSKRTAL LADFLVLRHG  [450]
#Klebsiella_pneumoniae_IpdC ---------- ---------- ---------- ---------A AIAPAQRLLV EPA-PADENQ LAGFREHASR LLRGSRRISL LADFLAQRYG  [450]

#2_IpdC                    LEAKVAELAQ RLG---VPVV TTFMGRGLLA DAPTPPLGTY IGVAGDAEIT RLVEESDGLF LLGAILSDTN FAVSQ---RK IDLRKTIHAF  [540]
#3_IpdC                    LEAKVAELAQ RLG---VPVV TTFMGRGLLA DAPTPPLGTY IGVAGDAEIT RLVEESDGLF LLGAILSDTN FAVSQ---RK IDLRKTIHAF  [540]
#6_IpdC                    LEAKVAELAQ RLG---VPVV TTFMGRGLLA DAPTPPLGTY IGVAGDAEIT RLVEESDGLF LLGAILSDTN FAVSQ---RK IDLRKTIHAF  [540]
#25_IpdC                   LEAKVAELAQ R---LGVPVV TTFMGRGLLA DAPTPPLGTY IGVAGDAEIT RLVEESDGLF LLGAILSDTN IAVSQ----- ----------  [540]
#26_IpdC                   --------PQ RHQLRGVP-- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---AQD---- ----------  [540]
#27_IpdC                   LEAKAAELAQ RLG---VPVV TTFMGRGLLA DAPTPPLGTY IGVAGDAEIT RLVEESDGLF LLGAILSDTN FAVSQ---RK IDLRKTIHAF  [540]
#28_IpdC                   LEAKVAELAQ RLG---VPVV TTFMGRGLLA DAPTPPLGTY IGVAGDAEIT RLVEESDGLF LLGAILSDTN FAVSQ---RK IDLRKTIHAF  [540]
#31_IpdC                   LEAKVAELAQ RLG---VPVV TTFTGRGLLA DAPTPPLGTY IGVAGDAEIT RLVEESDGLF LLGAILSDTN FAVSQ---RK IDLRKTIHAF  [540]
#32_IpdC                   LEAKVAELAQ RLG---VPVV TTFMGRGLLA DAPTPPLGTY IGVAGDAEIT RLVEESDGLF LLGAILSDTN FAVSQ---RK IDLRKTIHAF  [540]
#A._brasilense_Sp7_IpdC    LEAKVADVAH GLG---VRSV TTFMGRGLLA DAPTPPLGTY IGVAGDAEIT RLVEESDGLF LLGAILSDTN FAVSQ---RK IDLRKTIHAF  [540]
#A._lipoferum_IpdC         LEAKVAELAQ RLG---VPVV TTFMGRGLLA DAPTPPLGTY IGVAGDAEIT RLVEESDGLF LLGAILSDTN FAVSQ---RK IDLRKTIHAF  [540]
#Enterobacter_cloacae_IpdC LKHALQKVVK EVP---MAHA TMLMGKGIFD ERQAGFYGTY SGSASTGAVK EAIEGADTVL CVGTRFTDT- --LTAGFTHQ LTPAQTIEVQ  [540]
#Klebsiella_pneumoniae_IpdC LQNTLREVVA KTP---IAHA TMLMGKGLFD EQLNGFVGTY SGIASAPQTR EAIENADTII CIGTRFTDT- --ITAGFTQH LAREKTIEIQ  [540]
```

```
#2_IpdC                    DRAVTLGYHT YADIPLDGLV DALLERLPPS DRTTRGKEPH AYPTGLQADG -------EPI AP-------- ---------- ----MDIARA  [630]
#3_IpdC                    DRAVTLGYHT YADIPLDGLV DALLERLPPS DRTTRGKEPH AYPTGLQADG -------EPI AP-------- ---------- ----MDIARA  [630]
#6_IpdC                    DRAVTLGYHT YADIPLDGLV DALLERLPPS DRTTRGKEPH AYPTGLQADG -------EPI AP-------- ---------- ----MDIARA  [630]
#25_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----RKIDPA QDHPR----- ---------- ----------  [630]
#26_IpdC                   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -------R---PA QDHPR----- ---------- ----------  [630]
#27_IpdC                   DRAVTLGYHT YADIPLDGLV DALLERLPPS DRTTRGKEPH AYPTGLQADG -------EPI AP-------- ---------- ----MDIARA  [630]
#28_IpdC                   DRAVTLGYHT YADIPLAGLV DALLERLPPS DRTTRGKEPH AYPTGLQADG -------EPI AP-------- ---------- ----MDIARA  [630]
#31_IpdC                   DRAVTLGYHT YADIPLDGLV DALLERLPPS DRTTRGKEPH AYPTGLQADG -------EPI AP-------- ---------- ----MDIARA  [630]
#32_IpdC                   DRAVTLGYHT YADIPLDGLV DALLERLPPS DRTTRGKEPH AYPTGLQADG -------EPI AP-------- ---------- ----MDIARA  [630]
#A._brasilense_Sp7_IpdC    DRAVTLGYHT YADIPLDGLV DALLERLPPS DRTTRGKEPH AYPTGLQADD -------GPI AP-------- ---------- ----MDIARA  [630]
#A._lipoferum_IpdC         DRAVTLGYHT YADNPLGGLV DALLEWLPRS DRTTRGKEPH AYPTGLQADG ------EPI AP-------- ---------- ----MDIARA  [630]
#Enterobacter_cloacae_IpdC PHAARVGDVW FTGIPMNQAI ETLVELSK-- ---------Q HVHTGLMSSS SGAIPFPQP- --------- --------DG SLTQENFWRT  [630]
#Klebsiella_pneumoniae_IpdC PFAVRVGDHW FSGVPMDQAL AALMTLS--- ---------- ---------- -------APL AAEWAAPQVV APEVEEEGEG ELTQKNFVST  [630]

#2_IpdC                    VNDRVRAGQE PLLIAADMGD CLFTAMDM-- -IDAGLMAPG YYAGMGFGVP AG------IG AQCVS----- ---------- ----------  [720]
#3_IpdC                    VNDRVRAGQE PLLIAADMGD CLFTAMDM-- -IDAGLMAPG YYAGMGFGVP AG------IG AQCVS----- ---------- ----------  [720]
#6_IpdC                    VNDRVRAGQE PLLIAADMGD CLFTAMDM-- -IDAGLMAPG YYAGMGFGVP AG------IG AQCVS----- ---------- ----------  [720]
#25_IpdC                   ----LRPGG- -------DAG- ----LSHYRR ---------- --------HP AGRAGRRAAG AAAAVRPDDP RQGAPRLPHR PSGGRRADRP  [720]
#26_IpdC                   ----LRPGG- -------DAG- ----LSHLRR ---------- --------HP AGRAGRRAAG AAVAVRPDDP RQGAPRLPHR PSGGRRADRP  [720]
#27_IpdC                   VNDRVRAGQE PLLIAADMGD CLFTAMDM-- -IDAGLMAPG YYAGMGFGVP AG------IG AQCVS----- ---------- ----------  [720]
#28_IpdC                   VNDRVRAGQE PLLIAADMGD CLFTAMDM-- -IDAGLMAPG YYAGMGFGVP AG------IG AQCVS----- ---------- ----------  [720]
#31_IpdC                   VNDRVRAGQE PLLIAADMGD CLFTAMDM-- -IDAGLMAPG YYAGMGFGVP AG------IG AQCVS----- ---------- ----------  [720]
#32_IpdC                   VNDRVRAGQE PLLIAADMGD CLFTAMDM-- -IDAGLMAPG YYAGMGFGVP AG------IG AQCVS----- ---------- ----------  [720]
#A._brasilense_Sp7_IpdC    VNDRVRAGQE PLLIAADMGD CLFTAMDM-- -IDAGLMAPG YYAGMGFGVP AG------IG AQCVS----- ---------- ----------  [720]
#A._lipoferum_IpdC         VNDRVRAGQE PLLIAADMGD CLFTAMDM-- -IDAGLMAPG YYAGMGFGVP AG------IG AQCVS----- ---------- ----------  [720]
#Enterobacter_cloacae_IpdC LQTFIRPGD- --IILADQGT SAFGAIDLRL PADVNFIVQP LWGSIGYTLA AA------FG AQTAC----- ---------- ----------  [720]
#Klebsiella_pneumoniae_IpdC VQDALRPGD- --IILADQGT AAFGIAALKL PSEASLIVQP LWGSIGFTLP AA------YG AQTAA----- ---------- ----------  [720]

#2_IpdC                    ---------- --------GG KRILTVVGDG AFQMTGWELG N--------- CRRLGIDPIV ILFNNASWEM LR---TFQ-P ESAFNDLDDW  [810]
#3_IpdC                    ---------- --------GG KRILTVVGDG AFQMTGWELG N--------- CRRLGIDPIV ILFNNASWEM LR---TFQ-P ESAFNDLDDW  [810]
#6_IpdC                    ---------- --------GG KRILTVVGDG AFQMTGWELG N--------- CRRLGIDPIV ILFNNASWEM LR---TFQ-P ESAFNDLDDW  [810]
#25_IpdC                   DGHRPCRQRP RPRRAGTAAD RR-----GHG --RLPVHRHG HDGRRADGAG LLR------- ------GHGL RRASG---- ----------  [810]
#26_IpdC                   DGHRPCRQRP RPRRAGTAAD RR-----GHG --RLPVHRHG HDRRRADGAG LLR------- ------GHGL RRASG----- ----------  [810]
#27_IpdC                   ---------- --------GG KRILTVVGDG AFQMTGWELG N--------- CRRLGIDPIV ILFNNASWEM LR---TFQ-P ESAFNDLDD-  [810]
#28_IpdC                   ---------- --------GG RRILTVVGDG AFQMTGWELG N--------- CRRLGIDPIV ILFNNASWEM LR---TFQ-P ESAFNDLDDW  [810]
#31_IpdC                   ---------- --------GG KRILTVVGDG AFQMTGWELG N--------- CRRLGIDPIV ILFNNASWEM LR---TFQ-P ESAFNDLDDW  [810]
#32_IpdC                   ---------- --------GG KRILTVIGDG AFQMTGWELG N--------- CRRLGIDPIV ILFNNASWEM LR---TFQ-P ESAFNGLDDW  [810]
#A._brasilense_Sp7_IpdC    ---------- --------GG KRILTVVGDG AFQMTGWELG N--------- CRRLGIDPIV ILFNNASWEI VR---TFQ-P ESAFNDLDDW  [810]
#A._lipoferum_IpdC         ---------- --------GG KRILTVVGDG AFQMTGWELG N--------- CRRLGIDPIV ILFNNASWEM LR---TFQ-P ESAFNDLDDW  [810]
#Enterobacter_cloacae_IpdC ---------- --------PN RRVIVLTGDG AAQLTIQELG S--------- MLRDKQHPII LVLNNEGYTV ER---AIHGA EQRYNDIALW  [810]
#Klebsiella_pneumoniae_IpdC ---------- --------AE RRVVLIVGDG AAQLTIQEMG S--------- MLRDKQKPLI LLLNNEGYTV ER---AIHGP EQRYNDIALW  [810]
```

```
#2_IpdC                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [900]
#3_IpdC                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [900]
#6_IpdC                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [900]
#25_IpdC                    HWGAVRVGRQ AHPGGGRRRR LP-----DDR VGAWQLPTPG HRPHRDPVQQ RQLGGAAH-- ---------- ---LP-ARIG LQRPGRL---  [900]
#26_IpdC                    HWGAVRVGRQ AHPDGGRRRR LP-----DDR VGAWQLPTPG HRPHRDPVQQ RQLGDAAH-- ---------- ---LP-ARIG LQRP------  [900]
#27_IpdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [900]
#28_IpdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [900]
#31_IpdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [900]
#32_IpdC                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [900]
#A._brasilense_Sp7_IpdC     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [900]
#A._lipoferum_IpdC          RF-------- --------AD MAAGMGGDGV ----RVRTR- ---------- AELKAALDSA FATRGRFQLI EAMIPRGVL- ---SDTLARF  [900]
#Enterobacter_cloacae_IpdC  NW-------- --------TH IPQALSLDPQ SECWRVSEA- ---------- EQLADVLEKV AHH-ERLSLI EVMLPKADI- ---PPLLGAL  [900]
#Klebsiella_pneumoniae_IpdC DW-------- --------QR LPEAFAPDVV SRCWRVTHT- ---------- AELREAMAES ITS-DTLTLV EVMLPKMDI- ---PDFLRAV  [900]

#2_IpdC                     ---------- --- [913]
#3_IpdC                     ---------- --- [913]
#6_IpdC                     ---------- --- [913]
#25_IpdC                    ---------- --- [913]
#26_IpdC                    ---------- --- [913]
#27_IpdC                    ---------- --- [913]
#28_IpdC                    ---------- --- [913]
#31_IpdC                    ---------- --- [913]
#32_IpdC                    ---------- --- [913]
#A._brasilense_Sp7_IpdC     ---------- --- [913]
#A._lipoferum_IpdC          VQGQKRLHAA PRD [913]
#Enterobacter_cloacae_IpdC  TKALEARN-- --- [913]
#Klebsiella_pneumoniae_IpdC TQALEERNSR V-- [913]
```

Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών *dnaK*

```
#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [  90]
#Rhodospirillum_centenum    ----------  --------AT GAGCAAAGTC ATCGGCATCG ATCTTGGCAC CACGAATTCC TGCGTGGCCA TCATGGAAGG CACGCAGGCC  [  90]
#Xanthobacter_autotrophicus ----------  --------AT GGCCAAGATC ATCGGTATCG ACCTCGGCAC CACCAATTCC TGCGTCGCGG TGATGGAGGG GTCCACCCCG  [  90]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    TGATAAATGG CGGGAAAAGG AAAAATAATC GGTATAGACC TCGGAAACGA AACGAACTCA GTCGTAGCGG TTATGATGGG AGATGAGGCG  [  90]

#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 180]
#Rhodospirillum_centenum    AAGGTGATCG AGAACGCCGA AGGGGCGCGC ACCACCCCGT CGATGGTCGC CTTCACCCAG GGCGGCGAGC GGCTGGTCGG CCAGCCGGCC  [ 180]
#Xanthobacter_autotrophicus AAAGTCATCG AGAACGCCGA GGGCGCGCGC ACCACGCCCT CCATCGTCGC CTTCACGGAG GACGGCGAGC GTCTCGTCGG CCAGCCCGCC  [ 180]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    GTTGTAATTC AGAACCAAGA AGGTTCAAGG CTTACCCCCT CAGTCGTCTC CTGGACTAAG GAAAAGGAGG TTCTCGTAGG AGACCCCGCA  [ 180]

#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 270]
#Rhodospirillum_centenum    AAGCGCCAGG CGGTGACCAA CCCGGAGAAC ACGTTCTTCG CCATCAAGCG CCTGATCGGA CGGCGCTACG ACGATCCCCT GACCCAGAAG  [ 270]
#Xanthobacter_autotrophicus AAGCGCCAGA GCGTCACCAA TCCCGAGCGC ACCTTCTTCG CGGTGAAGCG CCTCATCGGC CGCCGCTACG ACGACCCGAC CGTCGAGAAG  [ 270]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    AAGAGAAGGG CTATCCTTGA CCCCGAAAAT ACGGTATACG AGAGTAAAAG GTTTATAGGG AGGAAGTTTG AAGAGGTAAA GGAAGAGGCA  [ 270]
```

```
#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 360]
#Rhodospirillum_centenum    GACAAGGGGC TGGTCCCCTA CCGGATCGTC GGCGGCAAGA ACGGCGATGC CTGGGTCGAA AGCCACGGCA AGCAGTACAG CCCCAGCGAG  [ 360]
#Xanthobacter_autotrophicus GACAAGCATC TCGTCCCCTA CTCCATCGTG CGCGCCGACA ATGGCGATGC CTGGGTGGAA GCGGACGGCA AGAAGTATTC CCCCTCGCAG  [ 360]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    AAAAAGAGTTT CCTACAAGGT AGTTCCCGAC GAGAAGGGAG ACGCAGCCTT TGATATACCC AATGCTGGAA AGCTCGTAAG ACCCGAGGAG  [ 360]

#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 450]
#Rhodospirillum_centenum    ATCAGCGCCT TCATCCTCCA GAAGATGAAG GAGACGGCGG AGAACTATCT CGGTGAGAAG GTGACCCAGG CGGTCATCAC CGTCCCGGCC  [ 450]
#Xanthobacter_autotrophicus ATCTCCGCCT TCGTCCTGCA GAAGATGAAG GAGACCGCCG AGTCGTTCCT GGGTGAGAAG CTGCAGAAGG CGGTCATCAC CGTCCCGGCC  [ 450]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    GTGGGAGCTC ACGTCCTCAG AAAGCTAAAG GAAGCAGCGG AAGCCTTTTT AGGTGAGCCC GTAAAGAAGG CGGTAATAAC CGTTCCCGCA  [ 450]

#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 540]
#Rhodospirillum_centenum    TACTTCAACG ACAGCCAGCG CCAGGCCACC AAGGACGCCG GCAAGATCGC CGGCCTGGAA GTGCTGCGCA TCATCAACGA GCCGACGGCC  [ 540]
#Xanthobacter_autotrophicus TACTTCAACG ACGCCCAGCG CCAGGCCACC AAGGACGCCG GCCGCATCGC CGGCCTTGAG GTGCTGCGCA TCATCAACGA GCCCACGGCG  [ 540]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    TACTTCAACG AGAGACAAAG ACAGGCAACA AAGGACGCGG GAAAGATTGC AGGTCTTGAG GTAGTGAGGA TACTTAACGA GCCGACCCGT  [ 540]
```

```
#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 630]
#Rhodospirillum_centenum    GCGGCGCTCG CCTACGGCAT GGAGAAGAAG GGCACCGGCA CCATCGCGGT CTACGACCTG GGTGGCGGCA CCTTCGACAT CTCCGTGCTG  [ 630]
#Xanthobacter_autotrophicus GCGGCGCTGG CCTATGGCCT CGACAAGAAG TCGGCCGGCA CCATCGCGGT GTACGACCTC GGCGGCGGCA CCTTCGACGT GTCGGTGCTG  [ 630]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    GCCGCAATGG CTTACGGACT CCACAAGAAG GAAAACGTAA GGATACTTGT TTATGACTTC GGTGGCGGAA CCTTTGACGT CTCAATACTT  [ 630]

#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 720]
#Rhodospirillum_centenum    GAGATCGGCG ACGGCGTGTT CGAGGTGAAG TCCACCAACG GCGACACCTT CCTGGGCGGC GAGGACTTCG ACGCCAAGAT CATCGACTAC  [ 720]
#Xanthobacter_autotrophicus GAGATCGGCG ACGGCGTGTT CGAGGTGAAG TCCACCAACG GCGACACCTT CCTCGGCGGT GAAGACTTCG ACATGCGGCT CGTCACCTAT  [ 720]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    GAAGGCGGAG ACGGTGTTAT AGAGGTTAAG GCGACCGCGG GAGATACCCA CCTCGGTGGA GCTAACATAG ACGAGAGGAT AATGGAATGG  [ 720]

#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 810]
#Rhodospirillum_centenum    CTCGCCGAGG AGTTCCAGAA GGAGCAGGGC ATCGACCTGC GCAAGGACCG GCTCGCGCTG CAGCGCCTCA AGGAGGCTGC GGAGAAGGCG  [ 810]
#Xanthobacter_autotrophicus CTGGCGGACG AGTTCAAGAA GGAGCAGGGC ATCGACCTGC GCAACGACAA GCTGGCCCTC CAGCGCCTCA AGGAGGCCGC CGAGAAGGCG  [ 810]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    CTCATTGAAG AGTTCAAAAA GGAACACGGC ATAGACCTCA GGCAGGACAG AACCGCACTC CAAAGGCTGA AGGAAGCAGC GGAACAGGCT  [ 810]
```

```
#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 900]
#Rhodospirillum_centenum    AAGATCGAGC TGTCCGCGTC CATGCAGACC GAGGTCAACC TGCCCTTCAT CACGG----- -CCGACGCCT CCGGGCCGAA GCACCTGAAC  [ 900]
#Xanthobacter_autotrophicus AAGATCGAGC TGTCGAGCGC GACCCAGACC GAGATCAACC TGCCCTTCAT TACCG----- -CCGATGCCA CGGGCCCGAA GCATCTCACG  [ 900]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    AAGAAGGAGC TTTCCTTCAA GATGGAGACC GAGATAAACC TACCCTTCAT AACGATAGAC CCCAATACGA ACCAGCCCCT TCACCTCCAA  [ 900]

#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 990]
#Rhodospirillum_centenum    ATCAAGCTGA CCCGGTCCAA GCTGGAAGCC CTGGTGGACG ATCTGGTCCG CCGCACGATC GAGCCCTGCA AGGCGGCGCT CAAGGACGCC  [ 990]
#Xanthobacter_autotrophicus CTGAAGCTCA CCCGCGCCAA GTTCGAGGCG CTGGTGGACG ACCTCATCCA GCGCACGGTG GAGCCCTGCC GGCTCGCGCT CAAGGATGCC  [ 990]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    AAGAAGCTAA CAAGGGCAAG ACTTGAGGAA ATGATAAATG ACCTCATAGA CAGGACCATA GACATAGTCA AACAAGCTCT TGAAGATGCT  [ 990]

#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1080]
#Rhodospirillum_centenum    GGCCTGAAGG CCAGCGAGAT CGACGAGGTG ATCCTGGTCG GCGGCATGAC CCGCATGCCC AAGATCATCG AGACGGTGAA GCAGTTCTTC  [1080]
#Xanthobacter_autotrophicus GGCCTCACCG CCGGGCAGAT CGACGAGGTG GTCCTCGTCG GCGGCATGAC CCGCATGCCC AAGGTGCAGG AAGTGGTGAA GCAGTTCTTC  [1080]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    AACGTAAAGC CCTCGGATAT AGACGAAGTG GTTCTCGTCG GAGGTTCAAC GAGAATACCC CTCGTTCAAC AAAAGATTAA GGAATTCTTC  [1080]
```

```
#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1170]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1170]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1170]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1170]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1170]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1170]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1170]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1170]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1170]
#Rhodospirillum_centenum    GGGCGCGAGC CGCACCGCGG CGTGAACCCG GACGAGGTGG TCGCCGTCGG CGCCGCCATC CAGGGCGGCG TGCTGAAGGG CGAGGTGAAG  [1170]
#Xanthobacter_autotrophicus GGCAAGGAGC CCCACAAGGG CGTCAACCCG GACGAAGTGG TCGCCATCGG CGCCGCGGTC CAGGGCCGGCG TGCTCCAGGG CGACGTGAAG  [1170]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    GGAAAGGAAC CCCACAAGGG ATTAAATCCC GACGAAGTTG TCGCAATGGG AGCGGCAATA CAGGGCGGGCG TCCTTGCGGG AGAAGTAAAG  [1170]

#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1260]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1260]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1260]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1260]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1260]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1260]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1260]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1260]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1260]
#Rhodospirillum_centenum    GATGTCCTGC TGCTGGACGT CACTCCGCTG TCGCTGGGCA TCGAGACGCT GGGCGGCGTC TTCACCCGGC TGATCGACCG CAACACCACG  [1260]
#Xanthobacter_autotrophicus GACGTGCTGC TGCTCGAACGT GACCCCGCTG TCCCTGGGCA TCGAGACCCT GGGCGGCGTG TTCACCCGGC TCATCGACCG CAACACCACC  [1260]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    GAAATTGTTC TCGTAGACGT AACACCGCTA GAATTGGGAG TAGAGACCTA CGGAGGCGTT ATGACCGTTC TTATACCCAG GAACACACCC  [1260]

#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1350]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1350]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1350]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1350]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1350]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1350]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1350]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1350]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1350]
#Rhodospirillum_centenum    ATCCCGACCA AGAAGTCCCA GGTCTTCTCC ACCGCCGAGG ACAACCAGAC GGCGGTGACC ATCCGCGTCT TCCAGGGCGA GCGCGAGATG  [1350]
#Xanthobacter_autotrophicus ATCCCGACGA AGAAGAGCCA GACCTTCTCC ACCGCCGAGG ATGGCCAGAC CGCGGTGACC ATCCGCGTGT TCCAGGGCGA GCGCGAGATG  [1350]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    ATACCCGTAA AGAAGTCCAA GGTATTCACG ACAGCCCACG ACTACCAGAC CGAGGTTGAG ATACACGTCC TCCATGGAGA GAGACCCCTC  [1350]
```

```
#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1440]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1440]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1440]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1440]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1440]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1440]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1440]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1440]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1440]
#Rhodospirillum_centenum    GCGGCCGACA ACAAGATGCT CGGCCAGTTC GACCTGATGG GCATTCCGTC CGCCCCGCGC GGCGTGCCGC AGATCGAGGT CACCTTCGAC  [1440]
#Xanthobacter_autotrophicus GCGGCGGACA ACAAGATGCT CGGCCAGTTC GACCTCATGG GCATCCCGCC CGCGCCCCGC GGCGTGCCGC AGGTGGAGGT GACCTTCGAC  [1440]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    GCAAAGGATA ACAAATCCCT TGCAAAGTTC TATCTTACTG GAATACCTCC CGCACCGAGA GGCGTTCCAA AAATAGAGGT TTGCTTTGAC  [1440]

#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -AAGGAGCAG CAGATCCGCA TCCAGGCCTC GGGCGGCCTG  [1530]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -AAGGAGCAG CAGATCCGCA TCCAGGCGTC GGGCGGCCTG  [1530]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- TAAGGAGCAG CAGATCCGCA TCCAGGCGTC GGGCGGCCTG  [1530]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- TAAGGAGCAG CAGATCCGCA TCCAGGCGTC GGGCGGCCTG  [1530]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -AAGGAGCAG CAGATCCGCA TCCAGGCGTC GGGCGGCCTG  [1530]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -AAGGAGCAG CAGATCCGCA TCCAGGCGTC GGGCGGCCTG  [1530]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -AAGGAGCAG CAGATCCGCA TCCAGGCGTC GGGCGGCCTG  [1530]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -AAGGAGCAG CAGATCCGCA TCCAG-CGTC GGGCGGCCTG  [1530]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -AAGGAGCAG CAGATCCGCA TCCAGGCCTC GGGCGGCCTG  [1530]
#Rhodospirillum_centenum    ATCGACGCCA ACGGCATCGT CAAGGTCTCG GCCAAGGACA AGGCCACCGG CAAGGAGCAG ACGATCCGCA TCCAGGCCTC GGGCGGCCTG  [1530]
#Xanthobacter_autotrophicus ATCGACGCCA ACGGCATCGT GCAGGTCTCC GCCAAGGACA AGGGCACCGG CAAGGAGCAG CAGATCCGCA TCCAGGCCTC GGGCGGCCTG  [1530]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    ATAGACGCGG ACGGAATACT CCACGTTACA GCTAAGGACC TCGGAACGGG TAAAGAGCAG TCCGTAAGAG TAGAGATATC CTCGGGACTC  [1530]

#1_dnaK                     TCGGACGCCG ACATCCAGAA GATGGTGAAG GACGCGGAGG CC-CATTCGG CCGACGACAA GAAGCGCCGT GAGCTGGTCG ACGCCCGCAA  [1620]
#3_dnaK                     TCGGACGCCG ACATCAACAA GATGGTGAAG GACGCCGAGG CC-CACGCCG CCGGCGACAA GAAGCGGCGT GAACTGGTGG ATGCCCGCAA  [1620]
#4_dnaK                     TCGGACGCCG ACATCAACGA GATGGTGAAG GACGCCGAGG CC-CACGCCG CCGACGACAA GAAGCGGCGT GAGCTGGTGG ATGCCCGCAA  [1620]
#6_dnaK                     TCGGACGCCG ACATCAACAA GATGGTGAAG GACGCCGAGG CC-CACGCCG CCGACGACAA GAAGCGGCGT GAGCTGGTGG ATGCCCGCAA  [1620]
#25_dnaK                    TCGGACGCCG ACATCAACAA GATGGTGAAG GACGCCGAGG CC-CACGCCG CCGACGACAA GAAGCGGCGT GAACTGGTGG ATGCCCGCAA  [1620]
#26_dnaK                    TCGGACGCCG ACATCAACAA GATGGTGAAG GACGCCGAGG CC-CACGCCG CCGACGACAA GAAGCGGCGT GAACTGGTGG ATGCCCGCAA  [1620]
#28_dnaK                    TCGGACGCCG ACATCAACAA GATGGTGAAG GACGCCGAAG CC-CACGCCG CGGACGACAA GAAGCGGCGC GAGCTGGTCG ACGCCCGCAA  [1620]
#A._brasilense_LMG_dnaK     TCGGACGCCG ACATCAACAA GATGGTGAAG GACGCCGAGG CC-CACGCCG CCGACGACAA GAAGCGCCGC GAGCTGGTGG ACGCCCGCAA  [1620]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      TCGGACGCCG ACATCCAGAA GATGGTGAAG GATGCCGAGG CC-CACTCGG CCGACGACAA GAAGCGCCGC GAGCTGGTCG ACGCCCGCAA  [1620]
#Rhodospirillum_centenum    TCGGACGCCG ACATCGACCG CATGGTCAAG GATGCCGAGG CG-CACGCCG CCGAGGACAA GAAGCGGCGT GAGCTGGTCG AGGCGCGGAA  [1620]
#Xanthobacter_autotrophicus AATGACGCCG ACATCGAGAA GATGGTGAAG GACGCCGAGG CC-CACGCGG CCGAGGACAA GAAGCGCCGG GCCCTGGTGG AAGCCAAGAA  [1620]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    ACACCAGAAG AGATAGAAAG GATAATAAAA GAGGCGGAAG AGACACGC-G AAGAAGACAG GAAGAAGAAG GAGCTCATAG AGGCTAAGAA  [1620]
```

```
#1_dnaK                     CCATGCCGAC GCCCTGATCC ACACCACCGA GCGGACCATC AAGGAGAACG GCGACAAGAT CCCGGCCTCC GACAAGACCG CCGCGGAAGC  [1710]
#3_dnaK                     CCATGCGGAC GCGCTGATCC ACACGACCGA GCGGACGATC AAGGAGAACG CCGATAAGAT CCCCGCCGCC GACAAGACCG CCGCGGAGGC  [1710]
#4_dnaK                     CCATGCGGAC GCGCTGATCC ACACGACCGA GCGGACGATC AAGGAGAACG CCGACAAGAT CCCCGCCGCC GACAAGACCG CCGCGGAGGC  [1710]
#6_dnaK                     CCATGCGGAC GCGCTGATCC ACACGACCGA GCGGACGATC AAGGAGAACG CCGACGAGAT CCCCGCCGCC GACAAGACCG CCGCGGAGGC  [1710]
#25_dnaK                    CCATGCGGAC GCGCTGATCC ACACGACCGA GCGGACGATC AAGGAGAACG CCGATAAGAT CCCCGCCGCC GACAAGACCG CCGCGGAGGC  [1710]
#26_dnaK                    CCATGCGGAC GCGCTGATCC ACACGACCGA GCGGACGATC AAGGAGAACG CCGATAAGAT CCCCGCCGCC GACAAGACCG CCGCGGAGGC  [1710]
#28_dnaK                    CCACGCCGAT GCCCTGATCC ACACCACCGA GCGGACGATC AAGGAGAACG GCGACAAGAT CCCCGCCGCC GACAAGACCG CCGCGGAGGC  [1710]
#A._brasilense_LMG_dnaK     CCACGCGGAC GCGCTGATCC ATACCACCGA GCGGACGATC AAGGAGAACG GCGACAAGAT CCCCGCCGCC GACAAGACCG CCGCCGAGGC  [1710]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      CCATGCCGAC GCCCTGATCC ACACCACCGA GCGGACCATC AAGGAGAACG GCGACAAGAT CCCGGCCTCC GACAAGACCG CCGCGGAGGC  [1710]
#Rhodospirillum_centenum    CCAGGCCGAC GGCCTGATCC ACACCACCGA GCGCACCCTG TCCGAGAACG GCGACAAGCT GCCGGGGGCG GAGAAGTCCG CCGCCGAGGC  [1710]
#Xanthobacter_autotrophicus CCACGCGGAA GCCCTCGTCC ACTCCACCGA GAAGGCCGTC GCGGAGCATG GCGACAAGGT CGGCGCGGTG GAGAAGGGCG CCATCGAGGC  [1710]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    CCAACTTGAC CACCTCGTTT ACCAACTTGA AAAGACCCTA AAAGAAGCGG GGGATAAAGT TCCCGCGGAT GTAAAGCAGG AAGCGGAAAA  [1710]

#1_dnaK                     TGCCGTCGCC GAGCTGTAGT CGGTGCTGGA --CAGCGA-G GATCTGGACG GCATCAAGGC GAAGACCGAC GCGCTGGCCC AGGTTCCGAT  [1800]
#3_dnaK                     CGCCGTGGCC GAGTTGAAGT CGGTGATGGA --CGGCGA-G GACCTGGAGG CCGTGAAGGC GAAGACCGAG GCGCTGGCCC AGGTGTCGAT  [1800]
#4_dnaK                     CGCCGTGGCC GAGTTGAAGT CGGTGATGGA --CGGCGA-G GACCTGGAGG CCGTGAAGGC GAAGACCGAG GCGCTGGCCC AGGTGTCGAT  [1800]
#6_dnaK                     CGCCGTGGCC GAGTTGAAGT CGGTGATGGA --CGGCGA-G GACCTGGAGG CCGTGAAGGC GAAGACCGAG GCGCTGGCCC AGGTGTCGAT  [1800]
#25_dnaK                    CGCCGTGGCC GAGTTGAAGT CGGTGATGGA --CGGCGA-G GACCTGGAGG CCGTGAAGGC GAAGACCGAG GCGCTGGCCC AGGTGTCGAT  [1800]
#26_dnaK                    CGCCGTGGCC GAGTTGAAGT CGGTGATGGA --CGGCGA-G GACCTGGAGG CCGTGAAGGC GAAGACCGAG GCGCTGGCCC AGGTGTCGAT  [1800]
#28_dnaK                    CGCCGTGGCC GAGCTGAAGT CGGTCATGGA --CGGCGA-G GACCTGGAGG CCGTGAAGGC GAAGACCGAG GCTCTGGCCC AGGTGTCGAT  [1800]
#A._brasilense_LMG_dnaK     CGCCGTGGCC GAGCTGAAGT CGGTGCTGGA --CGGCGA-G GATCTGGAGG CCGTGAAGGC GAAAACCGAG GCGCTGGCCC AGGTGTCGAT  [1800]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      TGCCGTCACC GAGCTGAAGT CGGTGCTGGA --CAGCGA-G GATCTGGAAG GCATCAAGGC GAAGACCGAA GCGCTGGCCC AGGTTTCGAT  [1800]
#Rhodospirillum_centenum    CGCCATCGCC GAGCTGCGCA CGGCCATGGC --CGCCGA-C GATGTCGCCG ACATCAAGGC GAAGACCGAC GCCCTGGCCC AGGCCTCCAT  [1800]
#Xanthobacter_autotrophicus GGCCCTGGCG GATCTCAAGT CGACGCTGGA --AGGCGA-T GACGTGGAGG CCATCACGGC CAAGACCAAC ACCCTGGCCC AGGCCTCCCT  [1800]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    GGTTATTGAA GAGGCGAAGA AAACCATAGA AACCGCAACG GATATAAACG AAGCAAAAG- AGTTACAGAA AGAGTTCTCC AGGTATCCTC  [1800]

#1_dnaK                     GAAGCTCGGC GAGGCCATGT AC-------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1890]
#3_dnaK                     GAAGCTCGGC GAGGCCATGT AC-------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1890]
#4_dnaK                     GAAGCTCGGC GAGGCCATGT AC-------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1890]
#6_dnaK                     GAAGCTCGGC GAGGCCATGT AC-------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1890]
#25_dnaK                    GAAGCTCGGC GAGGCCATGT AC-------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1890]
#26_dnaK                    GAAGCTCGGC GAGGCCATGT AC-------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1890]
#28_dnaK                    GAAGCTCGGC GAGGCCATGT AC-------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1890]
#A._brasilense_LMG_dnaK     GAAGCTCGGC GAGGCCATGT AC-------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1890]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      GAAGCTCGGC GAGGCCATGT AC-------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1890]
#Rhodospirillum_centenum    GAAGCTGGGG GAGGCCCTCT ACAAGGCCGG CCAGGAGACG GGCGGTCCGG GCGCCCCCGG CGGCGACTCC GGTGCGTCCG AGGCCGGCGG  [1890]
#Xanthobacter_autotrophicus CAAGCTCGGC GAGGCCATGT ATGCGGCCCA GCAGCCGGGT GCCGAGGGCG CCGCCAAGCC GGCGGACGAC GTGGTGGACG CCGAGTTCAC  [1890]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    AAAGCTCGGA ACAACCCTTT AC-------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [1890]

#1_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- - [1951]
#3_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- - [1951]
#4_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- - [1951]
#6_dnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- - [1951]
#25_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- - [1951]
#26_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- - [1951]
#28_dnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- - [1951]
#A._brasilense_LMG_dnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- - [1951]
#A._lipoferum_LMG_dnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- - [1951]
#Rhodospirillum_centenum    CGAGAAGGTG GTCGATGCCG ACTTCGAGGA GGTCGACGAC GACCGCAAGA AGTCCGCGTG A [1951]
#Xanthobacter_autotrophicus CGAGGTCGAC GACGACAAGA AGAAGTCGGC GTGA------ ---------- ---------- - [1951]
#Aquifex_pyrophilus_dnaK    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- - [1951]
```

Ευθυγράμμιση αμινοξικών ακολουθιών DnaK

```
#1_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#3_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#4_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#6_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#25_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#26_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#28_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#A._brasilense_LMG_DnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#A._lipoferum_LMG_DnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [ 90]
#Rhodospirillum_centenum    ---MSKVIGI DLG-TTNSCV AIMEGTQAKV IENAEGARTT PSMVAFTQGG ERLVGQPAKR QAVTNPENTF FAIKRLIGRR YDDPLTQKDK  [ 90]
#Xanthobacter_autotrophicus ---MAKIIGI DLG-TTNSCV AVMEGSTPKV IENAEGARTT PSIVAFTEDG ERLVGQPAKR QSVTNPERTF FAVKRLIGRR YDDPTVEKDK  [ 90]
#Aquifex_pyrophilus_DnaK    MAGKGKIIGI DLGNETNSVV AVMMGDEAVV IQNQEGSRLT PSVVSWTKEK EVLVGDPAKR RAILDPENTV YESKRFIGRK FEEVKEEAKR  [ 90]

#1_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [180]
#3_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [180]
#4_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [180]
#6_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [180]
#25_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [180]
#26_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [180]
#28_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [180]
#A._brasilense_LMG_DnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [180]
#A._lipoferum_LMG_DnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [180]
#Rhodospirillum_centenum    GLVPYRIVGG KNGDAWVES- -HGKQYSPSE ISAFILQKMK ETAENYLGEK VTQAVITVPA YFNDSQRQAT KDAGKIAGLE VLRIINEPTA  [180]
#Xanthobacter_autotrophicus HLVPYSIVRA DNGDAWVEA- -DGKKYSPSQ ISAFVLQKMK ETAESFLGEK VEKAVITVPA YFNDAQRQAT KDAGRIAGLE VLRIINEPTA  [180]
#Aquifex_pyrophilus_DnaK    --VSYKVVPD EKGDAAFDIP NAGKLVRPEE VGAHVLRKLK EAAEAFLGEP VKKAVITVPA YFNERQRQAT KDAGKIAGLE VVRILNEPTR  [180]

#1_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [270]
#3_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [270]
#4_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [270]
#6_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [270]
#25_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [270]
#26_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [270]
#28_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [270]
#A._brasilense_LMG_DnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [270]
#A._lipoferum_LMG_DnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [270]
#Rhodospirillum_centenum    AALAYGMEKK GTGTIAVYDL GGGTFDISVL EIGDGVFEVK STNGDTFLGG EDFDAKIIDY LAEEFQKEQG IDLRKDRLAL QRLKEAAEKA  [270]
#Xanthobacter_autotrophicus AALAYGLDKK SAGTIAVYDL GGGTFDVSVL EIGDGVFEVK STNGDTFLGG EDFDMRLVTY LADEFKKEQG IDLRNDKLAL QRLKEAAEKA  [270]
#Aquifex_pyrophilus_DnaK    AAMAYGLHKK ENVRILVYDF GGGTFDVSIL EGGDGVIEVK ATAGDTHLGG ANIDERIMEV LIEEFKKEHG IDLRQDRTAL QRLKEAAEQA  [270]
```

```
#1_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#3_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#4_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#6_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#25_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#26_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#28_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#A._brasilense_LMG_DnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#A._lipoferum_LMG_DnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [360]
#Rhodospirillum_centenum    KIELSASMQT EVNLPFITAD A--SGPKHLN IKLTRSKLEA LVDDLVRRTI EPCKAALKDA GLKASEIDEV ILVGGMTRMP KIIETVKQFF  [360]
#Xanthobacter_autotrophicus KIELSSATQT EINLPFITAD A--TGPKHLT LKLTRAKFEA LVDDLIQRTV EPCRLALKDA GLTAGQIDEV VLVGGMTRMP KVQEVVKQFF  [360]
#Aquifex_pyrophilus_DnaK    KKELSFKMET EINLPFITID PNTNQPLHLQ KKLTRARLEE MINDLIDRTI DIVKQALEDA NVKPSDIDEV VLVGGSTRIP LVQQKIKEFF  [360]

#1_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [450]
#3_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [450]
#4_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [450]
#6_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [450]
#25_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [450]
#26_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [450]
#28_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [450]
#A._brasilense_LMG_DnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [450]
#A._lipoferum_LMG_DnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [450]
#Rhodospirillum_centenum    GREPHRGVNP DEVVAVGAAI QGGVLKGEVK DVLLLDVTPL SLGIETLGGV FTRLIDRNTT IPTKKSQVFS TAEDNQTAVT IRVFQGEREM  [450]
#Xanthobacter_autotrophicus GKEPHKGVNP DEVVAIGAAV QAGVLQGDVK DVLLLDVTPL SLGIETLGGV FTRLIDRNTT IPTKKSQTFS TAEDGQTAVT IRVFQGEREM  [450]
#Aquifex_pyrophilus_DnaK    GKEPHKGLNP DEVVAMGAAI QAGVLAGEVK EIVLVDVTPL ELGVETYGGV MTVLIPRNTP IPVKKSKVFT TAHDYQTEVE IHVLHGERPL  [450]

#1_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -------MVK DAEAHSADDK KRRELVDARN  [540]
#3_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -------MVK DAEAHAAGDK KRRELVDARN  [540]
#4_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -------MVK DAEAHAADDK KRRELVDARN  [540]
#6_DnaK                     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -------MVK DAEAHAADDK KRRELVDARN  [540]
#25_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -------MVK DAEAHAADDK KRRELVDARN  [540]
#26_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -------MVK DAEAHAADDK KRRELVDARN  [540]
#28_DnaK                    ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -------MVK DAEAHAADDK KRRELVDARN  [540]
#A._brasilense_LMG_DnaK     ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -------MVK DAEAHAADDK KRRELVDARN  [540]
#A._lipoferum_LMG_DnaK      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -------MVK DAEAHSADDK KRRELVDARN  [540]
#Rhodospirillum_centenum    AADNKMLGQF DLMGIPSAPR GVPQIEVTFD IDANGIVNVS AKDKATGKEQ TIRIQASGGL SDADIDRMVK DAEAHAAEDK KRRELVEARN  [540]
#Xanthobacter_autotrophicus AADNKMLGQF DLMGIPPAPR GVPQVEVTFD IDANGIVQVS AKDKGTGKEQ QIRIQASGGL NDADIEKMVK DAEAHAAEDK KRRALVEAKN  [540]
#Aquifex_pyrophilus_DnaK    AKDNKSLAKF YLTGIPPAPR GVPKIEVCFD IDADGILHVT AKDLGTGKEQ SVRVEISSGL TPEEIERIIK EAEETREEDR KKKELIEAKN  [540]
```

```
#1_DnaK                     HADALIHTTE RTIKENGDKI PASDKTAAEA AVAEL----- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  [630]
#3_DnaK                     HADALIHTTE RTIKENADKI PAADKTAAEA AVAELKSVMD -GEDLEAVKA KTEALAQVSM KLGEAMY--- ---------- ----------  [630]
#4_DnaK                     HADALIHTTE RTIKENADKI PAADKTAAEA AVAELKSVMD -GEDLEAVKA KTEALAQVSM KLGEAMY--- ---------- ----------  [630]
#6_DnaK                     HADALIHTTE RTIKENADKI PAADKTAAEA AVAELKSVMD -GEDLEAVKA KTEALAQVSM KLGEAMY--- ---------- ----------  [630]
#25_DnaK                    HADALIHTTE RTIKENADKI PAADKTAAEA AVAELKSVMD -GEDLEAVKA KTEALAQVSM KLGEAMY--- ---------- ----------  [630]
#26_DnaK                    HADALIHTTE RTIKENADKI PAADKTAAEA AVAELKSVMD -GEDLEAVKA KTEALAQVSM KLGEAMY--- ---------- ----------  [630]
#28_DnaK                    HADALIHTTE RTIKENGDKI PAADKTAAEA AVAELKSVMD -GEDLEAVKA KTEALAQVSM KLGEAMY--- ---------- ----------  [630]
#A._brasilense_LMG_DnaK     HADALIHTTE RTIKENGDKI PAADKTAAEA AVAELKSVLD -GEDLEAVKA KTEALAQVSM KLGEAMY--- ---------- ----------  [630]
#A._lipoferum_LMG_DnaK      HADALIHTTE RTIKENGDKI PASDKTAAEA AVTELKSVLD -SEDLEGIKA KTEALAQVSM KLGEAMY--- ---------- ----------  [630]
#Rhodospirillum_centenum    QADGLIHTTE RTLSENGDKI PGAEKSAAEA AIAELKTAMA -ADDVADIKA KTDALAQASM KLGEALYKAG QETGGPGAPG GDSGASEAGG  [630]
#Xanthobacter_autotrophicus HAEALVHSTE KAVAEHGDKV GAVEKGAIEA ALADLKSTLE -GDDVEAITA KTNTLAQASL KLGEAMYAAQ QP-------- -GAEGAAKPA  [630]
#Aquifex_pyrophilus_DnaK    QLDHLVYQLE KTLKEAGDKV PADVKQEAEK VIEEAKKTIE TATDINEAKE LQKEFSR--- ------YPQS SEQPF----- ----------  [630]

#1_DnaK                     ---------- --------- [649]
#3_DnaK                     ---------- --------- [649]
#4_DnaK                     ---------- --------- [649]
#6_DnaK                     ---------- --------- [649]
#25_DnaK                    ---------- --------- [649]
#26_DnaK                    ---------- --------- [649]
#28_DnaK                    ---------- --------- [649]
#A._brasilense_LMG_DnaK     ---------- --------- [649]
#A._lipoferum_LMG_DnaK      ---------- --------- [649]
#Rhodospirillum_centenum    EKVVDADFEE VDDDRKKSA [649]
#Xanthobacter_autotrophicus DDVVDAEFTE VDDDKKKSA [649]
#Aquifex_pyrophilus_DnaK    ---------- --------- [649]
```

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Διαμαντίδης Γ. 1994. Εισαγωγή στην βιοχημεία (2η έκδοση). University Studio Press. Θεσσαλονίκη.

Ευθυμίου Γ., Μερτζάνης Α., Σαπουντζής Μ. & Ζακυνθινός Γ. 2005. Ανθρωπογενείς επιδράσεις στο δέλτα του π. Σπερχειού-μέτρα προστασίας, ανάδειξης και διαχείρισης των φυσικών οικοσυστημάτων. HELECO ’05. ΤΕΕ. Αθήνα.

Κεφαλογιάννη Η. 2008. Οικο-φυσιολογική μελέτη βακτηρίων του γένους *Azospirillum*. Διδακτορική διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Κοράκης Γ. & Αθανασιάδης Ν. 2006. Η βλάστηση των δασών ανατολικού πλατάνου (*Platanus orientalis* L.) στο όρος Πάικο. Δασική Έρευνα 19: 59-68.

Τζάμος Ε. 2004. Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Α. Σταμούλης. Αθήνα.

Φωτιάδης Γ. 2005. Χαρακτηριστικά στοιχεία της βλάστησης και της χλωρίδας του Πηλίου. Ελληνική εταιρεία εθνοφαρμακολογίας. Πρακτικά Επιστημονικής Διημερίδας: Το Ελληνικό Φασκόμηλο. Ζαγορά Πηλίου.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215**:**403-410.

An Q., Dong Y., Wang W., Li Y. & Li J. 2007. Constitutive expression of the *nifA* gene activates associative nitrogen fixation of *Enterobacter gergoviae* 57-7, an opportunistic endophytic diazotroph. J. Appl. Microbiol. 103: 613-620.

Baca B.E. & Elmerich C. 2007. Microbial Production of Plant Hormones. In: Elmerich C. & Newton W.E. (eds.), Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. 113-143.

Baldani J.I. & Baldani V.L.D. 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. An. Acad. Bras. Cienc. 77(3): 549-579.

Baldani J.I., Krieg N.R., Baldani V.L.D., Hartmann A. & Döbereiner J. 2005. Genus II *Azospirillum* Tarrand, Krieg and Döbereiner 1979, 978. In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 2, part C, Springer-Verlag, New York. 7-26.

Bally R. & Elmerich C. 2007. Biocontrol of Plant Diseases by Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria. In: Elmerich C. & Newton W.E. (eds.), Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. 171-190.

Barassi C.A., Sueldo R.J., Creus C.M., Carrozzi L.E., Casanovas E.M. & Pereyra M.A. 2007. *Azospirillum* spp., a dynamic soil bacterium favourable to vegetable crop production. Dynamic Soil, Dynamic Plant 1(2): 68-82.

Bashan Y. & Holguin G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Can. J. Microbiol. 43: 103-121.

Bazylinski D.A., Dean A.J., Schüler D., Phillips E.J.P. & Lovley D.R. 2000. N2-dependent growth and nitrogenase activity in the metal-metabolizing bacteria, *Geobacter* and *Magnetospirillum* species. Environ. Microbiol. 2(3): 266-273.

Becking J.H. 2006a. The Genus *Beijerinckia*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 5, Springer-Verlag, New York. 151-162.

Becking J.H. 2006b. The Genus *Derxia*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 5, Springer-Verlag, New York. 751-757.

Ben Dekhil S., Cahill M., Stackebrandt E. & Sly L.I. 1997. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largimobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol .20: 72-77.

Betancourt D.A., Loveless T.M., Brown J.W. & Bishop P.E. 2008. Characterization of diazotrophs containing Mo-independent nitrogenases, isolated from diverse natural environments. Appl. Environ. Microbiol. 74(11): 3471-3480.

Bhattacharjee R.B. & Singh A. 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80: 199-209.

Bezdicek D.F. & Kennedy A.C. 1998. In: Lynch J.M. & Hobbie J.E. (eds.), Microorganisms in Action. Blackwell Scientific Publications.

Bowman J. 2005. Genus V. *Methylomonas* (Whittenburry and Krieg 1984a, 260). In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 2, part B, Springer-Verlag, New York. 265-268.

Bowman J. 2006. The Methanotrophs-The Families Methylococcaceae and Methylocystaceae. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 5, Springer-Verlag, New York. 266-289.

Brenner D.J & Farmer J.J. 2005. Family I. Enterobacteriaceae Rahn 1937. In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 2, part B, Springer-Verlag, New York. 587-607.

Busse H. & Stolz A. 2006. *Achromobacter*, *Alcaligenes* and Related Genera. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 5, Springer-Verlag, New York. 675-700.

Cápiro N.L, Da Silva M.L., Stafford B.P., Rixey W.G. &. Alvarez P.J.J 2008. Microbial community response to a release of neat ethanol onto residual hydrocarbons in a pilot-scale aquifer tank. Environ. Microbiol. 10: 2236-2244.

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

Compant S., Duffy B., Nowak J., Clèment C. & Barka E.A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4951–4959.

Criminger J.D., Hazen T.H., Sobecky P.A. & Lovell C.R. 2007. Nitrogen fixation by *Vibrio parahaemolyticus* and its implications for a new ecological niche. Appl. Environ. Microbiol. 73(18): 5959-5961.

Deacon J. 2000. The Microbial World: The Nitrogen cycle and Nitrogen fixation. Institute of Cell and Molecular Biology. The Univerity of Edinburgh.

Ding Y., Wang J., Liu Y. & Chen S. 2005. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. J. Appl. Microbiol. 99: 1271-1281.

Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labandera-Gonzalez C., Caballero-Mellado J., Aguirre J.F., Kapulnik Y., Brener S., Burdman S., Kadouri D., Sarig S. & Okon Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Aust. J. Plant Physiol. 28: 871-879.

Dobbelaere S. & Okon Y. 2007. The Plant Growth-Promoting Effect and Plant Responses. In: Elmerich C. & Newton W. E. (eds.), Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. 145-170.

Eckert B., Weber O.B., Kirchhof G., Halbritter A., Stoffels M. & Hartmann A. 2001. *Azospirillum doebereinerae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus.* Int. J. Syst. Evol. Bacteriol. 51: 17-26.

Elmerich C. 2007. Historical Perpective: from Bacterization to Endophytes. In: Elmerich C.& Newton W.E. (eds.), Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. 1-20.

Enkh-Amgalan J., Kawasaki H., Oh-oka H. & Seki T. 2006. Cloning and characterization of a novel gene involved in nitrogen fixation in *Heliobacterium chlorum*: a possible regulatory gene. Arch. Microbiol. 186: 327-337.

Euzéby J.P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 590-592. (List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Last full update: February 26, 2009. URL: http://www.bacterio.net).

Evans H.J. & Burris R. 1992. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the Last 50 Years. In: Stacey G., Burris R.H. & Evans H.J. (eds.), Biological Nitrogen Fixation. Chapman and Hall, New York. 1-42.

Farmer J.J. III, Janda M., Brenner F.W., Cameron D.N. & Birkhead K.M. 2005. Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411^{AL}. In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 2, part B, Springer-Verlag, New York. 494-546.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.

Flores-Mireles A.L., Winans S.C. & Holguin G. 2007. Molecular characterization of diazotrophic and denitrifying bacteria associated with mangrove roots. Appl. Environ. Microbiol. 73(22): 7308-7321.

Foster L.J.R., Kwan B.H. & Vancov T. 2004. Microbial degradation of the organophosphorous pesticide, Ethion. FEMS Microbiol. Lett. 240(1): 49-53.

Franche C., Lindström K. & Elmerich C. 2008. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant Soil, published on line 03 December 2008, doi 10.1007/s11104-008-9833-8.

Fouts D.E., Tyler H.L., DeBoy R.T., Daugherty S., Ren Q., Badger J.H., Durkin A.S., Huot H., Shrivastava S., Kothari S., Dodson R.J., Mohamoud Y., Khouri H., Roesch L.F.W., Krogfelt K.A., Struve C., Triplett E.W. & Methé B.A. 2008. Complete genome sequence of the N_2-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. PloS Genet. 4(7): e1000141.

Fuentes-Ramirez L.E. & Caballero-Mellado J. 2005. Bacterial Biofertilizers. In: Siddiqui Z.A. (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. 143-172.

Fox G.E., Stackebrandt E., Hespell R.B., Gibson J., Maniloff J., Dyer T.A., Wolfe R.S., Balch W.E., Tanner R.S., Magrum L.J., Zablen L.B., Blakemore R., Gupta R., Bonen L., Lewis B.J., Stahl D.A., Luehrsen K.R., Chen K.N. & Woese C.R. 1980. The phylogeny of prokaryotes. Science 209: 457-463.

Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D. & Bairoch A. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res. 31: 3784-3788.

Gibson G.R. 1990. Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. J. Appl. Bacteriol. 69: 769-797.

Gupta R.S. 2000. The phylogeny of Proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. FEMS Microbiol. Rev. 24: 367-402.

Gupta R.S. 2001. The branching order and phylogenetic placement of species from completed bacterial genomes, based on conserved indels found in various proteins. Int. Microbiol. 4: 187-202

Grimont P.A.D. & Grimont F. 2005a. Genus XII. *Enterobacter* Hormaeche and Edwards 1960b, 72[AL]. In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 2, Part B, Springer-Verlag, New York. 661-669.

Grimont P.A.D. & Grimont F. 2005b. Genus XVI. *Klebsiella* Trevisan 1885, 105[AL]. In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 2, Part B, Springer-Verlag, New York. 685-693.

Grimont P.A.D. & Grimont F. 2005c. Genus XXIII. *Pantoea* Gavini, Mergaert, Beji, Mielcarek, Izard, Kersters and De Ley 1989b, 343[VP]. In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 2, Part B, Springer-Verlag, New York. 713-720.

Grimont P.A.D. & Grimont F. 2005d. Genus XXXIV. *Serratia* Bizio 1823, 288[AL]. In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 2, Part B, Springer-Verlag, New York. 799-811.

Gyaneshwar P., James E.K., Mathan N., Reddy P.M., Reinhold-Hurek B. & Ladha J.K. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 183: 2634-2645.

Halbleib C.M. & Ludden P.W. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. J. Nutr. 130: 1081-1084.

Hardoim P.R., van Overbeek L.S. & van Elsas J.D. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiol. 16(10): 463-471.

Hartmann A. & Baldani J.I. 2006. The Genus *Azospirillum*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 5, Springer-Verlag, New York. 115-140.

Haselkorn R. 2007. Heterocyst Differentiation and Nitrogen Fixation in Cyanobacteria. In: Elmerich C.& Newton W. E. (eds.), Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. 233-255.

Hashimoto J.G., Stevenson B.S. & Schmidt T.M. 2003. Rates and consequences of recombination between rRNA operons. J. Bacteriol. 185(3): 966-972.

Henson B.J., Watson L.E. & Barnum S.R. 2004. The evolutionary history of nitrogen fixation, as assessed by *nifD*. J. Mol. Evol. 58: 390-399.

Holguin G., M. Guzman M. & Bashan Y. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: Their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. FEMS Microbiol. Ecol. 101: 207-216.

Holguin G., Patten C.L. & Glick B.R. 1999. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. Biol. Fertil. Soils 29:10-23.

Holguin G. & Glick B.R. 2003. Transformation of *Azospirillum brasilense* Cd with an ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 fused to the *Tet*^{r} gene promoter improves its fitness and plant growth promoting ability. Microb. Ecol. 46: 122-133.

Holmes D.E., Nevin K.P. & Lovley D.R. 2004. In situ expression of *nifD* in Geobacteraceae in subsurface sediments. Appl. Environ. Microbiol. 70(12): 7251-7259.

Holmes D.S. & Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114: 193-197.

Hove van C. & Lejeune A. 2002. The *Azolla–Anabaena* symbiosis. Biology and environment: proceedings of the royal irish academy. 102B(1): 23-26.

Hsu S.F. & Buckley D.H. 2009. Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. ISME J. 3: 124-136.

Hubbell D.H. & Kidder G. 2003. Biological nitrogen fixation. University of Florida IFAS Extension SL16. USA.

Huergo L.F., Chubatsu L.S., Souza E.M., Pedrosa F.O., Steffens M.B.R. & Merrick M. 2006. Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. FEBS Lett. 580: 5232-5236.

Hurek T., Handley L.L., Reinhold-Hurek B. & Piché Y. 2002. *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. Mol. Plant Microbe Interact. 15(3): 233-242.

Hurek T. & Reinhold-Hurek B. 2003. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. J. Biotechnol. 106: 169-178.

Imhoff J.F. 2005. Genus I. Ectothiorhodospira Pelsh 1936, 120^{AL}. In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 2, Part B, Springer-Verlag, New York. 43-48.

Imhoff J.F. 2006. The Phototropic Betaproteobacteria. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 5, Springer-Verlag, New York. 593-601.

Janda J.M. & Abbott S.L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. J. Clin. Microbiol. 45(9): 2761-2764.

Jones D.L. & Hinsinger P. 2008. The rhizosphere: complex by design. Plant Soil 312: 1-6.

Jung S., Lee M., Oh T. & Yoon J. 2007. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. platyphyllum. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2284-2288.

Kechris K.J, Lin J.C., Bickel P.J. & Glazer A.N. 2006. Quantitative exploration of the occurrence of lateral gene transfer by using nitrogen fixation genes as a case study. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.123(25): 9584-9589.

Kelly D.P. & Wood A.P. 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 511-516.

Kelly D.P. & Wood A.P. 2005. Genus I. *Acidithiobacillus* Kelly and Wood 2000, 513^{VP}. In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 2, Part B, Springer-Verlag, New York. 60-62.

Kennedy C. & Bishop P. 2004. Genetics of Nitrogen Fixation and Related Aspects of Metabolism in Species of *Azotobacter*: History and Current Status. In: Klipp W., Masepohl B., Gallon J.R. & Newton W.E. (eds.), Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria. 27-52.

Kennedy I.R., Choudhury A.T.M.A. & Kecskés M.L. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? Soil Biol. Biochem. 36: 1229-1244.

Kennedy C., Rudnick P., MacDonald M.L. & Melton T. 2005. Genus III. *Azotobacter* Beijerinck 1901, 567^{AL}. In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 2, Part B, Springer-Verlag, New York. 384-402.

Kessler P.S., McLarnan J. & Leigh J.A. 1997. Nitrogenase phylogeny and the molybdenum dependence of nitrogen fixation in *Methanococcus maripaludis*. J. Bacteriol. 179(2): 541-543.

Kessler P.S., Blank C. & Leigh J.A. 1998. The *nif* gene operon of the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. J. Bacteriol. 180(6): 1504-1511.

Khammas K.M., Ageron E., Grimont P.A. & Kaiser P. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res. Microbiol. 140: 679.

Klappenbach J.A., Saxman P.R., Cole J.R. & Schmidt T.M. 2001. rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. Nucleic Acids Res. 29(1): 181-184.

Kloepper J.W., Rodriguez-Ubana R., Zehnder G.W., Murphy J.F., Sikora E. & Fernández C. 1999. Plant root-bacteria interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. Austral. Plant Pathol. 28: 21-26.

Koga J., Adaehi T. & Hidaka H. 1991. Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. Mol. Gen. Genet. 226: 10-16.

Koga J., Adaehi T. & Hidaka H. 1992. Purification and characterization of indolepyruvate decarboxylase. A novel enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. J. Biol. Chem. 267(22): 15823-15828.

Krotzky A. & Werner D. 1987. Nitrogen fixation in *Pseudomonas stutzeri*. Arch. Microbiol. 147: 48-57.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 376: 514-516.

Lalucat J., Bennasar A., Bosch R., García-Valdés E. & J. Palleroni N.J. 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70(2): 510-547.

Leigh J.A. 2000. Nitrogen fixation in methanogens: The archaeal perspective. Curr. Issues Mol. Biol. 2(4): 125-131.

Li C.Y., Massicote H.B. & Moore L.V.H. 1992. Nitrogen-fixing *Bacillus* sp. associated with Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae. Plant Soil 140(1): 35-40.

Lin S.Y., Young C.C., Hupfer H., Siering C., Arun A.B., Chen W.M., Lai W.A., Shen F.T., Rekha P.D. & Yassin A.F. 2009. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. Int. J. Syst. Evol. Mocrobiol. 59(4): 761-765.

Lindemann W.C. & Glover C.R. 2003. Nitrogen fixation by legumes. New Mexico state University Guide-129.USA.

Lobo A.L. & Zinder S.H. 1992. Nitrogen Fixation by Methanogenic Bacteria. In: Stacey G., Burris R.H. & Evans H.J. (eds.), Biological Nitrogen Fixation. Chapman and Hall, New York. 191-211.

Lovell C.R., Piceno Y.M., Quattro J.M. & Bagwell C.E. 2000. Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. Appl. Environ. Microbiol. 66(9): 3814-3822.

Ludwig W. & Klenk H.P. 2005. Overview: A Phylogenetic Backbone and Taxonomic Framework for Procaryotic Systematics. In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 2, part A, Springer-Verlag, New York. 49-66.

Madigan M.T., S.S. Cox & Stegeman R.A. 1984. Nitrogen fixation and nitrogenase activities in members of the family Rhodospirillaceae. J. Bacteriol. 157: 73-78.

Madigan M.T. 1995. Microbiology of Nitrogen Fixation by Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. In: Blankenship R.E., Madigan M.T. & Bauer C.E. (eds.), Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 915-928.

Madigan M.T. 2006. The Family Heliobacteriaceae. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 4, Springer-Verlag, New York. 951-964.

Magalhães F.M.M., Baldani J.I. Souto S.M., Kuykendall J.R. & Döbereiner J. 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An. Acad. Bras. Cien. 55: 417-430.

Malhotra M. & Srivastava S. 2008. Organization of the *ipdC* region regulates IAA levels in different *Azospirillum brasilense* strains: molecular and functional analysis of *ipdC* in strain SM. Environ. Microbiol. 10(5): 1365-1373.

Mantelin S. & Touraine B. 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. J. Exp. Bot. 55(394): 27-34.

Martin-Didonet C.C., Chubatsu L.S., Souza E.M., Kleina M., Rego F.G., Rigo L.U., Yates M.G. & Pedrosa F.O. 2000. Genome structure of the genus Azospirillum. J. Bacteriol. 182: 4113-4116.

Martínez J., Martínez L., Rosenblueth M., Silva J. & Martínez-Romero E. 2004. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. Int. Microbiol. 7: 261-268.

Masepohl B., Drepper T., Paschen A., Groß S., Pawlowski A., Raabe K., Riedel K. & Klipp W. 2002. Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 4(3): 243-248.

Matthew Sattley W., Madigan M.T., Swingley W.D., Cheung P.C., Clocksin K.M., Conrad A.L., Dejesa L.C., Honchak B.M., Jung D.O., Karbach L.E., Kurdoglu A., Lahiri S., Mastrian S.D., Page L.E., Taylor H.L., Wang Z.T., Raymond J., Chen M., Blankenship R.E. & Touchman J.W. 2008. The genome of *Heliobacterium modesticaldum*, a phototrophic representative of the Firmicutes containing the simplest photosynthetic apparatus. J. Bacteriol. 190(13): 4687-4696.

Mehnaz S. & Lazarovits G. 2006. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. Microb. Ecol. 51: 326-335.

Mehnaz S., Weselowski B. & Lazarovits G. 2007a. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 620-624.

Mehnaz S., Weselowski B. & Lazarovits G. 2007b. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 620-624.

Methé B.A., Webster J., Nevin K., Butler J. & Lovley D.R. 2005. DNA microarray analysis of nitrogen fixation and Fe (III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. Appl. Environ. Microbiol. 71(5): 2530-2538.

Miyamoto T., Kawahara M. & Minamisawa K. 2004. Novel endophytic nitrogen-fixing clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. App. Environ. Microbiol. 70(11): 6580-6586.

Moore E.R.B., Tindall B.J., Martins Dos Santos V.A.P., Pieper D.H., Ramos J.L. & Palleroni N.J. 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 6, Springer-Verlag, New York. 646-703.

Moreno E. 1998. Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? FEMS Microbiol. Rev. 22: 255-275.

Mullis K.B. & Faloona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155: 335-350.

Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S., Saiki R., Horn G. & Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51(1): 263-273.

Muthukumarasamy R., Revathi G., Seshadri S. & Lakshminarasimhan C. 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. Curr. Sci. 83(2): 137-145.

Nelson D.C., Waterbury J.B. & Jannasch H.W. 1982. Nitrogen fixation and nitrate utilization by marine and freshwater *Beggiatoa*. Arch Microbiol 133: 172-177.

Overmann J. 2005. Green Sulfur Bacteria. In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 1, Springer-Verlag, New York. 601-605.

Paul E.A. & Clark F.E. 1989. Soil microbiology and biochemistry. Chap.10. Academic Press.

Pedraza R.O. 2007. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. Int. J Food Microbiol. doi10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.079.

Pedrosa F.O. & Elmerich C. 2007 Regulation of Nitrogen Fixation and Ammonium Assimilation in Associative and Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria. In: Elmerich C. & Newton W.E. (eds.), Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. 41-71.

Peng G., Wang H., Zhang G., Hou W., Liu Y. Wang E.T. & Tan Z. 2006. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. Int. J. Syst. Evol. Bacteriol. 56: 1263-1271.

Poly F., Lucile L.J. & Bally R. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. Res. Microbiol. 152: 95-103.

Pot B., Gillis M. & De Ley J. 2006. The Genus *Aquaspirillum*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 5, Springer-Verlag, New York. 710-722.

Pretorius I.M., Rawlings D.E., O'Neil E.G., Jones W.A., Kirby R. & Woods D.R. 1987. Nucleotide sequence of the gene encoding the nitrogenase iron protein of *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 169(1): 367-370.

Rameshkumar N., Fukui Y., Sawabe T. & Nair S. 2008. *Vibrio porteresiae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a mangrove-associated wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). Int. J. Syst. Evol. Microbiol.; 58: 1608-1615.

Raymond J., Siefert J.L., Staples C.R. & Blankenship R.E. 2004. The natural history of nitrogen fixation. Mol. Biol. Evol. 21(3): 541-554.

Rediers H., Vanderleyden J. & De Mot R. 2004. *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? Microbiology 150: 1117-1119.

Rediers H., Vanderleyden J. & De Mot R. 2007. Nitrate respiration in *Pseudomonas stutzeri* A15 and its involvement in rice and wheat root colonization. Microbiol. Res. doi:10.1016/j.micres.2007.03.003

Reinhold B., Hurek T., Fendrik I., Pot B., Gillis M., Kertsers K., Thielemans D. & De Ley J. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.]. Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 43-51.

Reinhold-Hurek B., Hurek T., Gillis M., Hoste B., Vancanneyt M., Kersters K. & De Ley J. 1993. *Azoarcus* gen, *nov.*, nitrogen-fixing Proteobacteria associated with roots of Kallar grass *(Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp**.** nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43(3): 574-584.

Reinhold-Hurek B. & Hurek T. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. Trends Microbiol. 6(4): 139-144.

Reinhold-Hurek B. & Hurek T. 2006. The Genera *Azoarcus*, *Azovibrio*, *Azospira* and *Azonexus*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 5, Springer-Verlag, New York. 873-891.

Reinhold-Hurek B. & Hurek T. 2007. Endophytic Associations of *Azoarcus* spp. In: Elmerich C. & Newton W.E. (eds.), Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. 191-211.

Reis V., Lee S. & Kennedy C. 2007. Biological Nitrogen Fixation in Sugarcane. In: Elmerich C. & Newton W.E. (eds.), Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. 213-232.

Rius N., Fusté M.C., Guasp C., Lalucat J. & Lorén J.G. 2001. Clonal population structure of *Pseudomonas stutzeri*, a species with exceptional genetic diversity. J. Bacteriol. 183(2): 736-744.

Roberts G.P. & Ludden P.W. 1992. Nitrogen Fixation by Photosynthetic Bacteria. In: Stacey G., Burris R.H. & Evans H.J. (eds.), Biological Nitrogen Fixation. Chapman and Hall, New York. 135-165.

Rodelas B., González-López J., Martínez-Toledo M.V., Pozo C. & Salmerón V. 1999. Influence of *Rhizobium*/*Azotobacter* and *Rhizobium*/*Azospirillum* combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba* L.). Biol. Fertil. Soils 29: 165-169.

Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J. & Dowling D.N. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiol. Lett. 278: 1-9.

Saikia S.P. & Jain V. 2007. Biological nitrogen fixation with non-legumes: An achievable target or a dogma? Curr. Sci. 92(3): 317-322.

Saitou N. & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.

Saleem M., Arshad M., Hussain S. & Bhatti A.S. 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34: 635-648.

Sambrook P.N., Champion G.D., Browne C.D., Cairns D., Cohen M.L., Day R.O., Graham S., Handel M., Jaworski R., Kempler S. & Wacher T. 1989. Corticosteroid injection for osteoarthritis of the knee: peripatellar compared to intra-articular route. Clin. Exp. Rheumatol. 7: 609-613.

Saravanan V.S., Madhaiyan M., Osborne J, Thangaraju M. &. Sa T.M. 2008. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: Their possible role in plant growth promotion. Microb. Ecol. 55: 130-140.

Sarita S., Priefer U.B., Prell J. & Sharma P.K. 2008. Diversity of *nifH* gene amplified from rhizosphere soil DNA. Curr. Sci. 94(1): 109-115.

Schmid M. & Hartmann A. 2007. Molecular Phylogeny and Ecology of Root Associated Diazotrophic α- and β-Proteobacteria. In: Elmerich C. & Newton W.E. (eds.), Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. 21-40.

Sikorski J., Lalucat J. & Wackernage W. 2005. Genomovars 11 to 18 of *Pseudomonas stutzeri*, identified among isolates from soil and marine sediment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1767-1770.

Skerman V.B.D., McGowan V. & Sneath P.H.A. 1980. Approved Lists of Bacterial Names. Int. J. Syst. Bacteriol. 30: 225-420.

Sly L.I. & Stackebrandt E. 1999. Description of *Sermanella parooensis* gen. nov., to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 541.

Soltis D.E., Soltis P.S., Morgan D.R., Swensen S.M., Mullin B.C., Dowd J.M. & Martin P.G. 1995. Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 2647-2651.

Somers E., Vanderleyden J. & Srinivasan M. 2004. Rhizosphere signalling: A love parade beneath our feet. Crit. Rev. Microbiol. 30: 205-240.

Sorokin I.D., Kravchenko I.K., Tourova T.P., Kolganova T.V., Boulygina S.B. & Sorokin D.Y. 2008. *Bacillus alkalidiazotrophicus* sp. nov., a diazotrophic, low salt-

tolerant alkaliphile isolated from Mongolian soda soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2459-2464.

Spaepen S., Vanderleyden J. & Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. FEMS Microbiol. Rev. 31: 425-448.

Spring S. & Rosenzweig F. 2006. The Genera *Desulfitobacterium* and *Desulfosporosinus*: Taxonomy. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 4, Springer-Verlag, New York. 771-786.

Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kämpfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rosselló-Mora R., Swings J., Trüper H.G., Vauterin L., Ward A.C. & Whitman W.B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1043-1047.

Steenhoudt O. & 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.

Stepkowski T., Czaplinska M., Miedzinska K. & Moulin L. 2003. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. Syst. Appl. Microbiol. 26: 483-494.

Stevenson F.J. (ed.) 1982. Nitrogen in Agricultural Soils. American Society of Agronomy, Madison, WI. USA.

Tamura K., Nei M. & Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbour-joining method. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 11030-11035.

Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.

Tarrand J.J., Krieg N.R. & Döbereiner J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24: 967-980.

Thamizh Vendan R. & Thangaraju M. 2007a. Development and standardization of cyst based liquid formulation of *Azospirillum* bioinoculant. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 54: 167-177.

Thamizh Vendan R. & Thangaraju M. 2007b. Standardization of dosage of liquid and cyst formulations of *Azospirillum* for different application methods. Acta Agron. Hung. 55: 475-484.

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

Tilak K.V.B.R., Ranganayaki N., Pal K.K., De R., Saxena A.K., Shekhar Nautiyal C., Mittal S., Tripathi A.K. & Johri B.N. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. Curr. Sci. 89(1): 136-150.

Triplett E.W. 2007. Prospects for Significant Nitrogen Fixation in Grasses from Bacterial Endophytes. In: Elmerich C. & Newton W.E. (eds.), Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. 303-314.

Tyson G.W., Lo I., Baker B.J., Allen E.E., Hugenholtz P. & Banfield J.F. 2005. Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an acidophilic microbial community. Appl. Environ. Microbiol. 71(10): 6319-6324.

Urdaci M.C., Stal L.J. & Marchand M. 1988. Occurrence of nitrogen-fixation among *Vibrio* spp. Arch. Microbiol. 150: 224-229.

Valdés J., Pedroso I., Quatrini R., Dodson R.J., Tettelin H., Blake II R., Eisen J.A. & Holmes D.S. 2008. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. BMC Genomics. 9: 597. (doi:10.1186/1471-2164-9-597)

Vanbleu E. & Vanderleyden J. 2007. Molecular Genetics of Rhizosphere and Plant-Root Colonization. In: Elmerich C. & Newton W.E. (eds.), Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. 85-112.

Van Dommelen A. & Vanderleyden J. 2007. Associative Nitrogen Fixation. In: Bothe H., Ferguson S.J. & Newton W.E. (eds.), Biology of the Nitrogen Cycle. 179-192.

Vermeiren H., Willems A., Schoofs G., de Mot R., Keijers V., Hai W. & Vanderleyden J. 1999. The rice inoculant strain *Alcaligenes faecalis* A15 is a nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri*. Syst. Appl. Microbiol. 22**:** 215-224.

Vitousek P.M., Cassman K., Cleveland C., Crews T., Field C.B., Grimm N.B., Howarth R.W., Marino R., Martinelli L., Rastetter E.B. & Sprent J.I. 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. Biogeochemistry 57/58: 1-45.

Wahlund T.M. & Madigan M.T. 1993. Nitrogen fixation by the thermophilic green sulphur bacterium *Chlorobium tepidum*. J. Bacteriol.175(2): 474-478.

Waller A.S., Cox E.E., & Edwards E.A. 2004. Perchlorate reducing microorganisms isolated from contaminated sites. Environ. Microbiol. 6(5): 517-527.

Wang S., Chen J. & Johnson J.L. 1988. The presence of five *nifH*-like sequences in *Clostridium pasteurianum*: sequence divergence and transcription properties. Nucleic Acids Res. 16: 439-454.

Wei H., Gui-Xiang P., Zhi-Jun X., Shi-Xian C. & Zhi-Yuan T. 2007. Diversity of endophytic diazotrophs isolated from *Bambusa blumeana* in Guangdong province. Chin. J. Agric. Biotechol. 4(2): 105-109.

Weir B.S. 2008. The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website. http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html. Last updated: 16th November, 2008.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. & Lane D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173(2): 697-703.

Widdel F. 2006. The Genus *Desulfotomaculum*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 4, Springer-Verlag, New York. 787-794.

Wiegel J. 2006. The Genus *Xanthobacter*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 5, Springer-Verlag, New York. 290-314.

Wiegel J., Tanner R. & Rainey F.A. 2006. An Introduction to the Family Clostridiaceae. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 4, Springer-Verlag, New York. 654-678.

Xie C.H. & Yokota A. 2005a. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. Int. J. Syst. Evol. Bacteriol. 55: 1435-1438.

Xie C.H. & Yokota A. 2005b. Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 2419-2425.

Xie C.H. & Yokota A. 2006. *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*. Int. J. Syst. Evol. Bacteriol. 56: 889-893.

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. & Jin Q. 2008. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105(21): 7564-7569.

Yoon J., Kang S., Park S., Lee S. & Tae-Kwang Oh T. 2007. Reclassification of *Aquaspirillum itersonii* and *Aquaspirillum peregrinum* as *Novispirillum itersonii* gen. nov., comb. nov. and *Insolitispirillum peregrinum* gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Evol. 57: 2830-2835.

Young J.P.W. 1992. Phylogenetic Classification of Nitrogen-Fixing Organisms. In: Stacey G., Burris R.H. & Evans H.J. (eds.), Biological Nitrogen Fixation. Chapman and Hall, New York. 43-86.

Young J.M. & Park D.-C. 2007. Probable synonymy of the nitrogen-fixing genus *Azotobacter* and the genus *Pseudomonas*. Int. J. Syst. Evol. Bacteriol. 57: 2894-2901.

Young C.C., Hupfer H., Siering C., Ho M.J., Arun A.B., Lai W.A., Rekha P.D., Shen F.T., Hung M.H., Chen W.M. & Yassin A.F. 2008. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. Int. J. Syst. Evol. Bacteriol. 58: 959-963.

Zehnder G.W., Murphy J.F., Sikora E. & Kloepper J.W. 2001. Application of rhizobacteria for induced resistance. Eur. J. Plant Pathol. 107: 39-50.

Zehr J.P., Jenkins B.D., Short S.M. & Steward G.F. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. Environ. Microbiol. 5(7): 539-554.

Zhou J., Fries M.R., Chee-Sanford J.C. & Tiedje J.M. 1995. Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 500-506.

Zimmer W., M. Wesche & Timmermans L. 1998. Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. Curr. Microbiol. 36**:**327-331.

Zuckerkandl E. & Pauling L. 1965a. Molecules as documents of evolutionary history. J. Theor. Biol. 8: 357-366.

Zuckerkandl E. & Pauling L. 1965b. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson V. & Vogel H.J. (eds.), Evolving Genes and Proteins. Academic Press, New York. 97-166.